

На правах рукописи



Ермак Никита Андреевич

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ИММУНОТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ
С ПРОГРЕССИРУЮЩИМ РАКОМ ЭНДОМЕТРИЯ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Стахеева Марина Николаевна

доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ

Коломиец Лариса Александровна

Официальные оппоненты:

Гуляева Людмила

Федоровна

доктор биологических наук, профессор, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», лаборатория молекулярных механизмов канцерогенеза, руководитель

Румянцев Алексей

Александрович

кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отделение противоопухолевой лекарственной терапии №4, заведующий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург.

Защита состоится «___» _____ 2026 года в ____ . ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.06 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу г. Томск, пер. Кооперативный, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://tnimc.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук



Зведева А. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Рак эндометрия (РЭ) является одной из значимых проблем здравоохранения во всем мире. В России по состоянию на 2023 год рак тела матки является третьим по частоте (8 %) раком среди женского населения (А.Д. Каприн, 2024г).

Основной причиной смертей от РЭ, как и от других злокачественных новообразований, является прогрессирование заболевания. Женщины с прогрессирующим РЭ обычно получают хирургическое лечение в объеме: экстирпация матки с придатками и лимфодиссекция. В послеоперационном периоде, в зависимости от наличия неблагоприятных факторов прогноза, больным может быть назначена лучевая и химиотерапия (Abu-Rustum N, et. al., 2023). Однако, в настоящее время отсутствует консенсус в отношении наиболее эффективных методов 2-й и 3-й линии терапии, что определяет проблему лечения, прогрессирующего РЭ как актуальную.

В сложившейся клинической ситуации иммунотерапия становится потенциальной стратегией для улучшения лечения рака эндометрия. Одним из первых иммунотерапевтических препаратов, одобренных FDA в качестве терапии 2-й линии при MSI-H/dMMR (высокая микросателлитная нестабильность, дефицит системы репарации) опухолях, независимо от их типа, стал пембролизумаб – высокоселективное моноклональное анти-PD-1 антитело, которое, связываясь с молекулой PD-1 отменяет вызванную иммуносупрессию (Wang S., 2023). Частота объективных ответов и медиана безрецидивной выживаемости у пациенток с прогрессирующим РЭ с MSI-H/dMMR при применении пембролизумаба достигла 57,1 % и 25,7 месяцев, соответственно (Makker V., 2020). При этом, в группе больных MSS/pMMR РЭ (стабильный статус опухоли), составляющих 70 % от всех больных РЭ (Ryan N.A.J., 2019), частота объективных ответов на пембролизумаб составила лишь 11,2 % (O'Malley D.M., 2022), что свидетельствует о неэффективности использования данного препарата для пациенток с MSS и подчеркивает необходимость поиска способов улучшения действия иммунотерапии у данной группы больных.

С 2020 г. для лечения группы MSS/pMMR начали использовать иммунотаргетную терапию (ИТТ) – комбинацию пембролизумаба с ленватинибом (пероральным низкомолекулярным ингибитором различных тирозинкиназ (Capozzi M., 2019). Для РЭ комбинация ленватиниба и пембролизумаба продемонстрировала обнадеживающую противоопухолевую активность независимо от MSI-H или dMMR статуса: применение данной комбинации увеличивает частоту объективных ответов до 38,3 % (Makker V., 2020). Однако и данные показатели далеки от желаемых, что определяет необходимость изучения молекулярно-клеточных механизмов, лежащих в основе терапевтического действия данной комбинации и поиска критериев стратификации пациенток для назначения эффективной ИТТ пембролизумабом и ленватинибом, фактически отсутствующие на настоящий момент (Agora S., 2020).

В экспериментальных исследованиях показана связь ряда иммунологических механизмов с эффективностью применения пембролизумаба и ленватиниба. Так, показано, что количество CD8+ клеток в периферической крови (ПК) при гепатоцеллюлярной карциноме (Huang S., 2022), вариабельность Т-клеточного рецептора при раке легкого (Matsumoto S., 2020), инфильтрация резидентными тканевыми Т-клетками памяти эпителия

опухоли для различных локализаций (Олейник Е.К., 2020) ассоциировано с эффективностью таргетной терапии. Предположительно, подобные механизмы могут опосредовать противоопухолевый эффект и при РЭ. Подтверждением этому служат сведения о связи количества и структуры клеток опухолевого микроокружения – инфильтрирующих опухоль цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов и CD4⁺ Т-клеток с эффективностью ИТТ при РЭ (Diang S., 2025). Однако данные о связи параметров системного иммунитета с эффективностью ИТТ при MSS/pMMR РЭ отсутствуют. Изучение циркулирующих в крови иммунных клеток, ассоциированных с эффективностью ИТТ является перспективным для клинической практики, поскольку взятие ПК является малоинвазивным вмешательством и позволит оценивать изменение параметров интереса в динамике проводимой терапии. Следовательно, изучение иммунологических механизмов и выявление ассоциированных с ними показателей системного иммунитета при MSS/pMMR РЭ является актуальной проблемой и повысит точность прогноза эффективности противоопухолевой терапии прогрессирующего MSS/pMMR РЭ, в том числе с применением иммунотаргетных агентов.

Важным аспектом проведения эффективной ИТТ является влияние факторов, модулирующих состояние иммунной системы. Так, один из возможных механизмов терапевтического действия ленватиниба может быть связан с его способностью снижать уровень IL-6 и TNF-α (Zhu, J., 2021) и увеличивать уровень IL-10 (Peng C., 2023). Другим важным фактором являются биологические свойства опухоли (Олейник Е.К., 2020). Мутагенез, высокий уровень которого характерен для злокачественных клеток, изменяет биологические свойства опухоли, а вместе с этим и опухолевое микроокружение. Так, в исследовании Chen, S. (2023) показано, что для пациенток, у которых наиболее часто встречались мутации в генах *PTEN*, *ARID1A* и *PIK3CA*, в микроокружении опухоли в большей степени выражена экспрессия генов иммунного ответа и отмечена самая высокая доля (31 %) пациенток, ответивших на терапию ингибиторами контрольных точек.

Также в литературе отсутствуют данные об ассоциации клинико-морфологических характеристик больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ с эффективностью ИТТ. Подобное исследование может стать основой для разработки новых критериев стратификации пациенток для назначения эффективной ИТТ.

Таким образом, изучение иммунологических механизмов, ассоциированных с терапевтическими эффектами пембролизумаба в комбинации с ленватинибом, а также факторов, модулирующих морфо-функциональное состояние иммунной системы (цитокиновый профиль, клинический статус пациентки, биологические свойства опухоли) у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия является актуальным. В перспективе подобные данные могут быть основой для разработки критериев стратификации пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ для назначения эффективной ИТТ.

Степень разработанности темы

В настоящее время в клинике принят лишь один критерий для назначения ИТТ больным с прогрессированием РЭ является статус высокой микросателлитной нестабильности (Aroga S., 2020). Также существуют данные о факторах, предсказывающих эффективность применения ИТТ, но они ограничиваются показателями локального иммунитета, а именно особенностями субпопуляционной структуры опухолевого микроокружения (Мальцева А.А., 2024).

В настоящее время в литературе нет точных данных о том, какие фенотипические особенности иммунных клеток, концентрация цитокинов, циркулирующих в крови, биологические свойства опухоли и клиничко-морфологические характеристики пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ могут быть ассоциированы с эффективным применением ИТТ.

Цель исследования

Изучить связь клиничко-морфологических и иммунологических параметров у больных прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия с эффективностью иммунотаргетной терапии.

Задачи

1. Оценить непосредственные и отдаленные результаты иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия.
2. Изучить влияние иммунотаргетной терапии на иммунологические показатели, ассоциированные с молекулярно-клеточными механизмами действия пембролизумаба в комбинации с леватинибом, у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия.
3. Изучить направленность изменений иммунологических показателей при проведении иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия в зависимости от эффективности ИТТ.
4. Оценить цитокиновый профиль пациенток и биологические особенности опухоли как факторы, сопряженные с изменением патогенетически значимых иммунологических показателей, вовлеченных в реализацию терапевтических эффектов иммунотаргетной терапии у больных прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия.
5. Разработать решающее правило для прогноза эффективности иммунотаргетной терапии на основе клиничко-морфологических характеристик и иммунологических параметров у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия.

Научная новизна

В рамках многоцентрового неинтервенционного наблюдательного исследования, инициированного НИИ онкологии Томского НИМЦ, впервые, при сроке наблюдения 45 месяцев оценены непосредственные и отдаленные результаты иммунотаргетной терапии у больных с MSS/pMMR прогрессирующим РЭ. Объективный клинический ответ наблюдался в 41,6 % случаев, в том числе частичный ответ 23,3 %, стабилизация 18,3 %. Двухлетняя выживаемость без прогрессирования (ВБП) составила $29,6 \pm 7,05$ %, двухлетняя общая выживаемость (ОВ) составила $45,25 \pm 9,09$ %. Медиана ВБП (мВБП) составила 12,6 месяцев.

Впервые показано, что ИТТ модулирует иммунную систему, что выражается в снижении количества PD-1⁺ клеток в общем пуле лимфоцитов и количества PD-1⁺CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, а также оказывает селективное угнетающее влияние на экспрессию VEGFR в неклассической популяции моноцитов. Эффективное применение ИТТ сопровождается изменениями в состоянии иммунной системы, противоположными таковым под влиянием опухолевой прогрессии (возрастание количества CD8⁺CD69⁺ активированных лимфоцитов, количества VEGFR⁺ моноцитов классической популяции, снижение количества

PD-1⁺ лимфоцитов, PD-1⁺CD8⁺ лимфоцитов, экспрессии VEGFR на моноцитах неклассической популяции относительно показателей на начальных этапах ИТТ).

Впервые показано как меняется динамика цитотоксической активности лимфоцитов в ходе ИТТ: индекс цитотоксичности увеличивается к 6 месяцам лечения, приближаясь к показателям больных РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением. Определено влияние длительной ИТТ на изменение цитокинового профиля в сыворотке крови (снижение уровня как провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8, так и цитокина с противовоспалительной активностью – IL-10 по сравнению с показателями до начала ИТТ). Впервые выявлено, что эффективная ИТТ ассоциирована с увеличением содержания MCP-1.

Впервые установлено, что состояние иммунной системы модулируется цитокинами при прогрессирующем MSS/pMMR РЭ. Увеличение уровня IL-8, TNF-α и IFN-γ сопровождалось снижением CD16⁺ моноцитов, CD14⁺CD16⁺ моноцитов и VEGFR⁺CD14⁻CD16⁻ клеток моноцитарного гейта. Увеличение уровня IL-6 связано со снижением экспрессии CD14 и VEGFR на поверхности моноцитов, а также с уменьшением CD8 на поверхности лимфоцитов и снижением числа CD69⁺CD8⁺ лимфоцитов.

На основании полученных данных впервые выявлены дополнительные факторы прогноза эффективности ИТТ у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ. Неблагоприятными факторами прогноза являются степень дифференцировки опухоли G3, наличие множественных очагов прогрессирования, метастазы в головной мозг, уровень CD8⁺CD69⁺ активированных лимфоцитов выше 99,5 % от общего количества CD8⁺ лимфоцитов в ПК. Впервые разработано решающее правило для прогноза эффективности ИТТ у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в установлении особенностей ответа иммунной системы на терапию пембролизумабом и ленватинибом у больных прогрессирующим РЭ. Выявленные клиничко-морфологические и иммунологические параметры вносят вклад в понимание механизмов терапевтического действия комбинации пембролизумаба и ленватиниба. Важным результатом для понимания закономерностей ответа на ИТТ при её эффективности является факт приближения показателей иммунной системы у больных прогрессирующим РЭ к уровню больных РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением.

Полученные данные о влиянии биологических свойств опухоли (клеточный состав опухолевого микроокружения, статус соматических мутаций) и цитокинового профиля сыворотки крови на вариабельность иммунологических показателей вносят вклад в фундаментальные знания о патогенезе РЭ.

Практическую значимость работы составляет разработанное решающее правило для предсказания эффективности ИТТ у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ, включающее клиничко-морфологические характеристики и иммунологические параметры.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала оценку непосредственных и отдаленных результатов ИТТ, ассоциативных связей клиничко-морфологических характеристик, фенотипических и функциональных показателей клеток моноцитарного, лимфоцитарного и

нейтрофильного ряда клеток ПК у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в динамике проводимой ИТТ с длительностью ВБП, с параметрами, регулирующими состояние иммунной системы, такими как содержание цитокинов в циркуляции и биологические свойства опухоли (мутационный статус, клеточный состав иммуновоспалительного компонента опухолевого микроокружения).

Исследование проводилось на основании информированного согласия всех пациенток. Изучение фенотипических особенностей иммунных клеток в циркуляции и опухолевом микроокружении проведено методами многоцветной проточной цитометрии. Уровень цитокинов в сыворотке ПК у больных РЭ был исследован методом иммуноферментного анализа. Цитотоксичность лимфоцитов, выделенных из ПК на разных этапах ИТТ, по отношению к клеткам опухоли, была исследована методом МТТ-теста.

Работа выполнена с применением современных методов, позволяющих решить поставленные задачи, которыми в полной мере владеет соискатель: многоцветная проточная цитометрия, ведение культур клеток, ИФА-анализ, МТТ тест. Соискатель работал с медицинской документацией для формирования баз данных клинико-морфологических характеристик пациенток, вовлеченных в исследование.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Изменения в состоянии иммунной системы на этапах проведения ИТТ (субпопуляционная структура моноцитов, морфо-функциональный статус лимфоцитов, цитокиновый профиль) являются маркерами прогноза эффективности проводимой терапии.
2. Морфо-функциональная структура иммунологических эффекторов, сопряженных с терапевтическим действием ИТТ у больных РЭ, связана с субпопуляционным составом опухолевого микроокружения и цитокиновым профилем пациентки.
3. Разработанное решающее правило, включающее клинико-морфологические и иммунологические параметры, позволяет прогнозировать эффективность ИТТ у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным клиническим материалом проспективного исследования, высоким методологическим и методическим уровнем с использованием современных информативных методов анализа: иммунологических, молекулярно-генетических, экспериментальных моделей *in vitro*. Обоснованность полученных результатов подтверждается корректной статистической обработкой материала.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации изложены и обсуждены на VII Международном форуме онкологии и радиотерапии “Ради Жизни – For Life” (Москва, 2024), III Форуме онкологов Сибири и Дальнего Востока (Омск, 2024), IX молодежной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2024) и на XXII международной конференции «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2025).

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, а именно пунктам п.2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)» и п.10 «Оценка эффективности противоопухолевого лечения на основе анализа отдаленных результатов», и паспорту научной специальности 3.3.3. Патологическая физиология, а именно пунктам п.6. «Изучение механизмов, лежащих в основе различных исходов и осложнений болезни; анализ причин и механизмов развития неполного выздоровления и формирования хронического течения болезни» и п.7. «Изучение реактивности и резистентности организма, комплекса его видовых, этнических, половых, возрастных, конституциональных, генетических и других индивидуальных особенностей, определяющих характер его реагирования на действие внешних патогенных факторов».

Публикации

По теме опубликовано 6 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в изучении и анализе литературы по теме диссертационного исследования. Соискатель самостоятельно проводил анализ клинико-морфологических параметров больных на основании разработанной комплексной анкеты, осуществлял комплекс исследований по изучению клеток моноцитарного, лимфоцитарного и нейтрофильного ряда и их особенностей у больных прогрессирующим РЭ, включающих формирование групп исследования, сбор материалов и пробоподготовку, выполнял ИФА-анализ, многоцветную проточную цитометрию, постановку теста цитотоксичности.

Разработка дизайна исследования и определение методологии исследования, анализ, создание электронной базы, подготовка научных публикаций, статистическая обработка материала, обобщение полученных данных и интерпретация результатов, оформление диссертации проводилось соискателем самостоятельно.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 135 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав (аналитического обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения), выводов, практических рекомендаций, списка условных сокращений и указателя литературы, включающего 151 источник, из них 10 отечественных и 141 иностранный. Работа содержит 9 таблиц и 25 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациентки: В исследование включено 98 пациенток с раком эндометрия, стадии I-IV (T1-4, N0-2, M0-1). Основную группу составили 60 пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ, которые получали ИТТ в онкологических диспансерах на территории

Сибири в рамках многоцентрового неинтервенционного наблюдательного исследования, инициированного НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2020 по 2024 годы.

У всех больных, включенных в исследование, проводилось определение статуса MSI-H/dMMR опухоли. В исследование были включены только пациентки с MSS/pMMR статусом опухоли, имеющие подписанное информированное добровольное согласие, после одобрения локальным этическим комитетом по биомедицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол №28 от 23 декабря 2022 г.). Все пациентки основной группы получали ИТТ согласно зарегистрированной схеме: пембролизумаб 200 мг внутривенно капельно 1 раз в 21 день и ленватиниб 20 мг ежедневно перорально. Лечение прекращалось при выявлении прогрессирования заболевания при контрольном обследовании или при обнаружении непереносимой токсичности III–IV степени. Оценка ответа проводилась каждые 8 недель до прогрессирования заболевания с использованием критериев оценки иммунологически связанного ответа при солидных опухолях (iRECIST). При раннем прогрессировании для исключения иммуноопосредованных реакций повторное исследование проводилось через 4 недели. Типы ответа на ИТТ были классифицированы, как полный, частичный, стабилизация или прогрессирующее заболевание. Сроки наблюдения составили 45 месяцев. Клинико-морфологические параметры пациенток данной группы представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Клинико-морфологические параметры больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ, включенных в исследование

Клинико-морфологические параметры	Пациентки с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ получившие ИТТ
Количество	60
Возраст	66,3 ± 16
Стадия FIGO	
I	19 (31,6%)
II	11 (18,3%)
III	17 (28,3%)
IV	13 (21,8%)
Тип опухоли	
Эндометриоидная	50 (83,3%)
Другие гистотипы	10 (16,7%)
Степень дифференцировки опухоли	
G1	10 (16,7%)
G2	24 (40%)
G3	26 (43,3%)
Инвазия миометрия	
<1/2	18 (30%)
>1/2	37 (61,7%)
Оперативное вмешательство	59 (98,3%)
Адьювантная ЛТ	37 (61,6%)
Адьювантная ХТ	30 (50%)
Прогрессирование	
<3	19 (31,7%)
≥3	41 (68,3%)

Клинико-морфологические параметры	Пациентки с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ получившие ИТТ
Локализация метастазов	
Тазовые ЛУ	13 (21,7%)
Парааортальные ЛУ	14 (23,3%)
Легкие	17 (28,3%)
Кости	7 (11,7%)
Головной мозг	3 (5%)
Канцероматоз	15 (25%)
Местный рецидив	15 (25%)

Анализ клинико-морфологических параметров больных с прогрессирующим РЭ, которые получали ИТТ, свидетельствуют о том, что у 68,3 % пациенток в анамнезе было более 3-х прогрессирований, по поводу чего они получали системную лекарственную терапию. Локализация метастазов, по поводу чего больные получали ИТТ, была разнообразной: лимфогенный вариант, костный, поражение легких, головной мозг и диссеминация процесса в виде канцероматоза.

В зависимости от мВБП при проведении ИТТ у больных прогрессирующим РЭ, которая в исследовании составила 12,6 месяцев, больные были разделены на две подгруппы: I подгруппу составили пациентки, у которых при проведении ИТТ были отмечены признаки прогрессирования заболевания до достижения мВБП, ИТТ в данной группе считали неэффективной; II группу – больные пережившие 12,6 месяцев без прогрессирования, у них ИТТ считали эффективной.

Группу сравнения для изучения влияния неоднократной опухолевой прогрессии и проведенного противорецидивного лечения на параметры иммунной системы составили 38 больных с впервые выявленным РЭ, получивших лечение в НИИ онкологии ТНИМЦ. Средний возраст больных составил $60,9 \pm 21$ лет, в 92,1 % больных имели эндометриоидный гистологический тип опухоли, в 81,5 % случаев степень дифференцировки была G2 и G3, 73,7 % больных имели инвазию в миометрий более 1/2 его толщины. I-II стадия была выявлена у 68,4 % больных, III-IV стадии у 31,6 %. У всех больных первым этапом лечения был хирургический, адъювантная лучевая или химиотерапия проводилась в зависимости от неблагоприятных факторов прогноза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение MSI статуса опухоли: У всех больных включенных в исследование проводилось определение статуса MSI-H/dMMR опухоли методом иммуногистохимии, используя антитела к 4 белкам (MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2) в рамках программы RUSSCO «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации с целью повышения эффективности противоопухолевого лечения». Для исследования отправлялись гистологические препараты, которые содержали не менее 20 % опухолевой ткани. В исследование были включены только пациентки с MSS/pMMR статусом опухоли (РЭ характеризующиеся отрицательным результатом по всем вышеуказанным 4 маркерам).

Оценка фенотипических особенностей моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов ПК: Фенотипические особенности моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов ПК были изучены методом проточной цитометрии у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ и у пациенток с впервые выявленным РЭ, неотягощенных прогрессированием и

противорецидивной терапией. Анализ фенотипических особенностей популяций интереса проводили с использованием моноклональных антител к антигенам человека в соответствии с рекомендациями производителя. Антитела получены от BD (США) и от Elabscience (Китай). Были оценены следующие популяции моноцитов: $CD14^+$, $CD16^+$, $CD14^+16^+$, $CD309^+14^+16^+$, $CD14^+16^+$, $CD309^+14^+16^+$, $CD14^+16^-$, $CD309^+14^-16^-$, $CD14^+16^-$, $CD309^+14^+16^-$, $CD279^+$; лимфоцитов: $CD8^+$, $CD8^+69^+$, $CCR7^+CD45R0^+$, $CCR7^+CD45RA^+$, $CD45RA^+CD45R0^-$, $CD197^-$, $CD45RA^+45R0^-$, $CD45RA^+CD27^+CD28^+$, $CD45RA^+CD27^-CD28^-$, $CD45RA^-CD27^+CD28^+$, $CD279^+45RA^+45R0^-$, $CD45RA^-R0^+$, $CD279^+CD45RA^-CD45R0^+$, $CD279^+$, $CD8^+279^+$; нейтрофилов: $CD279^+$. Для анализа и визуализации данных использовали проточный цитометр BD FACSCantoII (BD, США) и программное обеспечение FACSDiva Version 6.1.3.

Оценка фенотипических особенностей моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов в опухолевом микроокружении: Для выделения фракции популяций интереса из опухолевой и неизмененной тканей, полученных в ходе проведения операционного лечения больных, прошедших первичное радикальное лечение по поводу РЭ, производилась механическая дезагрегация тканей с помощью системы Becton Dickinson Medimachine (BD, США). Полученные клеточные суспензии окрашивали моноклональными антителами и оценивали с помощью метода проточной цитометрии по протоколу окрашивания, аналогичному для крови.

Исследование цитотоксической активности лимфоцитов, выделенных из ПК: Из ПК, полученной у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ и больных с впервые выявленным РЭ, неотягощенных прогрессированием и противорецидивной терапией, путем градиентного центрифугирования на фиколе ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) (ПанЭко, Россия) были выделены моноциты и лимфоциты, которые затем на сутки помещались на планшеты с питательной средой RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). Фракцию не прилипших к пластику клеток собирали вместе со средой, проводили отмывку, затем клетки помещали в 1 мл раствора для криоконсервации, содержащий 90% инактивированной сыворотки и 10 % ДМСО, с последующей консервацией в жидком азоте. Клеточную суспензию, являющуюся субстратом для проведения МТТ-теста, выделяли из операционного опухолевого материала с использованием ферментов коллагеназы и гиалуронидазы (Stemcell, США). Тест цитотоксичности с использованием МТТ реагента (3-(4,5диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, 5 мг/мл) (ПанЭко, Россия) проводили по стандартному протоколу. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм на фотометре Униплан (Пикон, Россия). Индекс цитотоксичности выражали в виде процента погибших опухолевых клеток от их количества в контрольной пробе без лимфоцитов ПК.

Оценка содержания цитокинов в сыворотке ПК: Содержание цитокинов в сыворотке ПК у пациенток изучали методом иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией производителя. Методом ИФА определялся уровень IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF, IFN- γ и MCP-1 с помощью соответствующих ИФА-наборов (Вектор-БЕСТ, Россия). Измерение величины оптической плотности растворов в лунках стрипов производили на спектрофотометре вертикального сканирования Multiskan FC (Thermo Scientific, США) в двухволновом режиме, при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-655 нм.

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

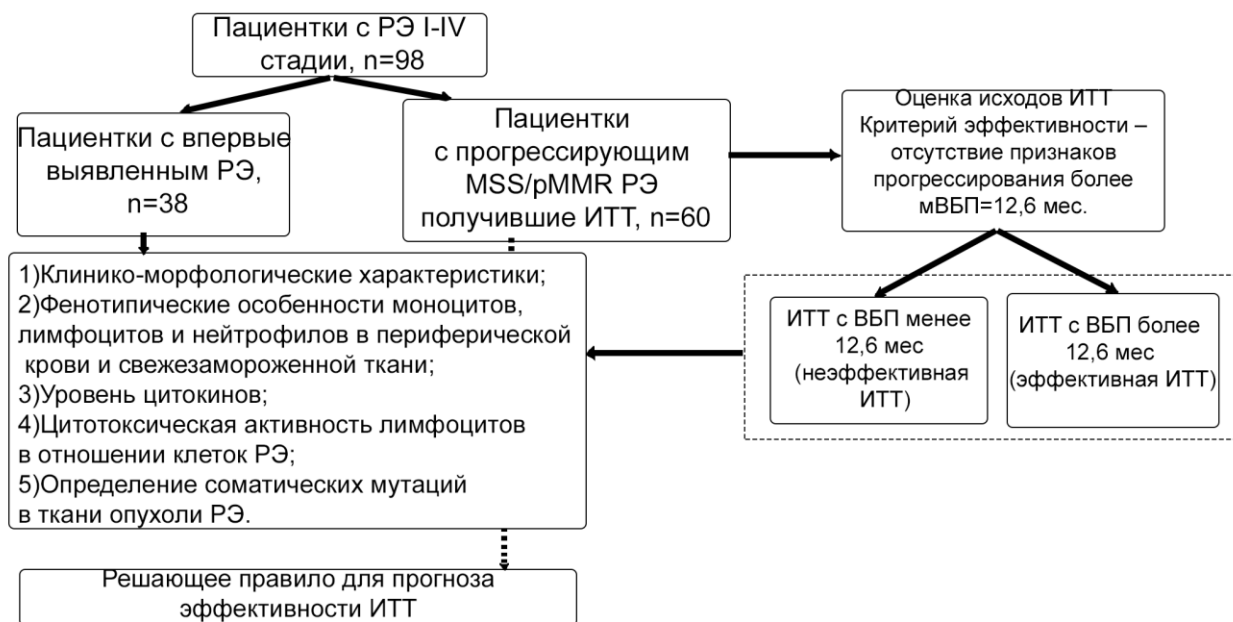


Рисунок 1 – дизайн исследования

Статистическая обработка данных. Для оценки полученных данных и их сравнения был использован статистический пакет программ “Statistica 12”. Анализ показателей ОБ и ВБП проводился с применением метода Каплана-Майера, при этом под ВБП понималось время от начала ИТТ до прогрессирования или летального исхода на фоне ее проведения. Ассоциацию клинико-морфологических параметров с длительностью ответа на ИТТ без прогрессирования оценивали с помощью Log-rank теста и дисперсионного анализа. Проверку признаков на нормальность осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Исследуемые показатели не были распределены по нормальному закону, поэтому для выявления значимых различий между параметрами исследуемых клеточных популяций в ПК и микроокружении опухоли, цитотоксической активности лимфоцитов ПК на разных этапах терапии, а также между уровнем различных цитокинов сыворотки крови использовался критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Влияние уровня цитокинов на популяционный состав иммунных клеток оценивали с помощью дисперсионного анализа. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Оценку предиктивной ценности иммунологических параметров эффективности ИТТ осуществляли с помощью ROC-анализа. Решающее правило для оценки эффективности назначаемой ИТТ составлено с помощью формулы Байеса. Описательная статистика представлена в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q1;Q3), для результатов частотного анализа данные приведены в виде частот. Указывались статистически значимые различия на уровне значимости $p < 0,05$. Данные с тенденцией к статистически значимым событиям ($p < 0,1$) также обсуждались. Для построения графиков использовался программный пакет GraphPad Prism (версия 9.4.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-морфологические особенности и отдаленные результаты ИТТ у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ. В рамках многоцентрового неинтервенционного наблюдательного исследования в реальной клинической практике были оценены непосредственные и отдаленные результаты ИТТ у больных с прогрессирующим

MSS/pMMR РЭ при сроке наблюдения 45 месяцев. Оценка непосредственной эффективности показала, что полный ответ не был достигнут ни у одной больной, частичный ответ наблюдался у 23,3 % пациенток, стабилизация была отмечена у 18,3 % пациенток, прогрессирование наблюдалось у 58,4 % больных. Оценка отдаленных результатов ИТТ выявила, что двухлетняя ОВ составила $45,25 \pm 9,09$ %, двухлетняя ВБП $29,69 \pm 7,05$ %. При сроке наблюдения 45 месяцев мВБП была равна 12,6 месяцев (рисунок 2).



Рисунок 2 – График кумулятивной безрецидивной выживаемости у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при проведении ИТТ

Полученные данные соотносятся с результатами исследования KEYNOTE 309, где при сроке наблюдения 42 месяца мВБП составила чуть более 12 месяцев (Makker V., 2023).

При анализе ВБП в группе пациенток, у которых данное событие наступило ранее 12,6 месяцев, была выявлена мВБП, равная 4,05 месяцам. В группе пациенток, переживших 12,6 месяцев без прогрессирования мВБП не была достигнута ($p = 0,00000$). Следовательно, если при проведении ИТТ прогрессирование не наступит в срок ранее 12,6 месяцев, то вероятность дальнейшего прогрессирования значительно снижается. На основании данного факта ИТТ считалась эффективной если больные переживали 12,6 месяцев без прогрессирования, а неэффективной – если прогрессирование было в срок до 12,6 месяцев.

С использованием Log-Rank метода был проведен анализ влияния клинико-морфологических особенностей пациенток на эффективность ИТТ. На основании проведенного исследования были выявлены клинико-морфологические параметры, ассоциированные с длительностью ВБП при проведении ИТТ: степень дифференцировки опухоли ($p = 0,04$), наличие очагов прогрессирования ($p = 0,09$) и метастазы в головной мозг ($p = 0,02$).

Сравнительная характеристика иммунологических параметров у больных РЭ, неотягощенных прогрессированием и противорецидивной терапией, и больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭЮ. Поскольку из экспериментальных исследований известно, что терапевтические эффекты как пембролизумаба, так и леватиниба связаны с модуляцией иммунологических механизмов, таких как восстановление цитотоксичности CD8⁺Т-лимфоцитов в отношении опухолевых клеток (Kato, Y., 2019), изменение субпопуляционной структуры пула лимфоцитов (Chen, W., 2021), блокирование ангиогенной активности опухолиассоциированных макрофагов, угнетение Т-регуляторных клеток (Kudo,

М., 2019), то важным явилось изучение сопряженности иммунологических параметров, отражающих данные механизмы, с эффективностью ИТТ. Также хорошо известно, что опухолевая прогрессия и проводимое противоопухолевое лечение и, в частности, цитостатические агенты, оказывают выраженное воздействие на иммунную систему (Hong, W., 2022), что может определить эффективность дальнейших терапевтических стратегий, основанных на иммунологических механизмах (Sharma, A., 2024).

В проведенном исследовании выявлено, что больные с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ, получившие несколько линий химиотерапии, характеризуются значимым снижением $\text{VEGFR}^+\text{CD14}^+\text{CD16}^-$ моноцитов классической субпопуляции (рисунок 3А), предшественников М1-макрофагов, которые пополняют популяцию цитотоксических ОАМ, способных элиминировать опухоль (Italiani, P., 2014), по сравнению с больными РЭ, неотягощенными прогрессирующим и противорецидивной терапией.

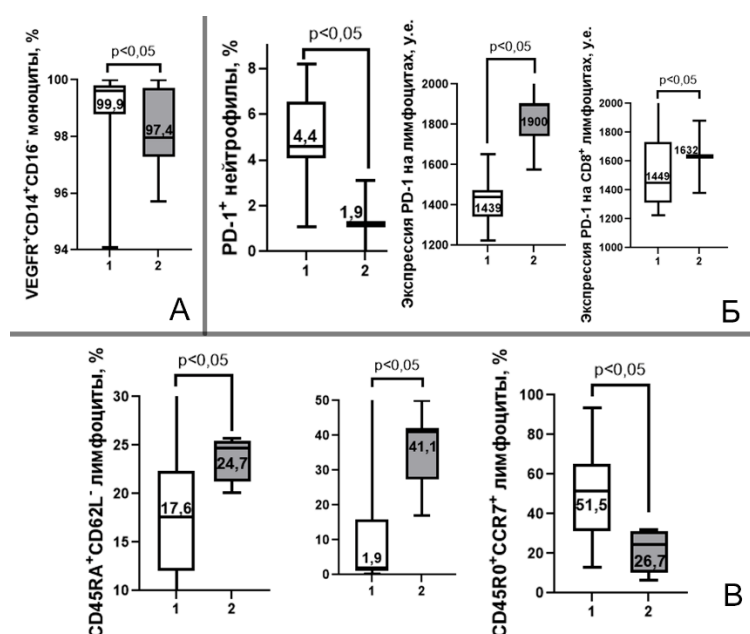


Рисунок 3 – Отличия иммунологических показателей у больных РЭ: 1 – не отягощенных прогрессирующим и противорецидивной терапией (n=38); 2 – с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ (n=9); А – показатели, связанные с экспрессией VEGFR на клетках ПК; Б – показатели, связанные с экспрессией PD-1 на клетках ПК; В – показатели, связанные с дифференцировкой лимфоцитов

В сравнении с больными РЭ, не отягощенных прогрессирующим и противорецидивной терапией, у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ отмечено увеличение экспрессии PD-1 на поверхности лимфоцитов в общем пуле и на CD8^+ лимфоцитах, что определяет их как мишени для атаки PD-L^+ опухолевыми клетками, вызывающими анергию или апоптоз иммунных клеток (рисунок 3Б) (Robert C., 2020).

Кроме того, у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ наблюдалось увеличение количества терминально дифференцированных эффекторов с фенотипами $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^-$ и $\text{CD45RA}^+\text{CD27}^-\text{CD28}^-$ (их рассматривают как конечный этап развития лимфоцитов (Kudryavtsev I.V., 2018), при одновременном снижении $\text{CD45RO}^+\text{CCR7}^+$ клеток центральной памяти, определяющих возможность быстрой индукции иммунного ответа, по сравнению с больными с РЭ, не отягощенными прогрессирующим и проведением

противорецидивного лечения, что, вероятно, является неблагоприятным фактором противоопухолевой защиты (рисунок 3В).

Влияние ИТТ на иммунологические показатели у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ. Выполненное нами исследование показало, что проведение ИТТ ассоциировано с изменениями иммунологических показателей, отражающих потенциальные механизмы терапевтического действия пембролизумаба и ленватиниба. При этом данные изменения имеют противоположную направленность, чем отмеченная динамика при прогрессировании MSS/pMMR РЭ.

Под влиянием ИТТ возрастало число $\text{VEGFR}^+\text{CD14}^+\text{CD16}^-$ моноцитов классической субпопуляции и увеличивалась экспрессия VEGFR на поверхности клеток данного пула, тогда как число VEGFR на $\text{CD14}^-\text{CD16}^+$ моноцитах неклассической субпопуляции снижалось (рисунок 4А). Эти данные детализируют известную негативную роль VEGFR^+ моноцитов в опухолевой прогрессии. Данная популяция моноцитов, превращаясь *in situ* в ОАМ, содействует ангиогенезу в опухоли (Lin, E.Y., 2014). Одной из молекулярных мишеней ленватиниба является тирозинкиназа рецептора сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGFR (Lorusso, D., 2023). Через ингибицию взаимодействия VEGF/VEGFR ленватиниб способен блокировать опухолестимулирующее влияние VEGFR^+ макрофагов (Kudo, M., 2019). Однако полученные данные говорят о возможном селективном действии ленватиниба на моноциты определенного функционального профиля: препарат оказывает угнетающее влияние на $\text{CD14}^-\text{CD16}^+$ моноциты и стимулирует $\text{CD14}^+\text{CD16}^-$ моноциты (рисунок 4А). При этом субпопуляция классических моноцитов является ресурсом провоспалительных М1-макрофагов с цитотоксическим потенциалом, что может способствовать элиминации опухолевых клеток.

При проведении ИТТ отмечено уменьшение количества PD-1^+ лимфоцитов, в том числе, и $\text{PD-1}^+\text{CD8}^+$ лимфоцитов (рисунок 4Б), что обусловлено связыванием данной молекулы с моноклональным антителом – пембролизумабом. Клиническое значение этого феномена заключается в том, что при проведении ИТТ снижается доля лимфоцитов, потенциально подверженных воздействию молекулы PD-L, экспрессируемой опухолевыми клетками или ОАМ, что, вероятно, связано с отменой иммуносупрессирующего влияния опухоли и с увеличением цитотоксического действия лимфоцитов, отражаемого в показателях эффективности ИТТ.

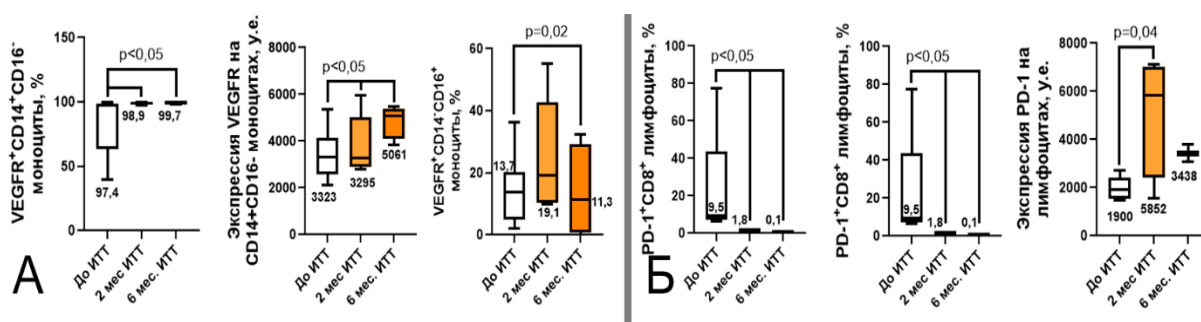


Рисунок 4 – Динамика иммунологических показателей в ходе проводимой ИТТ: А – показатели, связанные с экспрессией VEGFR на поверхности клеток ПК; Б – показатели, связанные с экспрессией PD-1 на поверхности клеток ПК

Примечание: до ИТТ n=9; 2 мес. ИТТ n=7; 6 мес. ИТТ n=6

Связь состояния иммунной системы с эффективностью проводимой ИТТ у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ. Важным аспектом проведенного исследования было сравнение динамики иммунологических показателей, связанных с механизмами действия ИТТ, у пациенток с РЭ в зависимости от эффективности лечения.

Изменения иммунологических показателей при проведении ИТТ у пациенток с длительностью ответа менее 12,6 месяцев затронули лишь популяцию моноцитов. К моменту прогрессирования отмечено возрастание числа $\text{VEGFR}^+\text{CD14}^-\text{CD16}^-$ клеток моноцитарного гейта и экспрессии VEGFR как на $\text{CD14}^-\text{CD16}^-$ клетках, так и на $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ моноцитах промежуточной популяции (рисунок 5). Эти результаты находятся в соответствии с представлением о негативном вкладе VEGFR^+ клеток моноцитарно-макрофагального ряда в патогенез опухолевого роста (Qian, B.Z., 2010). Проводимое лечение не оказало особого воздействия на негативный вектор событий. Снижение количества $\text{CD14}^-\text{CD16}^-$ клеток моноцитарного гейта, вероятно, указывает на увеличенную поляризацию пула моноцитов в ПК при продолжающемся прогрессировании MSS/pMMR РЭ (рисунок 5).

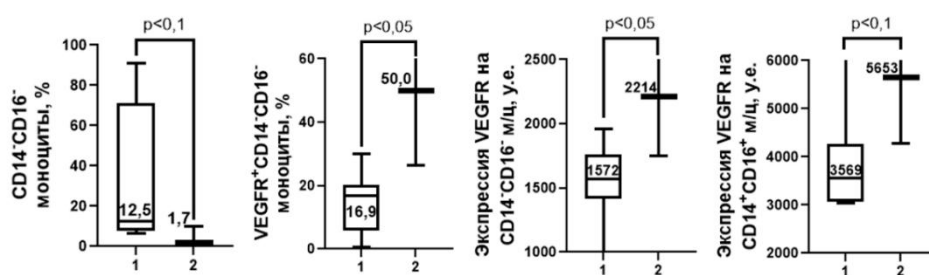


Рисунок 5 – Динамика иммунологических показателей у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при неэффективной ИТТ (длительность ответа 12,6 месяцев и менее): 1 – до начала ИТТ (n = 9); 2 – момент прогрессирования (n = 4)

Для пациенток с эффективной ИТТ характерна иная динамика показателей. Увеличение экспрессии CD14 на моноцитах (рисунок 6А), увеличение количества $\text{VEGFR}^+\text{CD14}^+\text{CD16}^-$ моноцитов классической субпопуляции и снижение экспрессии VEGFR на поверхности $\text{CD14}^-\text{CD16}^+$ моноцитов промежуточной субпопуляции у больных РЭ (рисунок 6А), снижение доли PD-1^+ лимфоцитов и $\text{PD-1}^+\text{CD8}^+$ лимфоцитов (рисунок 6В). Поскольку такая динамика показателей связана с длительным ответом на лечение, то ее следует рассматривать как маркер эффективности ИТТ.

Кроме того, выявлено снижение количества коммитированных $\text{PD-1}^+\text{CD45R0}^+$ лимфоцитов и увеличение $\text{PD-1}^+\text{CD45RA}^+\text{CD45R0}^-$ наивных лимфоцитов (рисунок 6В). Такая динамика может говорить о том, что действие пембролизумаба направлено на функционально зрелые эффекторы.

Значимое увеличение количества $\text{CD8}^+\text{CD69}^+$ активированных лимфоцитов и увеличение $\text{CCR7}^+\text{CD45R0}^+$ коммитированных лимфоцитов свидетельствует об индукции иммунного ответа, так как лимфоциты коммитированы антигеном и способны к миграции в лимфоидные органы для дальнейшей дифференцировки и взаимодействия с мишенью (рисунок 6Б) (Kudryavtsev I.V., 2018).

В целом, оценивая динамику исследованных показателей у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при проведении терапии пембролизумабом в комбинации с леватинибом, следует отметить, что эффективная ИТТ приводит к тому, что ряд

параметров (количество $\text{VEGFR}^+\text{CD14}^+\text{CD16}^-$ моноцитов, количество PD-1^+ нейтрофилов, экспрессия PD-1 на лимфоцитах, количество $\text{CD45RA}^+\text{CD27}^-\text{CD28}^-$ наивных лимфоцитов) приближаются к значениям у больных с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противорецидивной терапией.

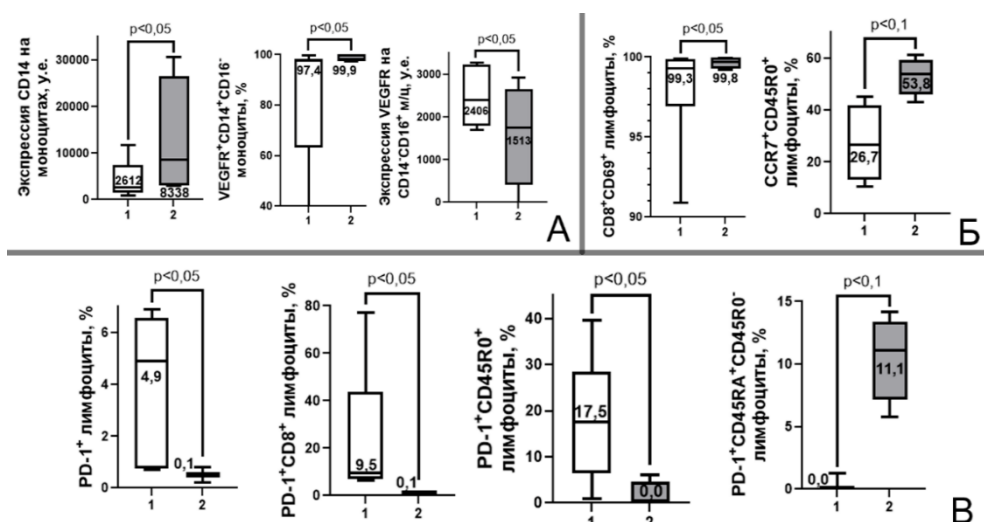


Рисунок 6 – Динамика иммунологических показателей у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при проведении эффективной ИТТ (длительность ответа более 12,6 месяцев): 1 – до начала ИТТ (n=9); 2 – момент последнего наблюдения (n=7); А – показатели, связанные с моноцитами и экспрессией на них VEGFR; Б – показатели, связанные с активацией и дифференцировкой лимфоцитов ПК; В – показатели, связанные с экспрессией PD-1 на клетках ПК

По-видимому, эффективная ИТТ восстанавливает морфофункциональное состояние иммунной системы до статуса, обеспечивающего противоопухолевую защиту, компенсируя неблагоприятное влияние опухолевой прогрессии и цитостатического лечения. На основании отмеченного феномена становится обоснованной возможность применения ИТТ у больных с MSS/pMMR РЭ на более ранних этапах опухолевой прогрессии, что подтверждается клиническими рекомендациями NCCN за 2025 год. Это предположение также подтверждается полученными результатами многоцентрового клинического исследования, показавшего преимущество использования ИТТ в первой линии противорецидивной терапии по сравнению с ХТ (Makker, V., 2023).

Цитотоксический потенциал лимфоцитов ПК в отношении опухолевых клеток-мишеней in vitro при проведении ИТТ. Одним из главных механизмов элиминации опухоли является разрушение ее клеток с помощью цитотоксических лимфоцитов, мигрирующих в ткань из циркуляции. Применение анти-PD-1 иммунотаргетных препаратов способно восстанавливать противоопухолевую активность истощенных цитотоксических $\text{CD8}^+\text{T}$ -лимфоцитов (Raskov, H., 2021).

Исследование in vitro цитотоксической активности лимфоцитов ПК, полученных у больных с прогрессирующим РЭ на различных этапах ИТТ, по отношению к клеткам, выделенным из опухолевой ткани эндометрия, показало, что на начальных этапах ИТТ сопровождалась снижением индекса цитотоксичности лимфоцитов в 1,53 раза. Однако к 6-ти месяцам терапии индекс цитотоксичности возрастал на 183 % ($p < 0,05$) относительно сниженного уровня и приближался к значениям больных РЭ, не отягощенных

прогрессированием и противоопухолевым лечением (рисунок 7), что, вероятно, обеспечивало элиминацию опухолевых клеток.

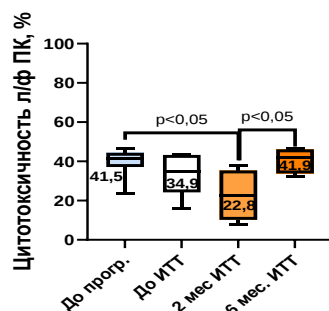


Рисунок 7 – Изменение цитотоксического индекса лимфоцитов ПК по отношению к клеткам РЭ в динамике, проводимой ИТТ

Примечание: до прогр. n=16, до ИТТ n=9, 2 мес. ИТТ n=7, 6 мес. ИТТ n=6

Влияние ИТТ на содержание цитокинов в ПК у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ. Одним из важнейших факторов регуляции иммунной системы, несомненно, являются цитокины (Rahman T., 2023). Содержание цитокинов в циркулирующей крови представляет собой интегральный показатель общей продукции данных молекул всеми продуцентами, к которым относятся не только клетки иммунной системы, но и эндотелиальные клетки, эпителиальные, фибробласты, различные мезенхимальные стромальные клетки, а также опухолевые клетки (Zhang J.M., 2007). На основании этого нами было проведено исследование влияния проводимой ИТТ на изменение уровня цитокинов.

Проведение ИТТ в течение первых 6 месяцев не приводило к выраженному изменению содержания исследуемых цитокинов в сыворотке крови у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ, однако более длительное применение ИТТ сопровождалось значительным снижением уровня как провоспалительных цитокинов IL-6 (способствующего инвазии и распространению РЭ (Che Q., 2019) и IL-8, так и цитокина с противовоспалительной активностью IL-10 (рисунок 8). Длительное применение ИТТ ассоциировано с терапевтическим ответом на данный вид лечения и, следовательно, угнетением опухолевого роста. Вероятно, отмеченное нами снижение содержания цитокинов в циркуляции на фоне длительного применения ИТТ свидетельствует об отмене регуляторного системного влияния опухоли.

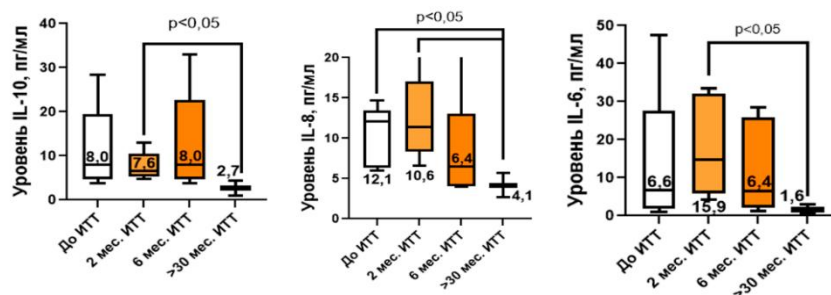


Рисунок 8 – Изменение уровня цитокинов у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при проведении ИТТ.

Примечание: до ИТТ n=9; 2 мес. ИТТ n=7; 6 мес. ИТТ n=6; >30 мес. ИТТ n=4

Динамика содержания цитокинов в ПК у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в зависимости от эффективности ИТТ. Эффективное применение ИТТ у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ оказалось ассоциировано с изменением концентраций ряда цитокинов в сыворотке крови. Так, у пациенток с длительностью ответа на ИТТ более 12,6 месяцев уровень провоспалительного цитокина IL-8, играющего важную роль в прогрессировании РЭ (Ciortea R., 2014), на уровне тенденции снижался более чем в 2 раза при проведении лечения по сравнению с показателем до начала терапии, в то время как у больных с прогрессированием на фоне применения пембролизумаба в комбинации с ленватинибом в течение 6 месяцев данный показатель оставался на том же уровне, что и до начала ИТТ. Эффективная ИТТ у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ приводила к статистически значимому увеличению в 2 раза содержания MCP-1 в сравнении с соответствующим показателем при неэффективной терапии. Данный факт, вероятно, указывает на снижение воспаления, индуцированного опухолью, при эффективном лечении. Известно, что MCP-1 – основной хемоаттрактант клеток моноцитарно-макрофагального ряда и определяет их миграцию в ткани, в том числе и в опухоль (Singh S., 2021). Связь более высокого уровня MCP-1 с эффективной ИТТ, по-видимому, свидетельствует о привлечении в опухоль моноцитов и макрофагов, обладающих цитотоксической активностью.

Таким образом, эффективность ИТТ у больных РЭ связана с ответом иммунной системы на проводимое лечение.

Связь содержания цитокинов в ПК со структурой иммунологических показателей у больных MSS/pMMR РЭ. Поскольку цитокины регулируют функциональный статус клеток иммунной системы, то изменение их содержания в циркуляции сопровождается изменениями в структуре клеток, связанных с молекулярно-клеточными механизмами действия ИТТ.

С помощью дисперсионного анализа было проведено исследование связи содержания цитокинов в ПК и структуры изучаемых иммунологических показателей. С этой целью каждая из исследовательских групп пациенток была разделена на 2 подгруппы с низким ($<Me$) и высоким ($\geq Me$) содержанием биологического фактора.

У больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ увеличение в сыворотке крови содержания провоспалительного цитокина системного действия IL-6 было связано со снижением экспрессии молекулы CD14, рецептора к сосудисто-эндотелиальному фактору роста VEGFR, на поверхности моноцитов, а также с уменьшением числа ко-рецептора антиген-распознающего рецептора CD8 на клеточной мембране лимфоцитов и с более низким числом активированных $CD69^+CD8^+$ лимфоцитов (рисунок 9).

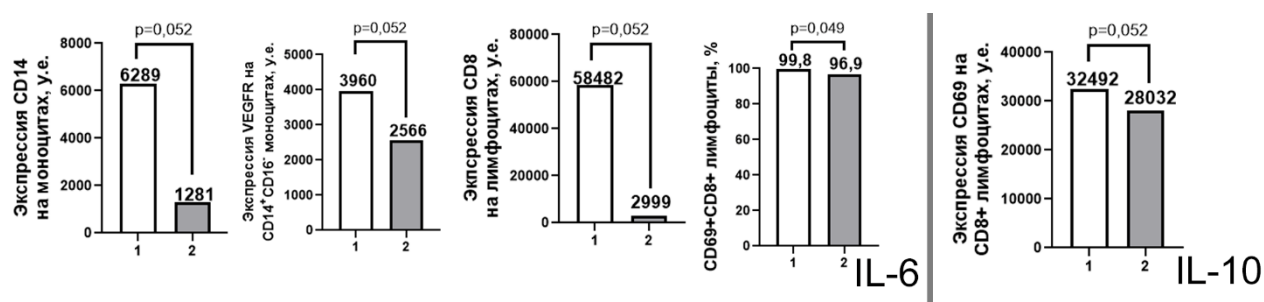


Рисунок 9 – Сопряженность уровня цитокинов и дисперсии иммунологических показателей у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ. 1 – содержание цитокина $<Me$, 2 – содержание цитокина $>Me$

Увеличение содержания провоспалительного цитокина IL-10 сопровождалось снижением экспрессии маркера активации CD69 на поверхности цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов, это говорит о снижении способности CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов к активации и дальнейшей элиминации опухоли, что также характерно для неэффективной ИТТ.

Связь иммунологических показателей в циркуляции, в опухоли и в неизменной ткани у больных РЭ. Поскольку микроокружение опухоли является важным фактором патогенеза злокачественного роста, то нам представилось важным изучить связь клеточных популяций опухолевой и неизменной ткани эндометрия с таковыми в ПК в контексте взаимного влияния, для чего нами был проведен корреляционный анализ.

Положительная корреляция была выявлена между долей CD8⁺ Т-лимфоцитов в крови и долей CD8⁺CD69⁺ активированных клеток в опухоли ($r = 0,489$, $p < 0,05$). Это позволяет предположить, что циркулирующие цитотоксические клетки участвуют в инфильтрации опухолевого микроокружения и проходят активацию *in situ*.

Оценка предиктивной ценности иммунологических параметров как маркеров эффективности ИТТ у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ. В предыдущих разделах нами была показана связь с эффективностью ИТТ таких параметров, как количество CD8⁺CD69⁺ лимфоцитов, VEGFR⁺CD14⁺CD16⁻ моноцитов, PD-1⁺ лимфоцитов, PD-1⁺CD8⁺ лимфоцитов, PD-1⁺CD45R0⁺ лимфоцитов, экспрессия молекулы CD14 на моноцитах и экспрессия VEGFR на CD14⁺CD16⁺ моноцитах. С целью оценки их предиктивной ценности был осуществлен ROC-анализ. Выявлено, что доля активированных цитотоксических CD8⁺CD69⁺ лимфоцитов ниже 99,5 % от общего числа CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов в ПК является маркером эффективной ИТТ у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ до начала данного вида терапии ($p = 0,038$, площадь под кривой 0,89, 95 % ДИ 0,68-1,00, рисунок 10).

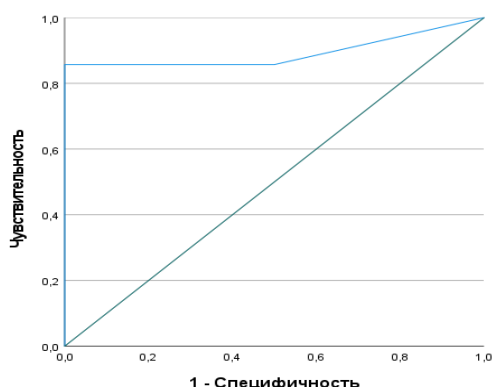


Рисунок 10 – ROC-анализ значимости количества CD8⁺CD69⁺ лимфоцитов в ПК в качестве предиктора эффективности ИТТ у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ

Решающее правило для прогноза эффективности иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ. На основании полученных результатов нами было разработано решающее правило для прогнозирования назначения ИТТ больным с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия (таблица 2). Решающее правило включает как иммунологические, так и клиничко-морфологические параметры.

Таблица 2 – Решающее правило для прогноза эффективности иммунотаргетной терапии у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия

Признаки	Наличие	Диагностический коэффициент	Информативность
Степень дифференцировки G1-G2	Да	7,26	4,40
	Нет	-6,28	
Единичные очаги прогрессирования вне зависимости от локализации	Да	4,77	1,55
	Нет	-3,01	
Метастазы в головной мозг	Да	-3,97	0,90
	Нет	2,04	
Уровень CD8 ⁺ CD69 ⁺ лимфоцитов < 99,5% от общего числа CD8 ⁺ лимфоцитов в ПК	Да	4,77	1,55
	Нет	-3,01	

Для принятия решения о назначении ИТТ у больных с прогрессирующим РЭ следует рассматривать не только стандартные критерии назначения (MSS/pMMR микросателлитный статус опухоли), но и дополнительные. При сумме баллов “+13” с 95 % долей вероятности можно прогнозировать длительность ВБП при применении ИТТ более 12,6 месяцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что терапия пембролизумабом в комбинации с ленватинибом является эффективной терапевтической опцией у больных MSS/pMMR РЭ, предлеченных по поводу рецидивов. Выявленные изменения в состоянии иммунной системы у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ определяют длительность ответа на лечение. Выявленные дополнительные клиничко-морфологические и иммунологические параметры: степень дифференцировки опухоли, наличие очагов прогрессирования, метастазы в головной мозг и уровень CD8⁺CD69⁺ активированных лимфоцитов от общего количества CD8⁺ лимфоцитов в ПК, ассоциированы с эффективностью комбинированной терапии пембролизумабом и ленватинибом. Полученные данные могут служить основой для персонализированного подхода к назначению ИТТ больным прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия в дополнение к стандартным показаниям.

ВЫВОДЫ

1. Объективный ответ у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при проведении ИТТ составил 41,6 %, в том числе частичный ответ наблюдался в 23,3 % случаев, стабилизация процесса в 18,3 %. Двухлетняя ВБП составила $29,69 \pm 7,05$ %, ОВ $45,25 \pm 9,09$ %. При сроке наблюдения 45 месяцев мВБП составила 12,6 месяцев.
2. Иммунотаргетная терапия модулирует иммунологические показатели, ассоциированные с молекулярно-клеточными механизмами действия пембролизумаба и ленватиниба. Отмечено снижение количества PD-1⁺ клеток в общем пуле лимфоцитов и PD-1⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов при проведении лечения ($p < 0,05$), а также избирательное угнетающее влияние терапии на экспрессию VEGFR в неклассической популяции моноцитов по сравнению с уровнем до начала ИТТ ($p = 0,02$).
3. У пациентов с эффективной иммунотаргетной терапией состояние иммунной системы приближается к больным РЭ, неотягощенным прогрессированием и противоопухолевым

лечением, что проявляется в увеличении цитотоксической активности лимфоцитов, в возрастании количества $CD8^+CD69^+$ активированных лимфоцитов, количества $VEGFR^+CD14^+CD16^-$ моноцитов классической субпопуляции, а также увеличении экспрессии молекулы CD14 на моноцитах при снижении количества $PD-1^+$ лимфоцитов, $PD-1^+CD8^+$ лимфоцитов, коммитированных $PD-1^+CD45RO^+$ лимфоцитов и экспрессии VEGFR на $CD14^+CD16^+$ моноцитах неклассической субпопуляции относительно соответствующих параметров на начальных этапах ИТТ ($p < 0,05$).

4. Неэффективная ИТТ у больных РЭ сопровождается увеличением числа $VEGFR^+CD14^-CD16^-$ клеток моноцитарного гейта в 2,65 раза ($p < 0,05$), а также возрастанием экспрессии данного рецептора на клетках данной субпопуляции в 1,41 раза ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующими показателями до начала ИТТ.
5. Длительное проведение ИТТ (более 30 месяцев) у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ сопровождается снижением уровня как провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8, так и цитокина с противовоспалительной активностью IL-10 ($p < 0,05$) относительно показателей до начала ИТТ. ИТТ с ВБП более 12,6 месяцев у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ ассоциирована с увеличением в 2 раза содержания MCP-1 в сравнении с соответствующим показателем при неэффективной терапии ($p < 0,05$).
6. Значения иммунологических показателей, ассоциированных с механизмами терапевтических эффектов пембролизумаба и ленватиниба, находятся в функциональной связи с цитокиновым профилем пациентки и субпопуляционным составом иммунновоспалительного компонента опухоли эндометрия.
7. Решающее правило для прогнозирования эффективности иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия включает: степень дифференцировки опухоли G1-G2 ($p = 0,04$), единичные очаги прогрессирования вне зависимости от локализации ($p = 0,01$), метастазы в головной мозг ($p = 0,02$) и количество $CD69^+CD8^+$ лимфоцитов менее 99,5 % от общей доли $CD8^+$ цитотоксических лимфоцитов периферической крови ($p = 0,038$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для прогнозирования эффективности ИТТ у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия целесообразно использовать разработанное решающее правило, включающее клинико-морфологические и иммунологические параметры. При сумме баллов “+13” с 95 % долей вероятности можно прогнозировать длительность ВБП более 12,6 месяцев.

В динамике, проводимой иммунотаргетной терапии следует отслеживать увеличение содержания цитокина MCP-1 в сыворотке крови, количества $CD8^+CD69^+$ активированных лимфоцитов, моноцитов классической субпопуляции, экспрессии рецептора CD14 на моноцитах, а также снижение экспрессии VEGFR на моноцитах неклассической субпопуляции и рецептора PD-1 на лимфоцитах, цитотоксических лимфоцитах и коммитированных лимфоцитах в ПК, которые ассоциированы с длительным ответом на лечение. Неэффективная терапия пембролизумабом в комбинации с ленватинибом связана с увеличением количества $VEGFR^+CD14^-CD16^-$ клеток моноцитарного гейта в процессе лечения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВБП – выживаемость без прогрессирования
 ИТТ – иммунотаргетная терапия
 ОАМ – опухолеассоциированные макрофаги
 ОВ – общая выживаемость
 ПК – периферическая кровь
 РЭ – рак эндометрия
 dMMR – дефицит системы репарации неспаренных оснований
 IL – интерлейкин
 MCP-1 – моноцитарный хемотаксический протеин-1
 MSI-H – высокая микросателлитная нестабильность
 MSS – стабильный микросателлитный статус
 PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели
 pMMR – профицит системы репарации неспаренных оснований
 VEGFR – рецептор к фактору роста эндотелия сосудов

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Коломиец Л. А. Клинико-морфологические особенности у пациенток с прогрессирующим раком эндометрия, получивших иммунотаргетную терапию [текст] / Л. А. Коломиец, М. Н. Стахеева, О. Н. Чуруксаева, **Н. А. Ермак**, [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2023. – Т. 19 – № 2. – С. 109-118.
2. Tashireva L. A. Predicting immunotherapy efficacy in endometrial cancer: focus on the tumor microenvironment [текст] / L. A. Tashireva, I. V. Larionova, **N. A. Ermak**, [et. al.] // Front. Immunol. – 2025. – Vol. (15). – P. 1523518.
3. Стахеева М. Н. Влияние иммунотаргетной терапии на показатели иммунной системы у больных раком эндометрия [текст] / М. Н. Стахеева, **Н. А. Ермак**, А. А. Мальцева, [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2025. – Т. 24. – № 2. – С. 56-67.
4. Коломиец Л. А. Отдаленные результаты иммунотаргетной терапии в лечении рецидивирующего рака эндометрия [текст] / Л. А. Коломиец, М. Н. Стахеева, А. А. Мальцева, **Н. А. Ермак**, [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2025. – Т. 21. – № 3. – С. 112-120.
5. Ермак Н. А. Иммунотаргетная терапия меняет взаимосвязи между эффекторами иммунной системы у больных прогрессирующим раком эндометрия [текст] / **Н. А. Ермак**, А. А. Мальцева, А. А. Радибова, [и др.] // Генетические технологии в трансляционной биомедицине: материалы II международной конференции. – Томск, 2023. – С. 17.
6. Ливанос Е. И. Взаимосвязь клеточных популяций периферической крови и ткани (опухоль и неизменная ткань) у больных первичным раком эндометрия до начала противоопухолевой терапии [текст] / Е. И. Ливанос, **Н. А. Ермак**, М. Н. Стахеева // Материалы IX молодежной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 15-18 октября 2024 года. – Санкт-Петербург, 2024. – С.32-33.