

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

д.м.н. Стахеева Марина Николаевна

д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ

Коломиец Лариса Александровна

Томск — 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Проблема рака эндометрия в современной онкологии	16
1.2 Место терапии ингибиторами контрольных точек в современной онкологии	18
1.3 Ингибиторы контрольных точек в терапии рака эндометрия	22
1.4 Иммунологические механизмы реализации терапевтических эффектов пембролизумаба и леватиниба	25
1.5 Возможность использования иммунологических показателей в качестве критериев для назначения пембролизумаба и леватиниба	28
1.6 Генетические мутации при РЭ и их связь с эффективностью ИКТ	30
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1 Характеристика клинического материала	34
2.2 Методы и схемы лекарственного лечения больных раком эндометрия ...	40
2.3 Описание методов исследования	41
2.3.1 Определение MSI статуса опухоли	41
2.3.2 Оценка фенотипических особенностей моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов периферической крови	41
2.3.3 Оценка фенотипических особенностей моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов в опухолевом микроокружении	44
2.3.4 Исследование цитотоксической активности лимфоцитов, выделенных из периферической крови	45
2.3.5 Оценка содержания цитокинов в сыворотке периферической крови	47
2.3.6 Изучение генетических мутаций ткани опухоли	48
2.3.7 Статистическая обработка данных	49
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
3.1 Клинико-морфологические особенности и отдаленные результаты иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия	51

3.2 Сравнительная характеристика иммунологических параметров у больных раком эндометрия, неотягощенных прогрессированием и противорецидивной терапией, и больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия.....	57
3.3 Влияние иммунотаргетной терапии на иммунологические показатели у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия.....	59
3.4 Связь состояния иммунной системы с эффективностью проводимой иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия.....	61
3.5 Сравнение структуры иммунологических показателей у больных с различной эффективностью иммунотаргетной терапии на этапах лечения и у пациенток с раком эндометрия, неотягощенных прогрессированием и противорецидивной терапией.....	66
3.6 Цитотоксический потенциал лимфоцитов периферической крови в отношении опухолевых клеток-мишеней <i>in vitro</i> при проведении иммунотаргетной терапии.....	68
3.7 Влияние опухолевой прогрессии и противоопухолевой терапии на содержание цитокинов в циркуляции.....	69
3.8 Влияние иммунотаргетной терапии на содержание цитокинов в периферической крови у больных прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия.....	71
3.9 Динамика содержания цитокинов в периферической крови у больных прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия в зависимости от эффективности иммунотаргетной терапии.....	71
3.10 Связь содержания цитокинов в периферической крови со структурой иммунологических показателей у больных MSS/pMMR раком эндометрия.....	73
3.11 Связь иммунологических показателей в циркуляции, в опухоли и в неизменной ткани у больных раком эндометрия.....	78

3.12 Связь частоты соматических мутаций генов, вовлеченных в патогенез рака эндометрия, в опухоли с эффективностью иммунотаргетной терапии у больных MSS/pMMR раком эндометрия	83
3.13 Связь наличия соматических мутаций генов, вовлеченных в патогенез рака эндометрия, в опухоли с изучаемыми иммунологическими показателями in situ у больных раком эндометрия	85
3.14 Оценка предиктивной ценности иммунологических параметров как маркеров эффективности иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия.....	87
3.15 Решающее правило для прогноза эффективности иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия	88
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
ВЫВОДЫ.....	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	114
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	115
ПРИЛОЖЕНИЕ А	127

ВВЕДЕНИЕ

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 [1].

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 [2]. 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 [3]. 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 [4]. При этом, в группе больных MSS/pMMR РЭ (стабильный статус опухоли), составляющих 70 % от всех больных РЭ [5], частота объективных ответов на пембролизумаб составила лишь 11,2 % [6], 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 [7]). 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 % [4]. 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 [8].

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 [9], вариабельность Т-клеточного рецептора при раке легкого [10], инфильтрация резидентными тканевыми Т-клетками памяти эпителия опухоли для различных локализаций [11] 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 [12]. 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-а [13] и увеличивать уровень IL-10 [14]. Другим важным фактором являются биологические свойства опухоли [11]. Мутагенез, высокий уровень которого характерен для злокачественных клеток, изменяет биологические свойства опухоли, а вместе с этим и опухолевое микроокружение. Так, в исследовании Chen, S. 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 [15].

Также в литературе отсутствуют данные об ассоциации клинικο-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.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время в клинике принят лишь один критерий для назначения ИТТ больным с прогрессированием РЭ является статус высокой микросателлитной нестабильности [8]. Также существуют данные о факторах, предсказывающих эффективность применения ИТТ, но они ограничиваются показателями локального иммунитета, а именно особенностями субпопуляционной структуры опухолевого микроокружения [12].

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

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 ленватинибом, 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 клинико-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, неотягощенных 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 клинικο-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, неотягощенным 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 клинικο-морфологические характеристики и иммунологические параметры.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала оценку непосредственных и отдаленных результатов ИТТ, ассоциативных связей клинικο-морфологических характеристик, а также фенотипических и

функциональных показателей клеток моноцитарного, лимфоцитарного и нейтрофильного ряда клеток периферической крови у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в динамике проводимой ИТТ с длительностью ВБП, с параметрами, регулируемыми 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 периферической крови у больных РЭ был исследован методом иммуноферментного анализа. Цитотоксичность лимфоцитов, выделенных из периферической крови 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.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Проблема рака эндометрия в современной онкологии

Рак эндометрия - злокачественная опухоль, исходящая из слизистой оболочки тела матки (эндометрия). Выделяют два основных патогенетических типа РЭ: Опухоли I типа встречаются чаще, менее злокачественны и имеют более благоприятный прогноз, свойственны молодому возрасту и развиваются на фоне продолжительной гиперэстрогении и эндометриальной гиперплазии; часто сопровождаются такими сопутствующими явлениями, как ожирение, сахарный диабет и гипертоническая болезнь. Опухоли II типа имеют большую степень злокачественности и менее благоприятный прогноз, возникают у женщин старшего возраста, в условиях отсутствия гиперэстрогении, на фоне атрофии эндометрия [16].

В настоящее время выделяют следующие молекулярные подтипы РЭ, согласно предложенной TCGA классификации [17]:

1. Подтип мутированной полимеразы ДНК эпсилон (POLEmut);
2. Подтип дефектной системы репарации неспаренных оснований (dMMR);
3. Подтип без специфического молекулярного профиля (NSMP);
4. Подтип мутации белка p53 (p53abn).

РЭ является одной из значимых проблем здравоохранения во всем мире. По данным World Cancer Research Fund international на 2020 год, рак эндометрия является шестым по частоте раком у женщин и пятнадцатым по частоте среди всех раков. В 2022 году было зафиксировано 420368 новых случаев рака эндометрия и число погибших составляло 97723 по всему миру, Россия находится на 4 месте по числу новых случаев РЭ, которые составляют

6756 [18]. В России по состоянию на 2023 год рак тела матки является третьим по частоте (8 %) раком среди женского населения [1]. Согласно статистике, заболеваемость раком тела матки по Томской области за 2023 год - 225 случаев, что составляет порядка 7 % от всех случаев онкологических заболеваний женщин по Томской области [1].

Отмечается непрерывный рост заболеваемости и распространенности рака эндометрия, а также смертности от него, что, вероятно, ассоциировано с увеличением воздействия эндогенных и экзогенных эстрогенов, связанных с факторами риска, включая ожирение, диабет и удлинение продолжительности жизни [19]. Приблизительно 75 % случаев РЭ диагностируется на I стадии, где хирургическое лечение является одним из основных видов лечения [20].

Однако, основной причиной смертности РЭ, как и других злокачественных новообразований, является прогрессирование заболевания. Риск рецидива традиционно определяется на основании гистологического типа, стадии по классификации FIGO и таких патологических критериев, как глубина инвазии миометрия и лимфоваскулярная инвазия при эндометриоидном гистологическом типе [21]. С расширением использования методов молекулярной генетики некоторые молекулярные профили были идентифицированы как факторы особенно высокого риска рецидива (например, мутация или избыточная экспрессия p53) или как факторы низкого риска (например, мутация POLE) [22, 23]. У пациенток с промежуточным риском частота рецидивов составляет от 15 до 25 %, при этом у пациенток с высоким риском вероятность рецидива в течение 5-летнего периода составляет 40-60 % [24, 25].

Женщины с прогрессирующим РЭ обычно подвергаются облучению в сочетании со стандартной химиотерапией первой линии – комбинацией карбоплатина и паклитаксела. Для пациенток с рецидивом заболевания после оперативного лечения и с метастатическим РЭ ответ на системную терапию комбинацией карбоплатина и паклитаксела достигается в 40-62 %, а

длительность ожидаемой общей выживаемости составляет от 13 до 29 месяцев [2].

Лечение на ранних стадиях заболевания происходит достаточно успешно. Так, показатель 5-летней выживаемости при I-ой стадии достигает 96 %, при II-ой колеблется в диапазоне 80-90 %. Однако, при метастатическом процессе этот показатель снижается до 20-25 %. Но, к сожалению, у половины пациенток наблюдается прогрессирование заболевания в течение первого года. Применение химиотерапевтических схем во второй линии не показало своей эффективности [26].

В настоящее время отсутствует консенсус в отношении наиболее подходящих методов лечения для 2-й и 3-й линии терапии. В дополнение к риску токсичности активность химиотерапевтических агентов для 2-й линии и более является скромной, и ограниченные данные показывают, что РЭ может быть резистентным к стандартным агентам, таким как доцетаксел [27]. Пациентки, у которых наблюдаются рецидивы в течение 6 месяцев после химиотерапии 1-й линии, скорее всего, не будут иметь ответ на терапию 2-й линии; данная резистентность похожа на платинорезистентность, наблюдаемую при раке яичников [26]. Таким образом, остается неудовлетворенной важная медицинская потребность в лечении пациенток с прогрессирующим РЭ [28].

1.2 Место терапии ингибиторами контрольных точек в современной онкологии

В последнее время в практику онкологов, наряду с уже классическими методами противоопухолевой терапии, такими как химиотерапия, хирургическое лечение, цитостатическая терапия, лучевая и таргетная терапия, вошла иммунотерапия, которая представляет собой вид лечения злокачественных опухолей посредством повышения эффективности врожденного и адаптивного ответа иммунной системы на опухоль.

Достигается данный эффект за счет применения препаратов или средств, повышающих или восстанавливающих способность иммунной системы к распознаванию и элиминации опухолевых клеток вне зависимости от локализации опухолевого процесса [29].

Важную роль в реализации противоопухолевой защиты играет Т-клеточный иммунный ответ, который начинается с распознавания рецепторами наивных Т-лимфоцитов опухолевых антигенов, которые им презентируют дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты совместно с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса [30]. Связывание антигена и антиген-распознающего рецептора Т-лимфоцитов (TCR) приводит к активации Т-клеток и клональной экспансии антиген-специфических Т-лимфоцитов, в том числе цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), которые уничтожают клетки опухоли, экспрессирующие данный антиген [31].

Важным событием для реализации функционального потенциала цитотоксических Т-лимфоцитов является взаимодействие ко-стимулирующих и ко-ингибирующих молекул с соответствующими лигандами. К наиболее важным ко-стимулирующим молекулам относят CD28 и его лиганды CD80/CD86, а к ко-ингибирующим - CTLA-4, PD-1 и его лиганды PD-L1/PD-L2. В целом, группа ко-стимулирующих и ко-ингибирующих молекул, ответственных за продолжительность иммунного ответа, его силу и аутоотолерантность, получившая название контрольных точек иммунного ответа, гораздо обширнее. [32]. Различные молекулы - контрольные точки, связанные с супрессией иммунного ответа, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Контрольные точки, связанные с угнетением иммунного ответа и препараты, блокирующие их активность

Молекула, ингибирующая иммунный ответ	Клетка-носитель	Препараты - блокаторы	Источник
PD-1	Цитотоксические Т-лимфоциты, В-клетки, клетки миелоидного ряда	Пембролизумаб, ниволумаб	[33]
PD-L1	Опухолевые клетки, опухоль инфильтрирующие лимфоциты, Т- и В-клетки, макрофаги, дендритные клетки	Атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб	[33]
PD-L2	Опухолевые клетки, активированные макрофаги и дендритные клетки	Нет	[34]
CTLA-4	Т-лимфоциты	Ипилимумаб, тремелиумаб	[35]
TIM-3	Опухолевые клетки, Т-лимфоциты	Нет	[36]
LAG-3	Опухолевые клетки, регуляторные Т-клетки и CD8 ⁺ Т-клетки в состоянии анергии	Релатлимаб	[37]
VISTA	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, наивные CD4 ⁺ и регуляторные FoxP3 ⁺ Т-клетки, опухолевые клетки	Нет	[38]
BTLA	Т-, В- и NK- клетки	Тифцемалимаб (икатолимаб)	[39]
2B4	NK-клетки, моноциты, базофилы, CD8 ⁺ Т-клетки	Нет	[40]

Основными критериями для назначения ИКТ терапии выступают высокая мутационная нагрузка опухоли и PD/PD-L-положительный статус опухолевых клеток. При этом существуют определенные критерии применения ингибиторов контрольных точек иммунного ответа для больных с различными локализациями опухолевого процесса.

Экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках и клетках опухолевого микроокружения является доказанным биомаркером эффективности терапии ИКТ для опухолей разных локализаций, например, при немелкоклеточном раке легких, меланоме, раке мочевого пузыря и раке шейки матки [41], но достоверным этот критерий в случае рака эндометрия назвать нельзя. Результаты терапии ИКТ для больных раком эндометрия с разным уровнем экспрессии PD-L1 различаются, и до сих пор нет единого мнения о стандартизованном подходе к использованию этого показателя как критерия назначения эффективной терапии [42].

Еще одним важным маркером является мутационная нагрузка опухоли, которая представляет собой количество мутаций в одном кодирующем регионе генома опухоли [43]. При малигнизации клеточные процессы, отвечающие за сохранность генома, прекращаются, что приводит к накоплению мутаций. [44]. В некоторых исследованиях показана эффективность препаратов ИКТ у больных прогрессирующим немелкоклеточным раком легкого с одновременно высокой экспрессией PD-L1 и мутационной нагрузкой опухоли [45].

Именно с разработкой и внедрением в онкологическую практику препаратов ИКТ – моноклональных антител, блокирующих ко-ингибирующие молекулы, связан прорыв в терапии злокачественных новообразований в последнее десятилетие [46]. Применение ИКТ приводит к уменьшению негативной иммуномодуляции, вызванной опухолевыми клетками и Treg за счет PD-1/PD-L1 и CTLA-4/B7-1, B7-2 сигнальных путей, что сопровождается восстановлением противоопухолевой активности Т-клеток [47].

1.3 Ингибиторы контрольных точек в терапии рака эндометрия

В 2017 году FDA одобрило применение пембролизумаба (анти PD-1) в качестве терапии второй линии у больных с MSI-H/dMMR солидными опухолями, устойчивыми к другим видам лечения. [48]. В частности, терапия пембролизумабом нашла применение у пациенток с прогрессирующим раком эндометрия при статусе высокой микросателлитной нестабильности [49].

Более того, в 2022 году пембролизумаб был одобрен конкретно для лечения пациенток с прогрессирующим РЭ [50].

Терапия пембролизумабом обычно проводится по следующей схеме: 200 мг внутривенно капельно каждые 3 недели (при наличии MSI-H/dMMR в опухоли) [16].

Пембролизумаб стал первым препаратом с механизмом действия ИКТ, клиническая активность которого была исследована при РЭ. По данным клинического испытания NCT01876511, полный ответ на терапию развился в 20 % случаев и частичный ответ отмечен у 33 % пациенток, общая 2-летняя выживаемость составила 53 % [49]. Также в исследовании NCT02465060 применения ниволумаба (анти-PD-1) для лечения злокачественных новообразований различных локализаций было показано, что у 53 % пациенток с аденокарциномой эндометрия наблюдалось уменьшение размера опухоли. [51].

Частота объективных ответов и медиана безрецидивной выживаемости у пациенток с прогрессирующим РЭ с MSI-H/dMMR при применении пембролизумаба (кейтруды) достигла 57,1 (42,2 - 71,2) % и 25,7 (4,9 - не достигнута) месяцев, [4], в то время, как в группе больных РЭ, не подвергнутых стратификации по признаку MSI-H или dMMR (составляющих подавляющее большинство), частота объективных ответов составила лишь 11,2 (5,9 - 18,8) % [5].

Ещё одним потенциальным путём терапии РЭ является блокирование лиганда PD-L1. В 2017 г. проводилось исследование NCT01375842, в

котором пациенткам с РЭ назначали атезолизумаб (анти-PD-L1), объективный ответ на терапию был достигнут у 40 % пациенток с высокой экспрессией PD-L1 ($> 5\%$) [52].

Константинополус и соавторы (2019) в клиническом исследовании авелумаба (анти - PD-L1) NCT02912572 установили, что частота объективных ответов на терапию у пациенток с рецидивирующим РЭ, характеризующихся нарушениями в системе репарации нуклеотидов в опухоли (dMMR - статус), составила 26,7 % [53].

Ещё один ингибитор PD-L1 дурвулумаб показал эффективность у пациенток с прогрессирующим РЭ со статусом микросателлитной нестабильности (ANZGOG1601). Объективный ответ был достигнут у 47 % пациенток [54].

Рассматривается и использование таких ИКТ, как анти-CTLA-4, но пока информация об их применении ограничена. В сравнительном исследовании эффективности монотерапии дурвулумабом и комбинации дурвулумаба с тремелиумабом у пациенток с распространенным РЭ (NCT03015129) была выявлена умеренная клиническая активность в обеих группах. Объективный ответ на монотерапию дурвулумабом был отмечен у 14 % пациенток (из которых MSS – 75 % и MSI-H – 25 %) и 6-месячная безрецидивная выживаемость составила 13,3 %; объективный ответ на комбинацию был отмечен у 10 % пациенток (из которых MSS – 66 % и MSI-H – 33 %) и 6-месячная безрецидивная выживаемость составила 18,5 % [55]. Было начато исследование эффективности комбинации ипилимумаба и ниволумаба у пациенток с метастатическим РЭ с dMMR (NCT02982486), но в настоящее время результаты не опубликованы.

Известно, что пациентки с РЭ, характеризующиеся MSI-H/dMMR, составляют лишь 30 % от общего числа больных с данной локализацией [56]. Значительное большинство составляют больные со стабильным статусом MSS/pMMR. Для них применение препаратов ИКТ имеет специфические особенности [57].

В марте 2019 г. В. Маккер с соавторами опубликовали промежуточный анализ фазы II исследования NCT03015129, в котором представлены данные об эффективности применения комбинации пембролизумаба и мультикиназного ингибитора ленватиниба при прогрессирующем РЭ: частота объективных ответов составила 39,6 %, медиана безрецидивной выживаемости 7,7 месяцев. Интересно, что объективный ответ был достигнут у 35,6 % пациенток с MSS-статусом, и уменьшение размера опухоли наблюдалось у 80 % MSS-пациенток. Полученные результаты привели к одобрению FDA применения комбинации пембролизумаба с ленватинибом у пациенток с прогрессирующим РЭ, характеризующихся MSS-статусом [58].

У пациенток с MSS статусом, в отличие от пациенток с MSI-H и dMMR, снижена мутационная нагрузка, в результате чего продукция пептидных неоантигенов у таких пациенток ниже, так что у них не происходит инициация $CD3^+$ и $CD8^+$ клеточного ответа [59]. И поскольку основными мишенями при применении ИКТ являются цитотоксические $CD8^+$ Т-лимфоциты, то при их малом количестве терапия ингибиторами контрольных точек является малоэффективной. Соответственно, для увеличения эффективности лечения больных раком эндометрия с MSS статусом опухоли необходимо создать условия, в которых пембролизумаб лучше сможет реализовать свои терапевтические эффекты. Достижение данного результата оказалось возможным при комбинированном применении пембролизумаба с мультикиназным ингибитором - ленватинибом.

Ленватиниб - пероральный низкомолекулярный ингибитор рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), фактора роста фибробластов (FGFR), фактора роста тромбоцитов альфа ($PDGFR\alpha$), протоонкогенов *RET* и *KIT* [60]. У него отмечены антиангиогенная и антипролиферативная активность.

Если частота объективных ответов пембролизумаба в монорежиме для пациенток с MSS составляет лишь 11,2 % [5], то его комбинация с ленватинибом увеличивает частоту объективных ответов до 38,3 % [4].

1.4 Иммунологические механизмы реализации терапевтических эффектов пембролизумаба и ленватиниба

Понимание механизмов действия ИТТ крайне важно для поиска критериев эффективности данной терапии для больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия.

В настоящее время, для рака эндометрия принятыми критериями назначения пембролизумаба являются морфологически подтвержденный диагноз рака эндометрия и MSI-H/dMMR (MicroSatellite Instability - High – высокая микросателлитная нестабильность; deficient Mismatch Repair – дефицит системы репарации) статус опухоли [8]. Мутационные события, связанные с dMMR, происходящие в кодирующих областях, приводят к сдвигу рамки считывания и появлению высокого уровня неоантигенов [61]. Обилие и “чужеродность” этих пептидных неоантигенов в раках с dMMR, которые могут быть презентированы с молекулами главного комплекса гистосовместимости HLA опухолевых клеток и в дальнейшем быть распознаны Т-клетками, объясняют выраженный CD3⁺ и CD8⁺ Т-клеточный ответ, который является предиктором ответа на терапию ингибиторами контрольных точек [62]. Для раков с dMMR типичным является фенотип высокой микросателлитной нестабильности опухолевых клеток и, как было сказано ранее, высокая мутационная нагрузка [62].

Установлено, что у больных РЭ с мутацией POLE (ген, кодирующий ДНК-полимеразу ϵ , которая отвечает за репликацию нити ДНК) и MSI статусом уровень мутационной нагрузки особенно высок [63]. Данный факт обуславливает эффективность применения препаратов ИКТ [64]. Однако, возникновение мутаций, инактивирующих презентацию антигенов, может снизить вероятность индукции иммунного ответа и, соответственно, приведёт к неэффективности терапии ИКТ [65].

Клетки опухолей различных локализаций, в том числе рака эндометрия, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы и немелкоклеточного

рака легкого способны экспрессировать на своей поверхности рецептор PD-1, который, связываясь с PD-L1 на поверхности Т-эффекторов, обеспечивает уклонение опухоли от элиминации. Основным механизмом действия пембролизумаба заключается в блокировании PD-1 и, тем самым, восстановлении противоопухолевой активности эффекторов. При этом, гиперэкспрессия PD-1 на опухолевых клетках, с одной стороны, связана с уменьшением пролиферативного потенциала опухолевых клеток и предотвращает взаимодействие опухолевых клеток с PD⁺ клетками иммунной системы, защищая последние от супрессии клеток иммунной системы. Однако, с другой стороны, наличие молекул PD-1 на опухолевых клетках способно снизить эффективность применения ИКТ, так как связывает их вместо мишеней на Т-лимфоцитах. Интересно следующее наблюдение: при условии слабого иммунного ответа или недостаточной активации (восстановления) функции Т-клеток при применении ИКТ и/или относительно увеличенной экспрессии PD-1/PD-L1 на опухолевых клетках данная терапия (ИКТ) может стимулировать опухолевый рост и подавить противоопухолевый иммунитет, что приводит к гиперпрогрессированию. Баланс между активацией Т-клеток и динамикой роста опухоли при PD-1/PD-L1 блокаде является критическим фактором для клинического результата ИКТ [66].

Ленватиниб, помимо известной анти-тирозинкиназной активности, обладает иммуномодулирующими свойствами и способен увеличивать инфильтрацию опухоли CD8⁺ Т-клетками, экспрессирующими гранзим В и IFN- γ , плазмцитоподобными дендритными клетками и уменьшать количество опухолеассоциированных макрофагов [67].

Важным звеном иммунной системы, которое связано с реализацией терапевтических ответов на ИТТ являются клетки памяти.

Как известно, Т-клетки памяти делятся на несколько субпопуляций, наибольший интерес из которых представляют субпопуляции Т-клеток центральной и эффекторной памяти. Т-клетки центральной памяти, имеющие

фенотип $CD45RA^-CD45RO^+CD62L^+CCR7^+CD27^+CD28^+$, прошли антиген-зависимую дифференцировку во вторичных лимфоидных органах [68]. Именно данную популяцию рассматривают как наиболее долгоживущую из Т-лимфоцитов, они могут находиться в циркуляции до 10 лет [69, 70]. При этом, $CD4^+$ Т-клетки центральной памяти в зависимости от спектра воздействующих цитокинов способны дифференцироваться как в сторону Th1-, так и Th2-клеток, а также они могут являться предшественниками фолликулярных Т-хелперов [71]. $CD8^+$ Т-клетки центральной памяти в присутствии IL-7 и IL-15 формируют популяции эффекторных клеток. Т-клетки эффекторной памяти с фенотипом $CD45RA^-CD45RO^+CD62L^-CCR7^-$ вследствие утраты на своей поверхности молекул CD62L и CCR7 не способны проникать в периферические лимфоидные органы. Но клетки данной популяции экспрессируют большое число других адгезионных молекул и хемокиновых рецепторов, отвечающих за миграцию в определенные органы и ткани [72].

Клоны Т-клеток памяти, инициированные на этапе первичной опухоли и сохраняющиеся в организме в течение болезни, способны давать начало антиген-специфичным клонам цитотоксических Т-лимфоцитов, однако, реализация противоопухолевой функции иммунной системы в условиях злокачественного роста в значительной мере блокирована посредством многочисленных механизмов ускользания опухоли [73]. Подобное угнетение функциональной активности характерно и для цитотоксических Т-лимфоцитов вплоть до приобретения ими статуса истощенных Т-лимфоцитов. Экспрессия иммуноингибиторных молекул в популяции истощенных Т-лимфоцитов, в частности, PD-1, определяет их как основную мишень для протекторного действия пембролизумаба, который, взаимодействуя с PD-рецептором лимфоцитов, защищает их от супрессорного действия PD-L+опухолевых клеток или PD-L+антигенпрезентирующих клеток опухолевого микроокружения [74]. С другой стороны, показано, что признаки истощения появляются на стадии

предшественников и затем распространяются на антиген-специфичные популяции, т.е. затрагивают популяции Т-клеток памяти [75].

В эксперименте показано наличие резидентных тканевых Т-клеток памяти в желудочно-кишечном тракте, в нервной ткани, в кожных покровах [76, 77, 78]. Эпителий опухоли в отличие от стромы характеризуется наиболее значительным обогащением $CD8^+CD103^+$ Trm. Клетки Trm (особенно $CD49a^+$) могут быть мощными киллерами для клеток опухоли [79], а $CD8^+$ Trm также секретируют $IFN\gamma$ – цитокин, ассоциированный с благоприятным прогнозом для пациенток с раком [80].

Таким образом популяционное разнообразие Т-клеток памяти определяет функциональность противоопухолевой активности Т-клеток и является основой для проведения эффективной терапии пембролизумабом в комбинации с ленватинибом у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ.

В настоящее время литературные данные о возможных иммунологических механизмах, лежащих в основе терапевтического действия иммунотаргетных препаратов, или иммунологических показателях, ассоциированных с эффективностью данной терапии, разрознены и касаются различных, не связанных между собой звеньев иммунной системы.

1.5 Возможность использования иммунологических показателей в качестве критериев для назначения пембролизумаба и ленватиниба

Логичным выглядит поиск критериев стратификации пациенток, основанный на ключевых механизмах действия данных препаратов, с использованием разнообразных передовых технологий, в том числе анализа транскриптома опухолевых клеток и клеток иммунной системы, иммуногистохимии опухоли [81, 82], а также при проведении сравнительного анализа вовлечения различных иммунологических механизмов, ассоциированных с реализацией терапевтических эффектов как пембролизумаба, так и ленватиниба.

Показано, что периферические наивные $CD8^+$ Т-клетки могут служить прогностическим биомаркером эффективности ответа на комбинированную терапию первой линии леватинибом и анти-PD-1 антителами у пациенток с распространенной гепатоцеллюлярной карциномой. Пациентки, у которых уровень $CD8^+$ наивных Т-лимфоцитов был менее 6,24 %, были определены как группа потенциального ответа на терапию, в то время как те, у кого уровень $CD8^+$ наивных Т-клеток был более 6,24 %, были обозначены как группа не ответивших на терапию [9].

Также, цитотоксические $CD8^+$ лимфоциты в опухолевом микроокружении является ключевым компонентом противоопухолевого иммунного ответа, поскольку они распознают и элиминируют опухолевые клетки, что делает их перспективным объектом для изучения связи их уровня с эффективностью ИТТ. Ещё одним немаловажным фактором эффективности ИТТ является и уровень $CD4^+$ Т-клеток в опухолевом микроокружении эндометрия, поскольку они организуют иммунный ответ за счет активации других иммунных клеток и продукции цитокинов [83].

В работе Matsumoto S. & Suzuki R. была показана прогностическая ценность вариабельности антиген-распознающего рецептора Т-лимфоцитов для предсказания ответа на ИКТ при раке легкого [10].

Инфильтрация эпителия опухоли T_{trm} коррелирует с более высокой общей выживаемостью у больных раком молочной железы, раком лёгкого, раком мочевого пузыря, раком шейки матки, а также аденокарциномой эндометрия [11].

Поскольку на данный момент литературные сведения о том, какие иммунологические параметры могут быть использованы в качестве критериев назначения ИТТ ограничены, то выявление связи иммунологических параметров, отражающих функциональность различных звеньев иммунной системы с эффективностью иммунотаргетной терапии явится основой для дальнейших исследований детальных механизмов

терапевтического действия данных препаратов и определения новых критериев стратификации больных для назначения ранней терапии.

1.6 Генетические мутации при РЭ и их связь с эффективностью ИКТ

Поскольку микросателлитная нестабильность является одним из основных критериев выбора схемы лечения у пациенток с прогрессирующим РЭ [84], то немаловажным будет рассмотреть влияние наличия соматических мутаций на эффективность проводимой терапии у таких пациенток.

Исследования Jiang et al. привели к стратификации РЭ на четыре генетических подтипа, каждый из которых имеет свои прогностические последствия: *POLE* mut (10 %), характеризующийся высоким уровнем мутаций в эписом ДНК-полимеразе; MSI-high (20 %), свидетельствующий о микросателлитной нестабильности; *TP53* wt (52 %), представляющий собой дикий тип p53; и *TP53* mut (18 %), обозначающий мутации в гене TP53 [85].

Подтип *POLE* mut ассоциируется с повышенной экспрессией Т-эффекторов и интерферонов (IFN), что свидетельствует о повышенном иммунном ответе. Этот подтип также демонстрирует сниженную сигнатуру врожденной резистентности к анти-PD-1 терапии, что делает его потенциально более восприимчивым к иммунотерапии [85].

Подтип *TP53* wt, наоборот, демонстрирует противоположный иммунологический профиль, с более низкой экспрессией Т-эффекторов и IFN, что может отражать врожденную резистентность к ингибиторам иммунных контрольных точек. Эта дихотомия подчеркивает важность молекулярного профилирования для прогнозирования терапевтического ответа [85].

Расширяя эту генетическую концепцию, недавние исследования выявили молекулярные подтипы РЭ, основанные на сигнатурах генов иммунной супрессии. Эти сигнатуры включают в себя пути, вовлеченные в истощение Т-клеток, функцию регуляторных Т-клеток (Treg), активность

миелоидных супрессорных клеток (MDSC), сигнальный путь трансформирующего фактора роста-бета (TGF- β) и сигнальный путь интерферона-гамма (IFN- γ). В результате этого анализа были выделены четыре иммунных подтипа: иммуноактивированный подтип, отличающийся активной экспрессией маркеров иммунных клеток и молекул контрольных точек, что свидетельствует о сильной противоопухолевой иммунной среде; иммунодефицитный подтип, характеризующийся скудной экспрессией иммунных генов и ассоциирующийся с худшими клиническими исходами; подтип с преобладанием IFN- γ , характеризующийся выраженной экспрессией генов, управляющих сигналом IFN- γ , ключевым медиатором иммунного ответа; подтип с преобладанием TGF- β , определяемый повышенной экспрессией генов, участвующих в передаче сигнала TGF- β , пути, известного своей ролью в модуляции иммунитета. [86].

Эти результаты освещают сложное взаимодействие между генетическими альтерациями и иммунной системой при РЭ, предлагая более глубокое понимание, которое может стать основой для персонализированных терапевтических стратегий.

KRAS является самым распространенным мутантным онкогеном. Множественные патогенные вариации гена *KRAS* описаны с точки зрения механизмов их влияния на пути развития опухоли. Исследование прогностической и терапевтической ценности различных альтераций данного гена, на данный момент, дало противоречивые результаты [87], так что оправданным является дальнейшее изучение влияния мутаций данного гена на опухоли разных локализаций, в том числе РЭ, однако существуют ограничения в случае РЭ связанные с малыми размерами выборок и геномными корреляциями.

Появляется все больше доказательств свидетельствующих о влиянии мутаций *KRAS* на иммунный ответ, в частности они способствуют ускользанию опухоли от иммунного ответа, общему подавлению ресурсов

иммунной системы и снижению эффективности анти PD-1 терапии [88, 89, 90].

В исследовании, посвященном изучению влияния различных вариаций *KRAS* на механизмы прогрессирования рака эндометрия и эффективность терапии, Karolina A. с соавторами установили, что действительно мутация *KRAS* часто встречается у пациенток с РЭ и есть определенная корреляция наличия мутаций в данном гене с возможными предикторными маркерами ответа на ИТТ, такими как статус высокой микросателлитной нестабильности и высокая мутационная нагрузка опухоли. Они выдвигают предположение о большем терапевтическом потенциале использования ИТТ в комбинации с таргетными препаратами, ингибирующими *KRAS*, и подчеркивают важность дальнейших исследований мутаций данного гена с точки зрения его влияния на эффективность ИТТ [91].

Ген *PIK3CA* кодирует белок p110 α , каталитическую субъединицу фосфатидилинозитол-3-киназы, ключевого фермента PI3K сигнального пути. Именно этот сигнальный путь является одним из самых часто мутированных при эпителиальных опухолях, наибольшая частота aberrаций встречается при РЭ [92]. Данный путь важен для регуляции пролиферации и апоптоза, а его дисрегуляция ассоциирована с канцерогенезом [92], что обуславливает его ценность как терапевтической мишени, которая может быть использована в комбинации с другими вариантами противоопухолевой терапии при РЭ [93, 94].

Общая частота мутаций *PIK3CA* при РЭ колеблется в пределах 12-39 % по данным секвенирования по Сенгеру [95, 96, 97] и 50 % по результатам секвенирования следующего поколения [98]. Мутации *PIK3CA* группируются в горячих точках, и при РЭ 80 % мутаций расположены в экзоне 9 и экзоне 20 [99].

Большинство мутаций *PIK3CA* приводят к конститутивно-активированному PI3K-пути, однако интересно, что в литературе имеются противоречивые данные о влиянии мутаций *PIK3CA* на выживаемость

пациенток при разных видах рака [100, 101]. Также и в отношении РЭ результаты исследований противоречивы и свидетельствуют о том, что мутации *PIK3CA* оказывают благоприятное [102], неблагоприятное [103] или нейтральное влияние на выживаемость пациенток [104].

Понимание роли мутаций *PIK3CA* в отношении клинической выживаемости при раке эндометрия необходимо для дальнейшей разработки селективных ингибиторов p110a, клинических испытаний и новых терапевтических подходов [94].

Дальнейшее изучение генетических мутаций и их связи с эффективностью ИТТ может стать основной для раннего прогноза ответа на данную терапию исходя из генетического профиля опухоли.

Заключение. Сведения, содержащиеся в современной литературе, свидетельствуют о важном вкладе иммунной системы как в патогенез рака эндометрия, так и в осуществление противоопухолевой защиты, которая может быть улучшена за счет использования иммунотерапии. Однако отсутствуют литературные сведения об ассоциации клинικο-морфологических характеристик больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ с эффективностью ИТТ.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика клинического материала

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.

В исследование включались только пациентки со стабильным микросателлитный статусом опухоли, подписавшие информированное добровольное согласие, после одобрения локальным этическим комитетом по биомедицинской этике (протокол №28 от 23 декабря 2022 г.). Все пациентки с прогрессирующим РЭ получали ИТТ согласно зарегистрированной схеме: ленватиниб 20 мг ежедневно перорально и пембролизумаб 200 мг внутривенно 1 раз в 21 день. ИТТ прекращалась при установлении факта прогрессирования заболевания при обследовании. С использованием критериев оценки иммунологически связанного ответа при солидных опухолях (iRECIST) проводилась отслеживание факта прогрессирования каждые 8 недель. При прогрессировании в срок до 3 месяцев для исключения влияния иммуноопосредованных реакций на изменение размеров опухоли проводили повторное исследование 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 2.

Таблица 2 – 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 %)
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 практически у 70 % пациенток в анамнезе было обнаружено более 3-х прогрессирований, в связи с чем им была назначена системная лекарственная терапия. 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, больных разделили на две подгруппы: в I подгруппу были включены больные, у которых при проведении ИТТ были отмечены признаки прогрессирования заболевания в срок до 12,6 месяцев, 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. Клинико-морфологические параметры пациенток данной группы представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Клинико-морфологические параметры больных с впервые выявленным РЭ, включенных в исследование

Клинико-морфологические параметры	Пациентки с впервые выявленным РЭ, неотягощенные прогрессированием и противорецидивным лечением	Сравнение с одноименными параметрами больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ, Р
Количество	38	>0,05
Возраст	60,9 ± 21	>0,05
Стадия FIGO		
I	7 (18,4 %)	>0,05
II	19 (50,0 %)	<0,05
III	12 (31,6 %)	>0,05
IV	0 (0 %)	<0,05
Тип опухоли		
Эндометриоидная	35 (92,1 %)	>0,05
Другие гистотипы	3 (7,9 %)	>0,05
Степень дифференцировки опухоли		
G1	7 (18,5 %)	>0,05
G2	17 (44,7 %)	>0,05
G3	14 (36,8 %)	>0,05
Инвазия миометрия		
<1/2	6 (15,8 %)	>0,05
>1/2	28 (73,7 %)	>0,05

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

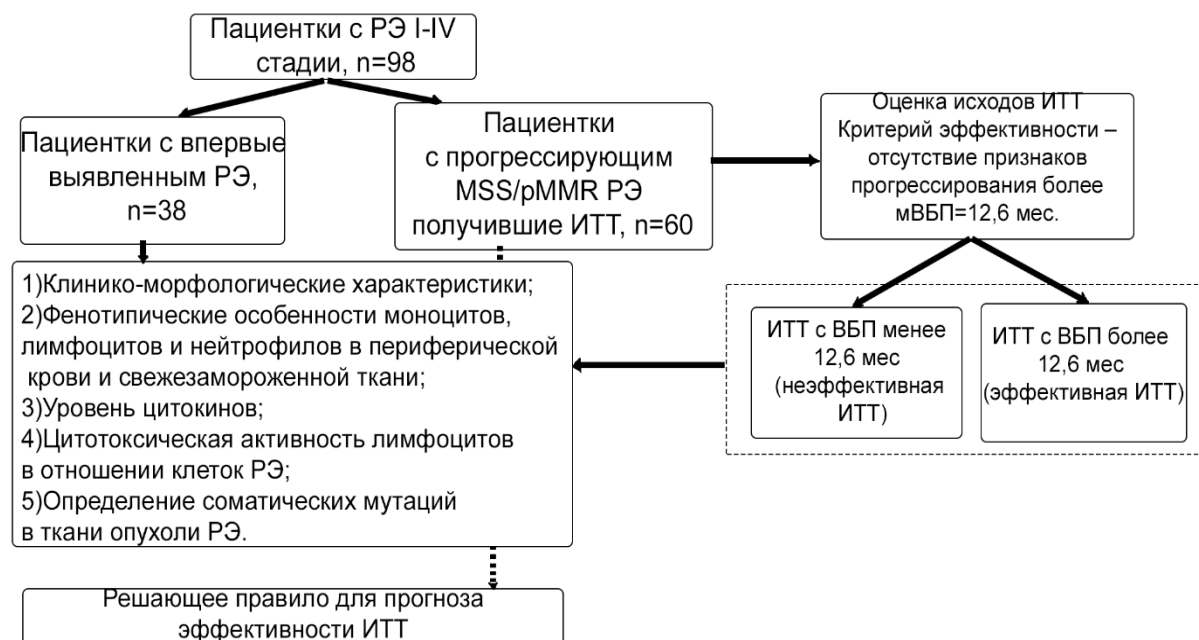


Рисунок 1 – дизайн исследования

Исследование моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов периферической крови (пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением (n = 38), и у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ до начала ИТТ (n = 9), спустя 2 месяца ИТТ (n = 7), 6 месяцев ИТТ (n = 6) и в момент прогрессирования заболевания n = 4) и клеточной суспензии, полученной из свежесзамороженной ткани эндометрия (у пациенток с впервые выявленным РЭ, n = 16), заключалось в изучении их субпопуляционной структуры на основе экспрессии маркеров методом проточной цитометрии.

Исследование цитотоксической активности лимфоцитов, выделенных из периферической крови пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением (n = 38), и прогрессирующим РЭ на разных этапах лечения (до ИТТ (n = 9), спустя 2 месяца ИТТ (n = 7), 6 месяцев ИТТ (n = 6), проводилось с использованием МТТ-теста на клеточной суспензии, выделенной из первичной ткани рака эндометрия.

Содержание цитокинов в сыворотке периферической крови пациенток с впервые выявленным РЭ (n = 38) и прогрессирующим MSS/pMMR РЭ на разных этапах лечения: до ИТТ (n = 9), спустя 2 месяца ИТТ (n = 7), 6 месяцев ИТТ (n = 6) и более 30 месяцев ИТТ (n = 4), проводилось методом ИФА.

Определение соматических мутаций генов *KRAS* и *PIK3CA* проводили на генетическом материале, выделенном из фиксированных в формалине парафинизированных образцов опухолевой ткани эндометрия пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением (n = 9), и прогрессирующим MSS/pMMR РЭ (n = 5), методами высокоразрешающего плавления ДНК и секвенирования по Сенгеру.

Критериями включения пациенток с прогрессирующим РЭ в исследование были:

1. Прогрессирующий РЭ на фоне проведенного лечения;
2. MSS/pMMR молекулярно-генетический статус;
3. Терапия ингибитором контрольных точек иммунной системы пембролизумабом в комбинации с ингибитором мультикиназ ленватинибом;
4. Общее удовлетворительное состояние по шкале ECOG>2;
5. Согласие пациента на участие в исследовании;
6. Возраст больных старше 18 лет.

Критериями исключения пациенток с прогрессирующим РЭ из исследования были:

1. MSI-H/dMMR молекулярно-генетический статус;
2. Общее удовлетворительное состояние по шкале ECOG>2;
3. Возраст больных младше 18 лет;
4. Тяжелые аутоиммунные заболевания;
5. Отказ от участия в исследовании.

2.2 Методы и схемы лекарственного лечения больных раком эндометрия

Все больные с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ до включения в исследование, получили хирургическое лечение в объеме: экстирпация матки с придатками и лимфодиссекция. В послеоперационном периоде, в зависимости от наличия неблагоприятных факторов прогноза, пациентки получили лучевую терапию (ДЛТ в дозе 40 Гр, 61,6 % пациенток) и химиотерапию (комбинацией карбоплатина и паклитаксела по схеме ТР, 6 курсов, 50 % пациенток).

При прогрессировании все больные с прогрессирующим РЭ получили противорецидивную терапию по схеме ТР в количестве 6 курсов. Количество рецидивов в данной группе наблюдалось от 1 до 3 раз. Учитывая, что у всех пациенток данной группы был определен молекулярно-генетический статус опухоли MSS/pMMR, при неэффективности химиотерапии, в качестве противорецидивного лечения им была назначена ИТТ: пембролизумаб (Биокад, Россия) в комбинации с ленватинибом (EISAI, Япония) по схеме: пембролизумаб 200 мг внутривенно 1 раз в 3 недели и ленватиниб 20 мг перорально 1 раз в сутки (ежедневно).

Эффективность терапии оценивали на основании отсутствия признаков прогрессирования по шкале iRECIST в двух точках, спустя 3 месяца от начала проведения терапии и спустя полгода.

Пациентки с впервые выявленным РЭ не были отягощены опухолевой прогрессией и противорецидивным лечением в момент включения их в исследование, но в дальнейшем проходили аналогичное конвенциональное противоопухолевое лечение.

2.3 Описание методов исследования

2.3.1 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).

2.3.2 Оценка фенотипических особенностей моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов периферической крови

Фенотипические особенности иммунологической структуры моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов периферической крови были изучены методом проточной цитометрии. Изученные в работе фенотипические маркеры представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Молекулярные фенотипические маркеры основных популяций, использованные в работе

Антиген	Конъюгированный флуорохром	Клон	Маркер	Производитель	Объем, мкл
CD45	APC-Cy7	2D1	Общий маркер лейкоцитов	BD, США	5
CD309	PE	89106	VEGFR2	BD, США	20
CD14	FITC	M5E2	Маркер моноцитов/макрофагов	BD, США	20
CD16	APC	3G8	Маркер моноцитов/макрофагов	BD, США	5
CD8	PE-Cy5	HI78a	Маркер лимфоцитов	BD, США	20
CD69	PE-Cy7	FN50	Маркер активации ЦТЛ	BD, США	5
CD197	FITC	G043H7	CCR7	Elabscience, Китай	5
CD45R0	PE	UCHL1	Маркер клеток памяти	Elabscience, Китай	5
CD45RA	PerCP	HI10U	Маркер наивных клеток	Elabscience, Китай	5
CD279	FITC	J116	PD-1	Elabscience, Китай	5
CD27	APC	O323	Рецептор к TNF	Elabscience, Китай	5
CD28	FITC	CD28.2	Ко-стимулирующая молекула Т-клеток	Elabscience, Китай	5
CD62L	APC	MEL-14	L-селектин	Elabscience, Китай	5

Антитела к антигенам, представленным в таблице 4, добавляли к образцам цельной крови (100 мкл) в объемах, соответствующих рекомендациям производителя, после чего инкубировали в течение 20 минут в темноте при комнатной температуре. Параллельно ставили неокрашенную пробу (негативный контроль). Эритроциты лизировали с помощью Lysing Solution (BD, США). Образцы инкубировали в течение 15 минут в темноте, после чего дважды отмывали с использованием раствора Cell Wash (BD, США). После отмывки к клеткам добавляли раствор BDFlow (BD, США) и

проводили анализ фенотипических особенностей исследуемых популяций на проточном цитометре BD FACSCantoII (BD, США). Для каждого образца набирали не менее 50 тыс. событий.

Данные визуализированы и проанализированы с использованием программы FACSDiva Version 6.1.3. Стратегия гейтирования заключалась в выделении из популяции $CD45^+$ лейкоцитов популяций моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов. Разделение на популяции моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов выполняли при использовании параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. В каждой популяции оценивали количество $PD1(CD279)^+$ клеток.

$CD45^+$ моноциты были разделены на субпопуляции $CD14^+CD16^-$ классических моноцитов, промежуточных $CD14^+CD16^+$ моноцитов и неклассических $CD14^-CD16^+$ моноцитов, в каждой из которых оценивали количество $CD309^+$ клеток и экспрессию данного маркера.

В популяции $CD45^+$ лимфоцитов последовательно выделяли $CD8^+$ лимфоциты и $CD8^+CD69^+$ лимфоциты. Также из гейта $CD45^+$ лимфоцитов последовательно были определены популяции $CD45RA^+CD45R0^-CD27^+CD28^+$ наивных лимфоцитов, $CD45RA^+CD45R0^-CCR7(CD197)^-$ терминально дифференцированных лимфоцитов, $CD45RA^-CD45R0^+CD62L^+$ клеток центральной памяти и $CD45RA^-CD45R0^+CD62L^-$ клеток эффекторной памяти. Дополнительно оценивали медиану флуоресценции (MFI) в популяции интереса, которая отражает плотность экспрессируемого маркера.

Оценку иммунологических показателей, ассоциированных с молекулярно-клеточными механизмами действия пембролизумаба и ленватиниба, проводили у пациенток I исследовательской группы на этапе постановки диагноза, у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ до начала ИТТ, через 2, 6 и более 30 месяцев после начала проведения ИТТ, а также при дальнейшем прогрессировании заболевания.

2.3.3 Оценка фенотипических особенностей моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов в опухолевом микроокружении

Фенотипическая структура моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов опухолевого микроокружения пациенток I исследовательской группы были изучены методом проточной цитометрии. Изученные в работе маркеры также представлены в таблице 4.

Для получения популяций интереса из опухолевой и неизменной тканей, полученных в ходе проведения операционного лечения пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, производилась механическая дезагрегация тканей с помощью системы Becton Dickinson Medimachine (BD, США). Образцы опухолевой и неизменной ткани эндометрия измельчали острыми инструментами для уменьшения процента поврежденных клеток с добавлением 1 мл раствора Cellwash (BD, США). Затем измельченные образцы помещались в одноразовые полиэтиленовые камеры **Medicon** (BD, США), содержащие неподвижные металлические экраны с гексагональными отверстиями, где вокруг каждого отверстия расположены 6 микролезвий для эффективного разрезания плотных и мягких тканей. Далее следовала непосредственно механическая дезагрегация тканей в системе **Becton Dickinson Medimachine** в течение 60 секунд. По истечении времени шприцем клеточная суспензия собиралась из камеры Medicon.

Полученные клеточные суспензии окрашивали моноклональными антителами, конъюгированными с флюорохромами. Окрашивание и гейтирование производили по протоколу окрашивания, описанному в разделе 2.3.2.

2.3.4 Исследование цитотоксической активности лимфоцитов, выделенных из периферической крови

Венозную кровь забирали в пробирки-вакутейнеры, обработанные КЗ ЭДТА, утром натощак в объеме 20 мл от каждого пациента. Кровь в соотношении 1:1 смешивали со средой для отмывки, состоявшей из среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), в которую предварительно были добавлены L-глутамин, пенициллин и стрептомицин (ПанЭко, Россия). Полученную смесь в количестве 30 мл наслаивали на 15 мл фиколла ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) (ПанЭко, Россия) и центрифугировали при 1600 оборотах в минуту без встряхивания в течение 30 минут при 22 °С. Затем полученное интерфазное кольцо, содержащее фракцию моноцитов и лимфоцитов, аккуратно собирали при помощи пастеровской пипетки и дважды отмывали средой для отмывки при 1200 об/мин в течение 10 минут при 4 °С. Отмытые моноклеарные клетки разводили в полной культуральной среде до концентрации 2×10^6 клеток/мл (среда DMEM, L-глутамин, пенициллин и стрептомицин, 10 % термически инактивированной фетальной сыворотки теленка (ПанЭко, Россия)).

Выделенные моноклеарные клетки в 1 мл полной культуральной среды помещали в лунку 24-луночного плоскодонного планшета для культивирования клеток (TPP, Швейцария) и инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при 37°C. Через 24 часа инкубации 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. Операционный материал измельчали скальпелем с добавлением 1 мл среды DMEM (ПанЭко, Россия), после чего проводили ферментативную дезагрегацию ткани с использованием 100 мкл аликвотированных ферментов коллагеназы и

гиалуронидазы (Stemcell, США). Пробирку Эппендорфа с тканью и ферментами инкубировали в течение одного часа на термошейкере при 37 °C в режиме 300 об/мин. Далее из полученной суспензии удалили лишнюю ткань, эритроциты лизировали с использованием Lysing Solution (BD, США) и после отмывки клетки помещали в 1 мл среды DMEM (ПанЭко, Россия). Подсчитывали число клеток в суспензии с использованием проточного цитометра, концентрацию клеток доводили до $400 \cdot 10^3$ кл в 7,9 мл среды. В лунки 96-луночного планшета раскапывали полученную суспензию, в каждую лунку по 100 мкл суспензии (по $5 \cdot 10^3$ кл. на лунку), после чего планшет инкубировали в течении суток в атмосфере 5 % CO₂ при 37°C.

На следующий день в каждую лунку планшета добавляли 100 мкл среды ДМЕМ, содержащей по $50 \cdot 10^3$ кл. (по три лунки на пациента), после чего планшет инкубировали в течение двух суток в атмосфере 5 % CO₂ при 37°C.

После инкубации МТТ реагент (3-(4,5диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, 5 мг/мл) (ПанЭко, Россия) вносили в объеме 10 мкл в каждую лунку планшета, далее планшет инкубировали в течение 4 часов. Из каждой лунки планшета удаляли среду и вносили по 200 мкл ДМСО, который растворял осевшие на дне планшета кристаллы в течение 5 минут при 37°C с постоянным встряхиванием. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм на фотометре Униплан (Пикон, Россия).

Оценку цитотоксической активности лимфоцитов периферической крови в динамике проводимой ИТТ пембролизумабом и ленватинибом у пациенток с РЭ, неотягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, проводили на этапе постановки диагноза, у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ до начала ИТТ, через 2 и 6 месяцев после начала проведения ИТТ. Индекс цитотоксичности выражали в виде процента погибших опухолевых клеток от их количества в контрольной пробе без лимфоцитов периферической крови.

2.3.5 Оценка содержания цитокинов в сыворотке периферической крови

Содержание цитокинов в сыворотке периферической крови у пациенток I исследовательской группы и у пациенток II исследовательской группы до начала ИТТ, после 2, 6, и более 30 месяцев проводимой ИТТ, а также у пациенток с прогрессированием заболевания на фоне проводимой ИТТ изучали методом иммуноферментного анализа. 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).

Кровь собирали утром натощак в вакутейнеры с диоксидом кремния у каждого пациента, после чего центрифугировали для получения сыворотки крови.

Во все лунки планшета с иммобилизованными антителами к исследуемым цитокинам вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов, после чего в соответствующие лунки добавляли в дублях по 100 мкл каждого калибровочного и контрольного образца. В остальные лунки в дублях вносили по 100 мкл анализируемых образцов сывороток крови. Стрипы инкубировали в течение часа при встряхивании на термошейкере при температуре 37°C и 700 об/мин. По окончании инкубации проводили отмывку с помощью промывочного устройства 5 раз, после чего оставшуюся жидкость удаляли и в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата биотинилированных поликлональных антител, стрипы инкубировали в течение 30 минут при встряхивании. По окончании инкубации проводили отмывку, после чего во все лунки вносили по 100 мкл стрептавидин-пероксидазы хрена, стрипы инкубировали в течении 30 минут при встряхивании. По окончании инкубации планшет отмывали и во все лунки вносилось по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс и инкубировали планшет в темноте в течение 25 минут при комнатной температуре. По окончании инкубации во все лунки планшета вносили по 100 мкл стоп-реагента (серная кислота 4,9 %), планшет встряхивали в

течение 10-15 секунд, при этом содержимое лунок окрашивалось в желтый цвет.

Затем проводили измерение величины оптической плотности растворов в лунках стрипов 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.

2.3.6 Изучение генетических мутаций ткани опухоли

Определение соматических мутаций генов *KRAS* и *PIK3CA* проводили на генетическом материале, выделенном из фиксированных в формалине парафинизированных образцов опухолевой ткани, методами высокоразрешающего плавления ДНК и секвенирования по Сенгеру.

Выделение ДНК из фиксированных в формалине парафинизированных образцов опухолевой ткани, полученной во время проведения операции у больных с РЭ, производили с использованием набора Cobas DNA Sample Preparation kit (Roche, Германия), в соответствии с инструкцией производителя под контролем морфолога. Качество полученной ДНК проверяли измерением концентрации ДНК и соотношения A260/A280 с помощью спектрофотометра NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, США). Праймеры к исследуемым последовательностям генов *KRAS* и *PIK3CA* были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 10 program (Invitrogen Corp., United States). Каждый из 14 образцов протестировали на наличие MSI статуса и изменений в кодирующих регионах генов *KRAS* и *PIK3CA*.

Статус MSI оценивали с использованием фрагментарного анализа пяти моно/динуклеотидных маркеров (NR21, NR24, NR27, BAT25 и BAT26) на платформе ABI Prism 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Отсутствие альтераций или нестабильность единственного маркера

принимали за стабильный микросателлитный статус опухоли, нестабильность двух и более маркеров принимали за статус микросателлитной нестабильности опухоли.

Для определения соматических мутаций в кодонах 12–13 (экзон 2) и 61 (экзон 3) гена *KRAS*; в кодонах 542–546 (экзон 9) и 1047–1049 (экзон 20) гена *PIK3CA*, кривые высокоразрешающего плавления ДНК проанализировали после ПЦР в реальном времени с соответствующими праймерами и зондами на термоциклере Rotor-Gene (QIAGEN, Германия). Для установления достоверности присутствия выявленных генетических альтераций соответствующий продукт ПЦР очищали и секвенировали по Сенгеру на платформе ABI Prism 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

2.3.7 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. Ассоциацию клинικο-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 периферической крови и микроокружении опухоли, цитотоксической активности лимфоцитов периферической крови 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 оценивалось с помощью дисперсионного анализа. Корреляционный анализ проводился с

использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Оценка предиктивной ценности иммунологических параметров эффективности, проводимой ИТТ проводили 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).

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Клинико-морфологические особенности и отдаленные результаты иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия

В реальной клинической практике нами были оценены непосредственные и отдаленные результаты ИТТ у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при сроке наблюдения 45 месяцев.

На основе комплексной анкеты нами была составлена база данных, включающая более 70 клинико-морфологических параметров пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ, получавших ИТТ (Приложение А).

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 $29,69 \pm 7,05$ %, кроме того нами была определена медиана ОВ, составившая 23 месяца (рисунок 2).

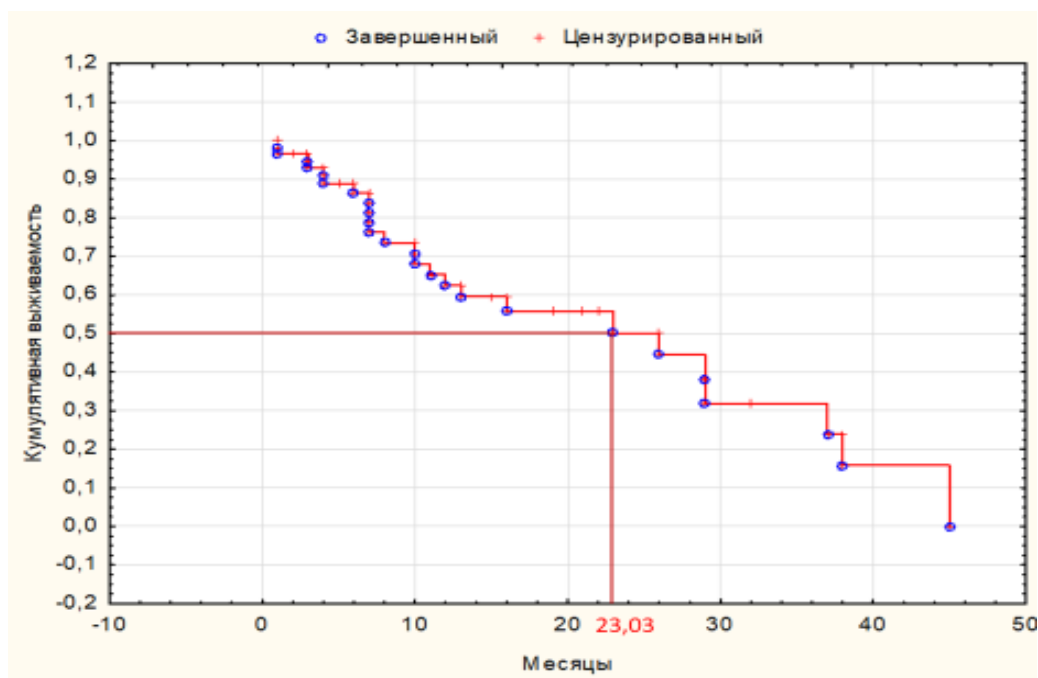


Рисунок 2 – График общей выживаемости у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при проведении ИТТ

Медиана выживаемости без прогрессирования при сроке наблюдения 45 месяцев была равна 12,6 месяцам, нижний квартиль составил 5 месяцев, верхний квартиль 28,1 месяцев (рисунок 3).

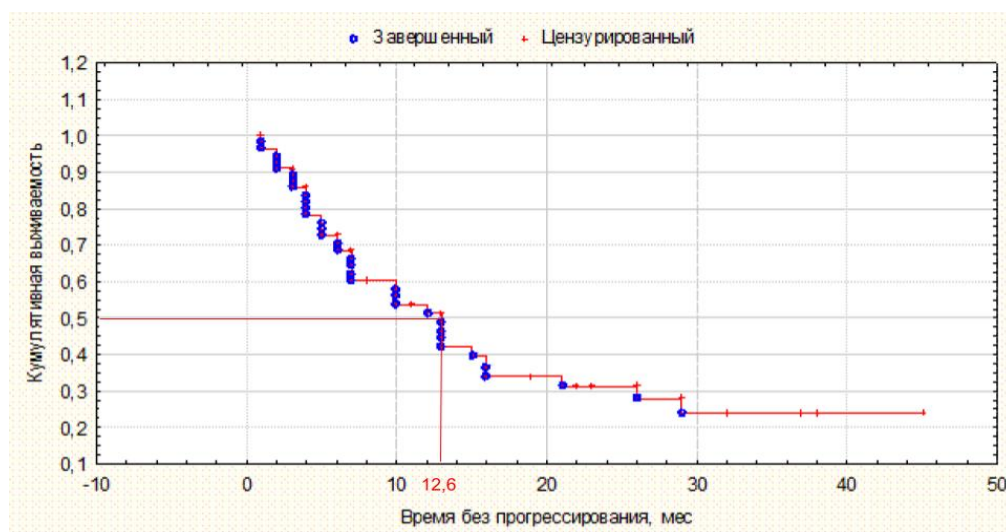


Рисунок 3 – График кумулятивной безрецидивной выживаемости у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при проведении ИТТ

Далее была проанализирована выживаемость без прогрессирования в группе пациенток, у которых данное событие наступило ранее 12,6 месяцев. У 25 % пациенток прогрессирование наступило в течение 2,57 месяцев, а у 75 % в течении 6 месяцев, медиана составляла 4,05 месяцев (рисунок 4).

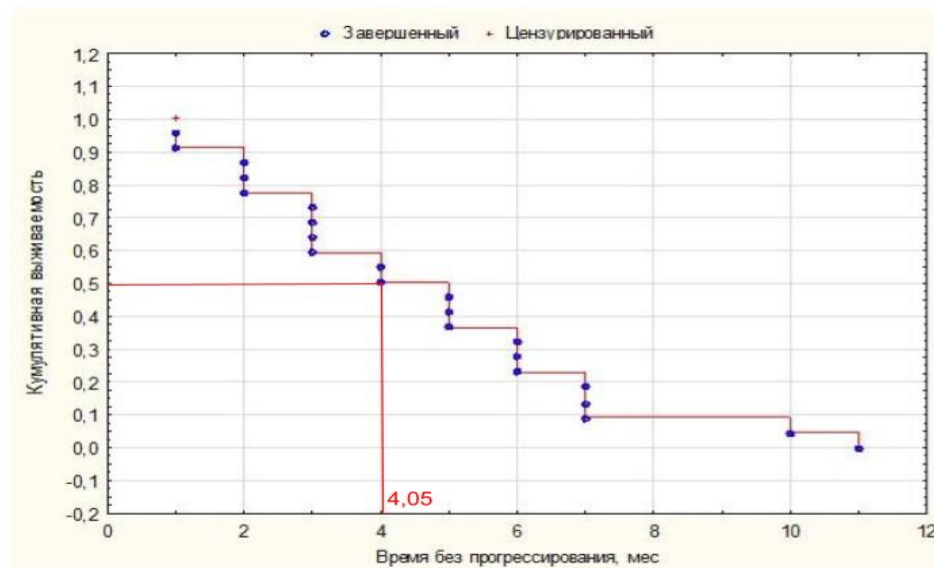


Рисунок 4 – График кумулятивной безрецидивной выживаемости в группе пациенток, у которых прогрессирование наступило ранее 12,6 месяцев

В группе пациенток, переживших 12,6 месяцев без прогрессирования, медиана выживаемости без прогрессирования не была достигнута (рисунок 5).



Рисунок 5 – График кумулятивной безрецидивной выживаемости в группе пациенток, переживших 12,6 месяцев от начала применения ИТТ без прогрессирования

С использованием Log-Rank метода был проведен анализ влияния клинико-морфологических особенностей пациенток на длительность ВБП. На основании проведенного исследования были выявлены клинико-морфологические параметры, ассоциированные с ВБП. Неблагоприятными факторами являются: степень дифференцировки опухоли G3 ($p = 0,04$, рисунок 6), наличие множественных очагов прогрессирования ($p = 0,09$, рисунок 7) и метастазирование в головной мозг ($p = 0,02$, рисунок 8).

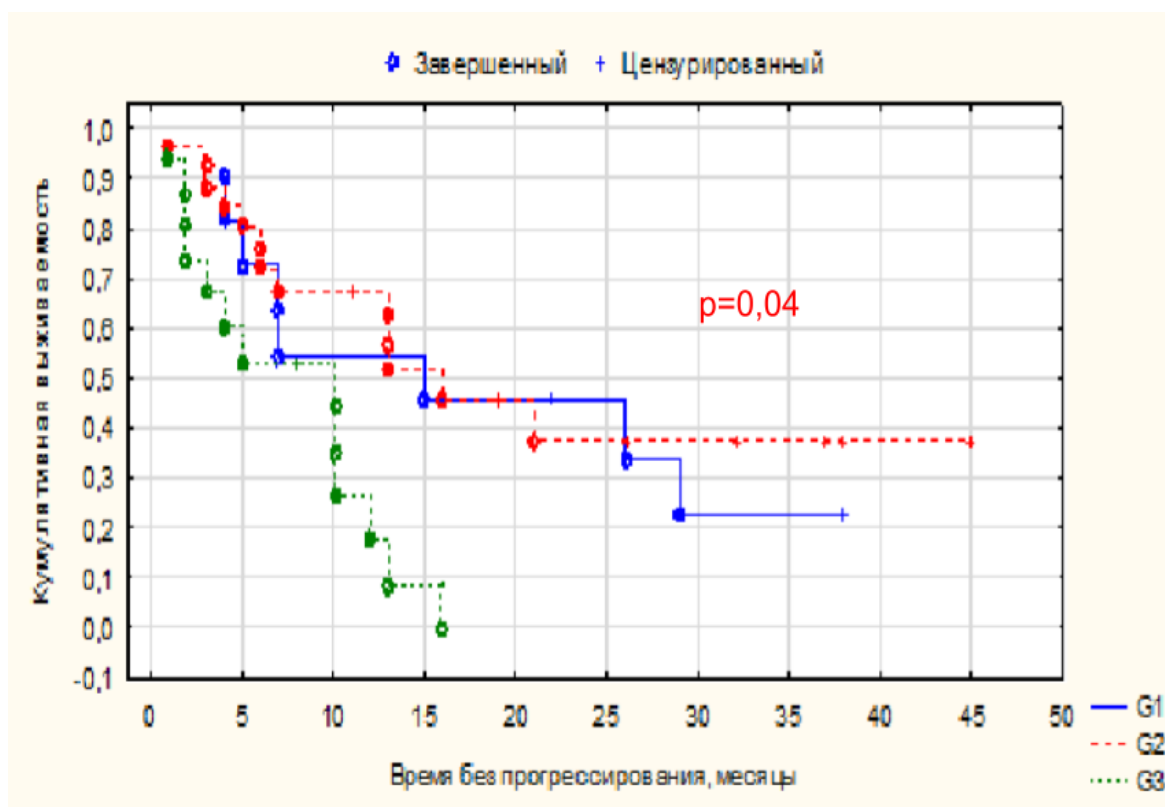


Рисунок 6 – График кумулятивной безрецидивной выживаемости у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при проведении ИТТ в зависимости от степени дифференцировки опухоли

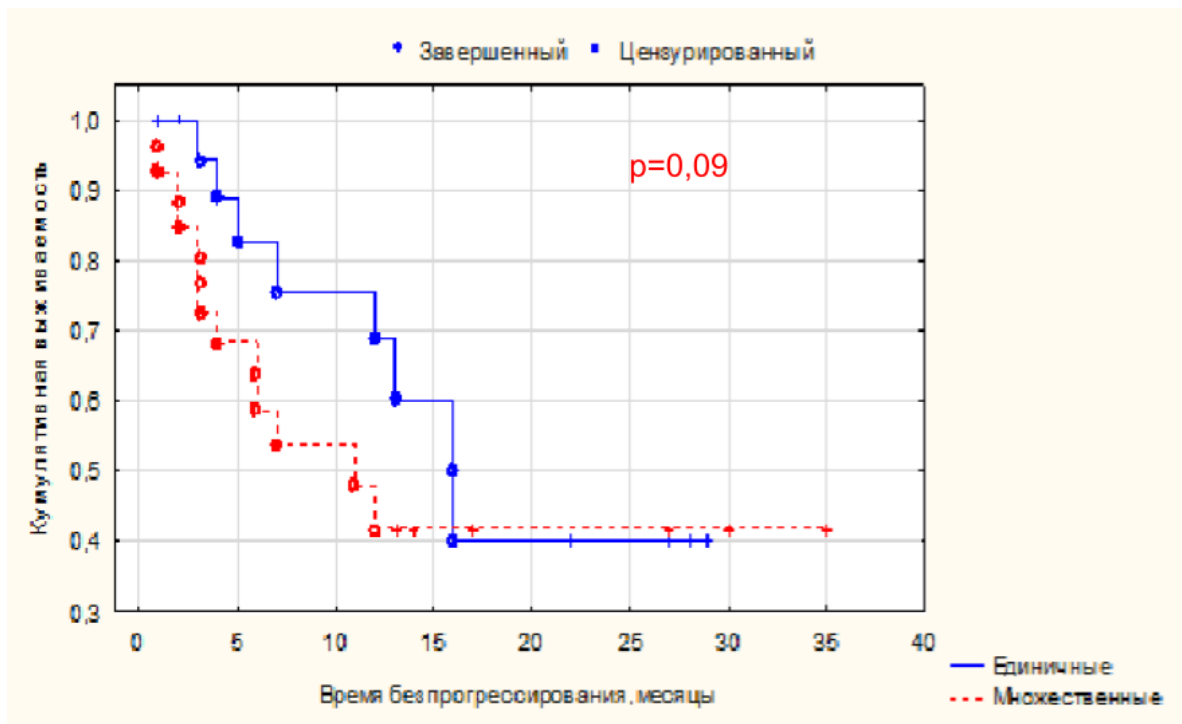


Рисунок 7 – График кумулятивной безрецидивной выживаемости у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при проведении ИТТ в зависимости от количества очагов прогрессирования



Рисунок 8 – График кумулятивной безрецидивной выживаемости у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при проведении ИТТ в зависимости от наличия опухолевых очагов в головном мозге

Для оценки связи клинико-морфологических параметров с длительностью выживаемости без прогрессирования общая группа пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ была разделена на 2 подгруппы в зависимости от их ВБП: 1 – больше или равно 12,6 месяцев (эффективная ИТТ), 2 – менее 12,6 месяцев (неэффективная ИТТ). С использованием метода Манна-Уитни было проведено сравнение пациентов обеих групп в зависимости от их клинико-морфологических особенностей (таблица 5).

Таблица 5 – Частота встречаемости различных клинико-морфологических особенностей у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в зависимости от длительности выживаемости без прогрессирования

Признак	Длительность выживаемости более или равно 12,6 месяцев	Длительность выживаемости менее 12,6 месяцев	p
Степень дифференцировки G3	14 %	42 %	0,04
Эмболы в лимфо-васкулярных протоках	76 %	42 %	0,02
Единичные очаги прогрессирования	52 %	17 %	0,01
Возраст	60,76 ± 1,83	64,83 ± 1,62	0,08
Степень дифференцировки G2	57 %	33 %	0,09
Висцеральные метастазы	67 %	42 %	0,08

Было выявлено, что пациентки, пережившие 12,6 месяцев без прогрессирования, характеризуются следующими признаками:

- 1) Более молодой возраст;

- 2) Чаще отмечалась степень дифференцировки G1-2 и реже степень дифференцировки G3;
- 3) Чаще присутствовали эмболы в лимфо-васкулярных протоках;
- 4) Чаще обнаруживались единичные очаги прогрессирования;
- 5) Чаще отсутствовали висцеральные метастазы.

Таким образом, частичный ответ наблюдался у 23,3 % пациенток, стабилизация была отмечена у 18,3 % пациенток, прогрессирование наблюдалось у 58,4 % больных, двухлетняя ОВ составила $45,25 \pm 9,09$ %, двухлетняя ВБП $29,69 \pm 7,05$ %, медиана ОВ составила 23 месяца (рисунок 2), мВБП у пациенток, проходящих ИТТ, при сроке 45 месяцев составила 12,6 месяцев (рисунок 3). Была выявлена ассоциация с эффективной ИТТ следующих клинико-морфологических характеристик, которые можно рассматривать в качестве критериев эффективности проводимой терапии (таблица 5): степень дифференцировки опухоли (рисунок 6), наличие очагов прогрессирования (рисунок 7, таблица 5), эмболы в лимфо-васкулярных протоках ($p = 0,02$). Была выявлена ассоциация с неэффективной терапией степени дифференцировки опухоли G3 и наличия опухолевых очагов в головном мозге (таблица 5, рисунок 8).

3.2 Сравнительная характеристика иммунологических параметров у больных раком эндометрия, неотягощенных прогрессированием и противорецидивной терапией, и больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия

Перед исследованием динамики иммунологических параметров, ассоциированных с молекулярно-клеточными механизмами действия пембролизумаба и ленватиниба при проведении ИТТ, мы оценили изменения в состоянии иммунной системы под влиянием опухолевого роста и прогрессии у пациенток с РЭ.

В сравнении с пациентками, неотягощенными прогрессированием и противорецидивной терапией, пациентки, получившие конвенциональную терапию с последующим прогрессированием опухолевого процесса, характеризовались более низким количеством $CD14^+CD16^-$ моноцитов классической субпопуляции, экспрессирующих рецептор к сосудисто-эндотелиальному фактору роста VEGFR (CD309) ($p = 0,03$, рисунок 9 А).

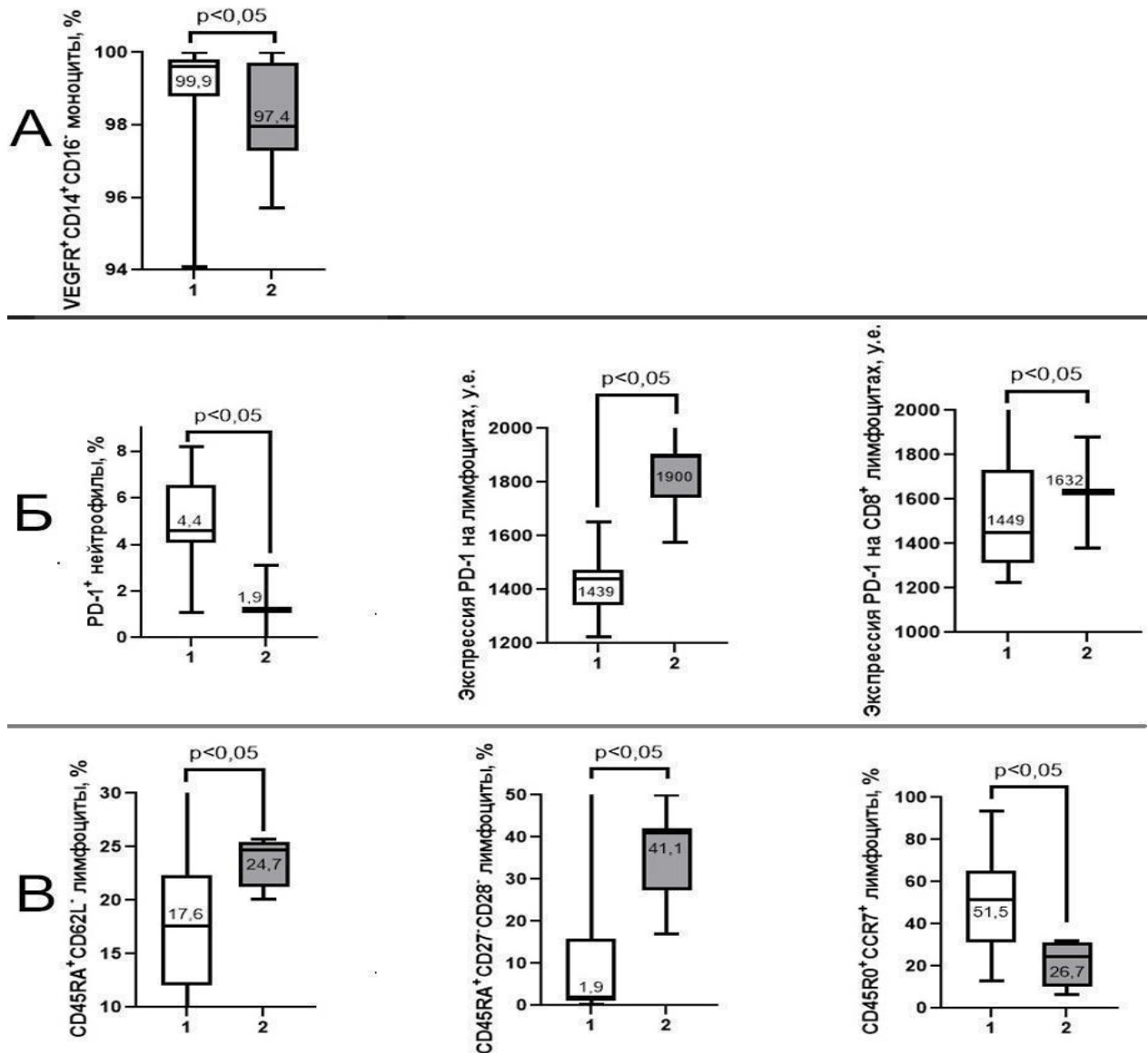


Рисунок 9 – Отличия иммунологических показателей у пациенток с РЭ, неотягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением (1), и прогрессирующим MSS/pMMR РЭ (2): А – экспрессия VEGFR (CD309); Б – экспрессия PD-1 (CD279); В – дифференцировка лимфоцитов.

Примечания: % – доля клеток; у.е. – условные единицы, в которых измеряется медиана интенсивности флюоресценции; p – уровень значимости различий

Прогрессирование РЭ и проводимое противоопухолевое лечение сопровождалось снижением в периферической крови количества нейтрофилов, экспрессирующих рецептор PD-1 (CD279), по сравнению с соответствующим показателем у пациенток с первичным РЭ ($p = 0,02$, рисунок 9 Б). Однако на лимфоцитах в целом и на $CD8^+$ лимфоцитах экспрессия данной молекулы PD-1(CD279) увеличивалась ($p = 0,03$, рисунок 9 Б).

Также у пациенток после неоднократного прогрессирования и нескольких линий противоопухолевого лечения отмечено увеличение $CD45RA^+CD62L^-$ клеток ($p = 0,003$) и $CD45RA^+CD27^-CD28^-$ клеток ($p = 0,02$), относимых к терминально дифференцированным эффекторам (TEMRA). При этом доля $CD45RO^+CCR7^+$ клеток центральной памяти снижалась почти в 2 раза ($p = 0,05$, рисунок 9 В).

Таким образом потенциальные эффекторы терапевтического действия пембролизумаба и ленватиниба подвергались влиянию опухолевой прогрессии и проведенного противоопухолевого лечения.

3.3 Влияние иммунотаргетной терапии на иммунологические показатели у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия

Проведение ИТТ оказывало влияние на изучаемые показатели у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ. Количество $CD14^-CD16^+$ моноцитов снижалось после 2 месяцев лечения по сравнению с показателями до начала данного вида терапии: 4,75 [2,70 – 5,60] % и 9,75 [6,35 – 12,10] %, соответственно ($p = 0,09$) (рисунок 10 А). После 6 месяцев ИТТ наблюдалось увеличение экспрессии молекулы CD14 на поверхности моноцитов в 1,55 раза по сравнению с исходным уровнем ($p = 0,09$) (рисунок 10 А).

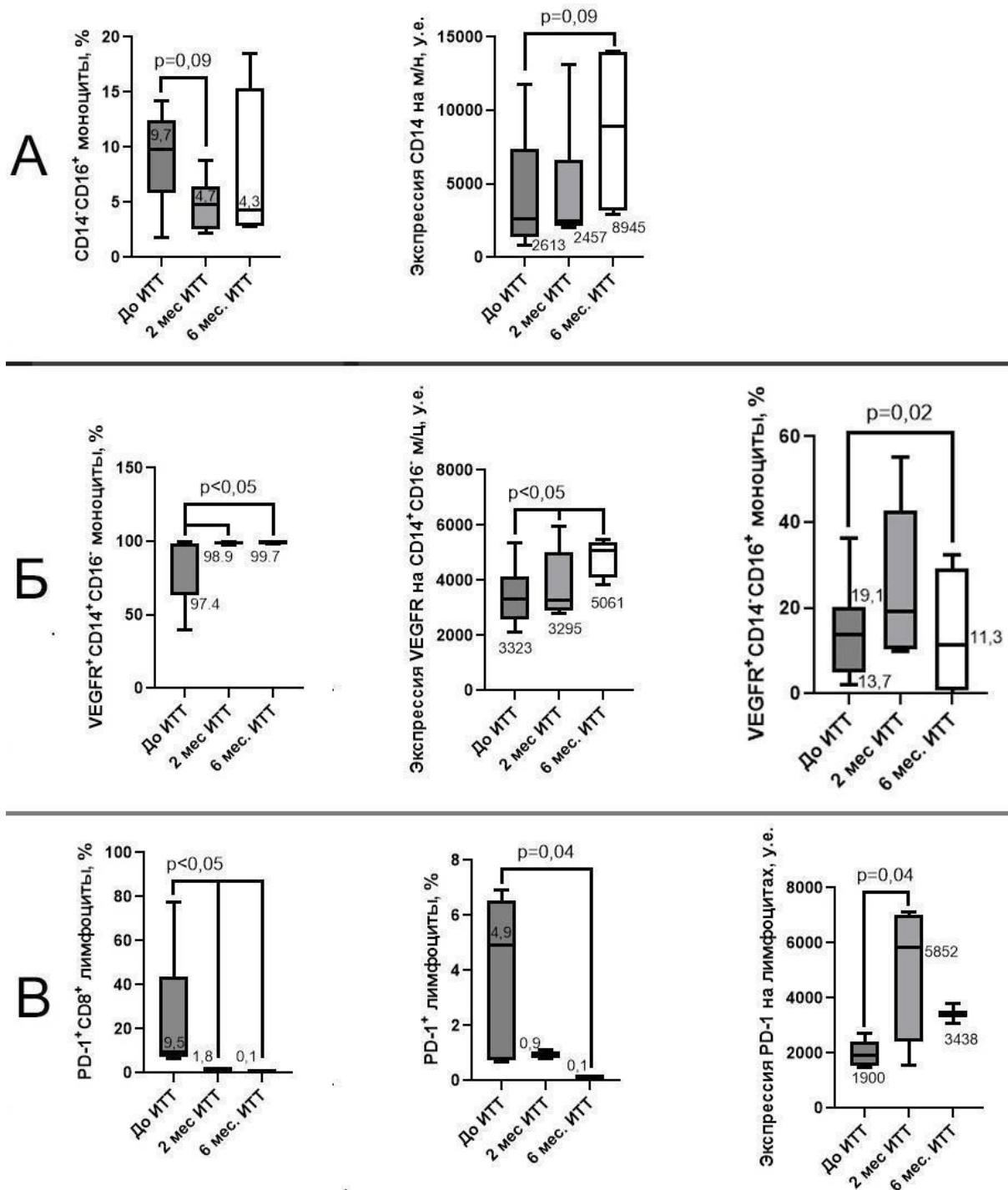


Рисунок 10 – Динамика иммунологических показателей в ходе проводимой ИТТ: А – показатели популяции моноцитов; Б – экспрессия VEGFR; В – экспрессия PD-1

Примечания: % – доля клеток; у.е. – условные единицы, в которых измеряется медиана интенсивности флюоресценции; p – уровень значимости различий.

Доля VEGFR⁺(CD309⁺) моноцитов в классической субпопуляции и экспрессия VEGFR(CD309) на них увеличивались к 2-м месяцам ИТТ и оставались повышенными после 6-ти месяцев ($p = 0,01$), в то время как экспрессия VEGFR (CD309) в неклассической популяции после 6 месяцев ИТТ снижалась в 1,6 раз по сравнению с показателями до начала данного вида терапии ($p = 0,02$) (рисунок 10 Б).

Количество PD-1(CD279)⁺CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов снижалось в 5,3 раза после 2-х месяцев ИТТ ($p = 0,02$) и к 6 месяцам лечения составляло лишь 1 % от исходного количества клеток данной популяции ($p = 0,08$). Также к 6-ти месяцам ИТТ снижалась в 4,9 раза доля PD-1⁺ клеток в общем пуле лимфоцитов ($p = 0,04$), но экспрессия данной молекулы на лимфоцитах возрастала в 2 раза после 2 месяцев терапии по сравнению с уровнем до начала ИТТ ($p = 0,04$) (рисунок 10 В).

Таким образом проведение ИТТ было ассоциировано с изменениями иммунологических показателей, отражающих потенциальные механизмы терапевтического действия пембролизумаба и левватиниба. При этом данные изменения имеют противоположную направленность, чем отмеченная динамика при прогрессировании РЭ.

3.4 Связь состояния иммунной системы с эффективностью проводимой иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия

Далее было выполнено сравнение иммунологических показателей, ассоциированных с молекулярно-клеточными механизмами действия пембролизумаба и левватиниба, у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в зависимости от эффективности ИТТ.

Пациентки с РЭ, у которых проведенная ИТТ оказалась неэффективной, характеризовались более высоким числом CD14⁺CD16⁺ моноцитов промежуточной популяции в периферической крови

в сравнении с соответствующим показателем у больных с эффективной ИТТ ($p = 0,07$, рисунок 11 А). После 2-х и 6-ти месяцев терапии различий в изучаемых показателях иммунной системы у больных с эффективной и неэффективной терапией выявлено не было. Однако сравниваемые группы пациенток характеризовались выраженными различиями в динамике исследуемых показателей при проведении ИТТ.

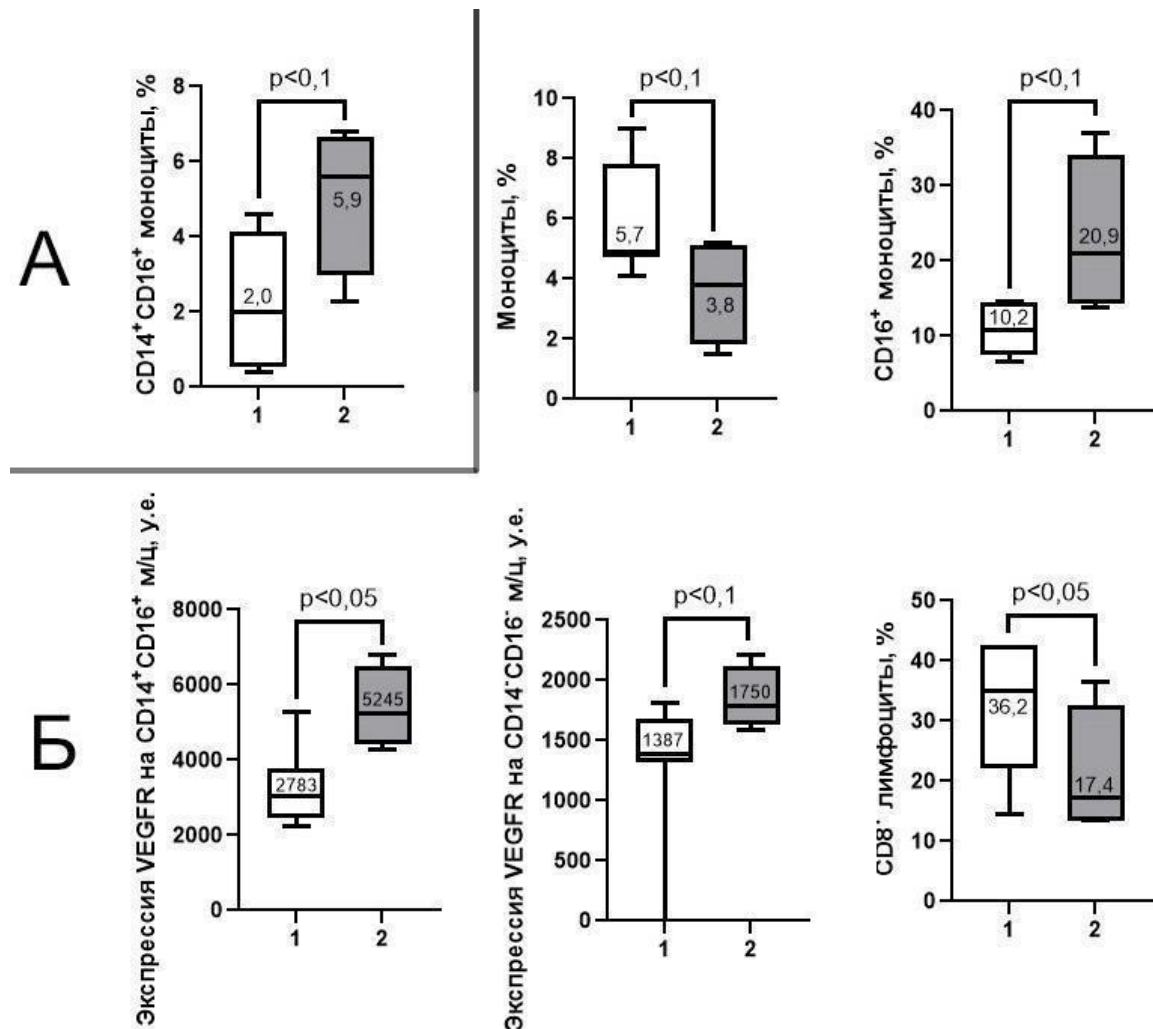


Рисунок 11 – Иммунологические показатели больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в зависимости от эффективности ИТТ: 1 – эффективная ИТТ; 2 – неэффективная ИТТ; А – до ИТТ; Б – в момент прогрессирования или последнего наблюдения без прогрессирования

Примечания: % – доля клеток; у.е. – условные единицы, в которых измеряется медиана интенсивности флюоресценции; p – уровень значимости различий.

Неэффективная ИТТ была ассоциирована со снижением числа $CD14^+CD16^-$ клеток моноцитарного гейта в момент прогрессирования по сравнению с соответствующими показателями до начала ИТТ ($p = 0,08$, рисунок 12). Однако количество $VEGFR(CD309)^+CD14^+CD16^-$ клеток моноцитарного гейта ($p = 0,03$), а также экспрессия VEGFR как на клетках данной субпопуляции ($p = 0,05$), так и на $CD14^+CD16^+$ моноцитах промежуточной субпопуляции ($p = 0,08$) возрастало (рисунок 12).

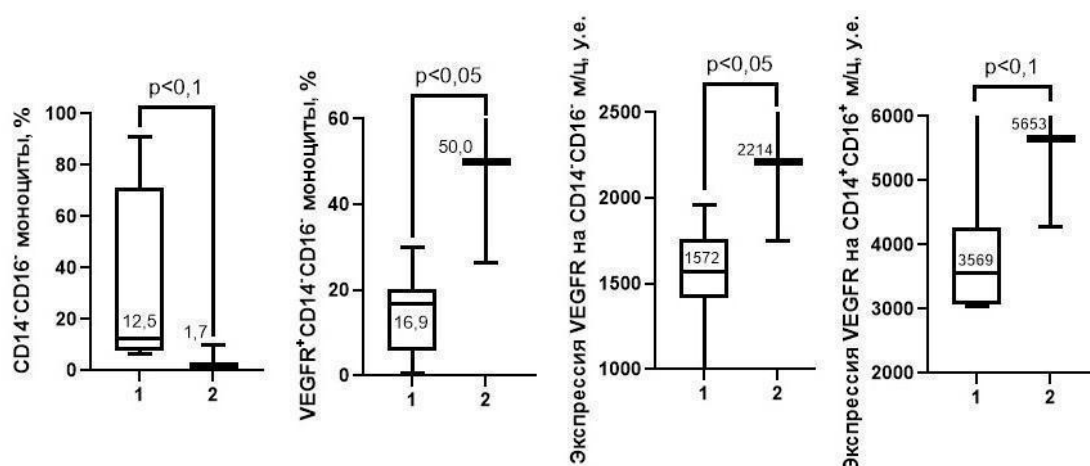


Рисунок 12 – Иммунологические показатели у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при неэффективной ИТТ: 1 - до начала ИТТ; 2 - момент прогрессирования

Примечания: % – доля клеток; у.е. – условные единицы, в которых измеряется медиана интенсивности флуоресценции; p – уровень значимости различий.

Для пациенток с эффективной ИТТ было отмечено увеличение экспрессии молекулы CD14 на моноцитах в момент последнего наблюдения по сравнению с исходным показателем ($p = 0,03$, рисунок 13 А). Количество $VEGFR(CD309)^+CD14^+CD16^-$ моноцитов классической субпопуляции увеличивалось в сравнении с показателем до начала ИТТ ($p = 0,01$). При этом экспрессия VEGFR(CD309) на $CD14^+CD16^+$ моноцитах неклассической субпопуляции снижалась относительно исходных параметров ($p = 0,002$, рисунок 13 А).

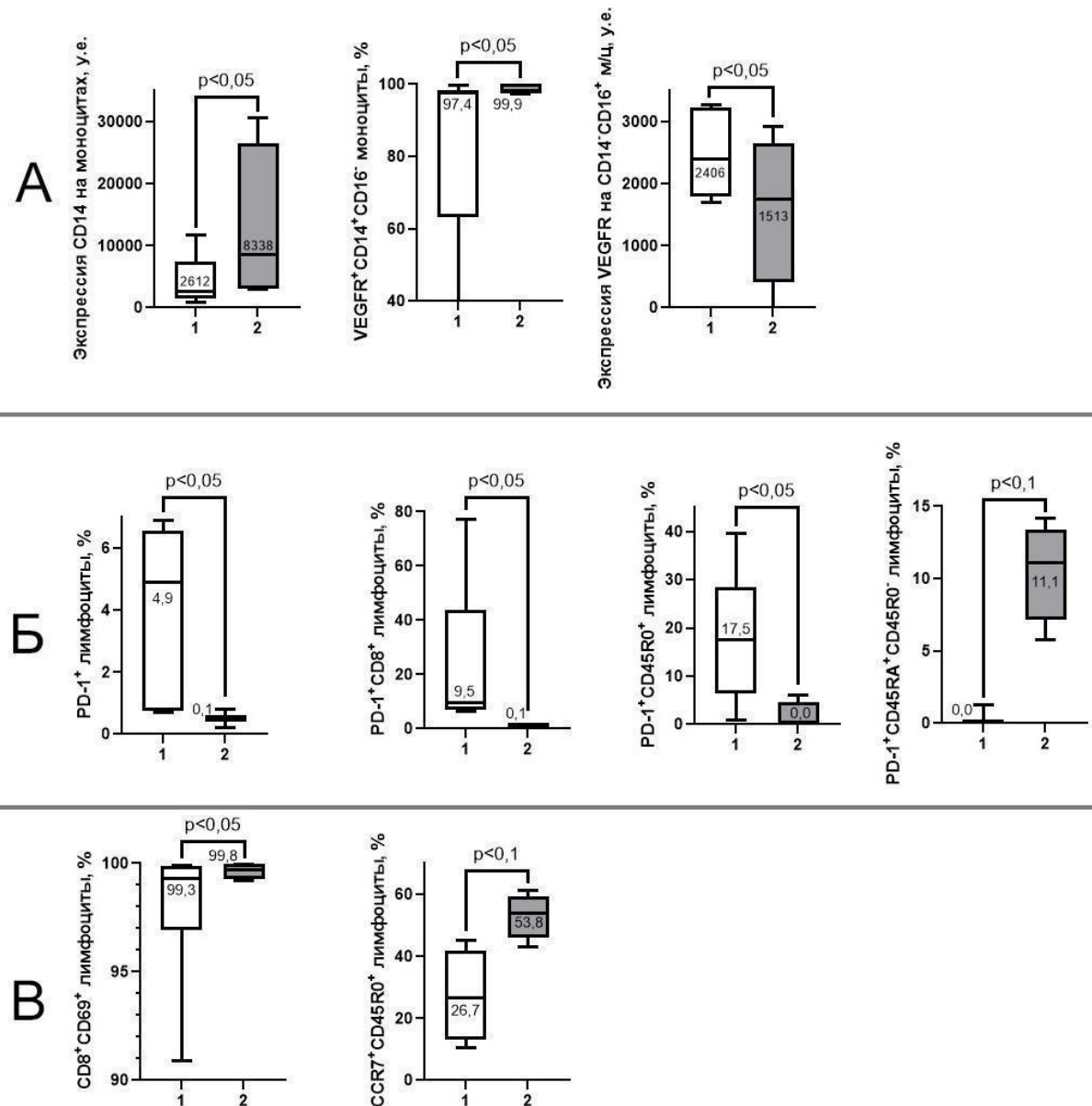


Рисунок 13 – Иммунологические показатели у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при проведении эффективной ИТТ: 1 – до начала ИТТ; 2 – момент последнего наблюдения; А – экспрессия VEGFR; Б – экспрессия PD-1; В – активация и дифференцировка лимфоцитов

Примечания: % – доля клеток; у.е. – условные единицы, в которых измеряется медиана интенсивности флюоресценции; p – уровень значимости различий.

Проведение эффективной ИТТ было ассоциировано не только с изменением иммунологических показателей, связанных с экспрессией рецептора к сосудисто-эндотелиальному фактору роста. Так, снижалось

количество PD-1(CD279)⁺ лимфоцитов (p = 0,02), PD-1(CD279)⁺CD8⁺ лимфоцитов (p = 0,02), коммитированных PD-1(CD279)⁺CD45R0⁺ лимфоцитов (p = 0,08), но увеличилась доля PD-1(CD279)⁺CD45RA⁺CD45R0⁻ наивных и терминально дифференцированных лимфоцитов у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в момент последнего наблюдения по сравнению с соответствующими показателями до начала ИТТ (p = 0,08, рисунок 13 Б).

Кроме того, при проведении эффективной ИТТ было отмечено увеличение количества CD8⁺CD69⁺ активированных лимфоцитов и CCR7⁺CD45R0⁺ коммитированных лимфоцитов по сравнению со значениями у пациенток до начала противоопухолевого лечения (p = 0,06, рисунок 13 В).

Различная динамика показателей при проведении ИТТ в зависимости от эффективности данного вида лечения приводила к выраженным различиям в группах сравнения в конечных точках – точке прогрессирования РЭ на фоне ИТТ в течение 12,6 месяцев или последнего наблюдения при отсутствии прогрессирования более 12,6 месяцев. Больные с прогрессированием характеризовались более низким относительным количеством моноцитов (p = 0,01), при этом число CD16⁺ моноцитов в данной группе было выше, чем у пациенток без прогрессирования (p = 0,08, рисунок 11 Б). Уровень экспрессии VEGFR(CD309) на CD14⁺CD16⁺ моноцитах промежуточной субпопуляции (p = 0,05) и на неполяризованных CD14⁻CD16⁻ моноцитах (p = 0,08) у пациенток с прогрессированием был выше, чем в группе сравнения (рисунок 11 Б). Прогрессирование MSS/pMMR РЭ на фоне ИТТ было ассоциировано с более низким количеством CD8⁺ лимфоцитов (p = 0,03, рисунок 11 Б).

Таким образом, если до начала ИТТ у пациенток с эффективной и неэффективной терапией состояние иммунной системы различалось лишь одним показателем на уровне статистической тенденции (рисунок 11 А), то к моменту достижения исхода (прогрессирование при проведении лечения в течение 12,6 месяцев или отсутствие прогрессирования более 12,6 месяцев)

отличия были отмечены для ряда параметров, связанных с молекулярно-клеточными механизмами терапевтического действия пембролизумаба и ленватиниба, таких как количество моноцитов в целом и $CD16^+$ моноцитов, экспрессия VEGFR на $CD14^+CD16^+$ моноцитах промежуточной субпопуляции и $CD14^-CD16^-$ клетках моноцитарного гейта, количество $CD8^+$ лимфоцитов (рисунок 11 Б).

3.5 Сравнение структуры иммунологических показателей у больных с различной эффективностью имунотаргетной терапии на этапах лечения и у пациенток с раком эндометрия, не отягощенных прогрессированием и противорецидивной терапией

Проведенное исследование показало, что вызвавшие наш интерес потенциальные эффекторы терапевтического действия пембролизумаба и ленватиниба подвергаются влиянию опухолевой прогрессии и проведенного противоопухолевого лечения при РЭ.

Так, у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ до начала ИТТ, по сравнению с больными РЭ, не отягощенными прогрессированием и противоопухолевым лечением, было отмечено статистически значимое снижение $VEGFR^+CD14^+CD16^-$ моноцитов классической субпопуляции и увеличение экспрессии PD-1(CD279) как на поверхности лимфоцитов в общем пуле ($p = 0,03$), так и на $CD8^+$ лимфоцитах ($p = 0,03$, рисунок 14).

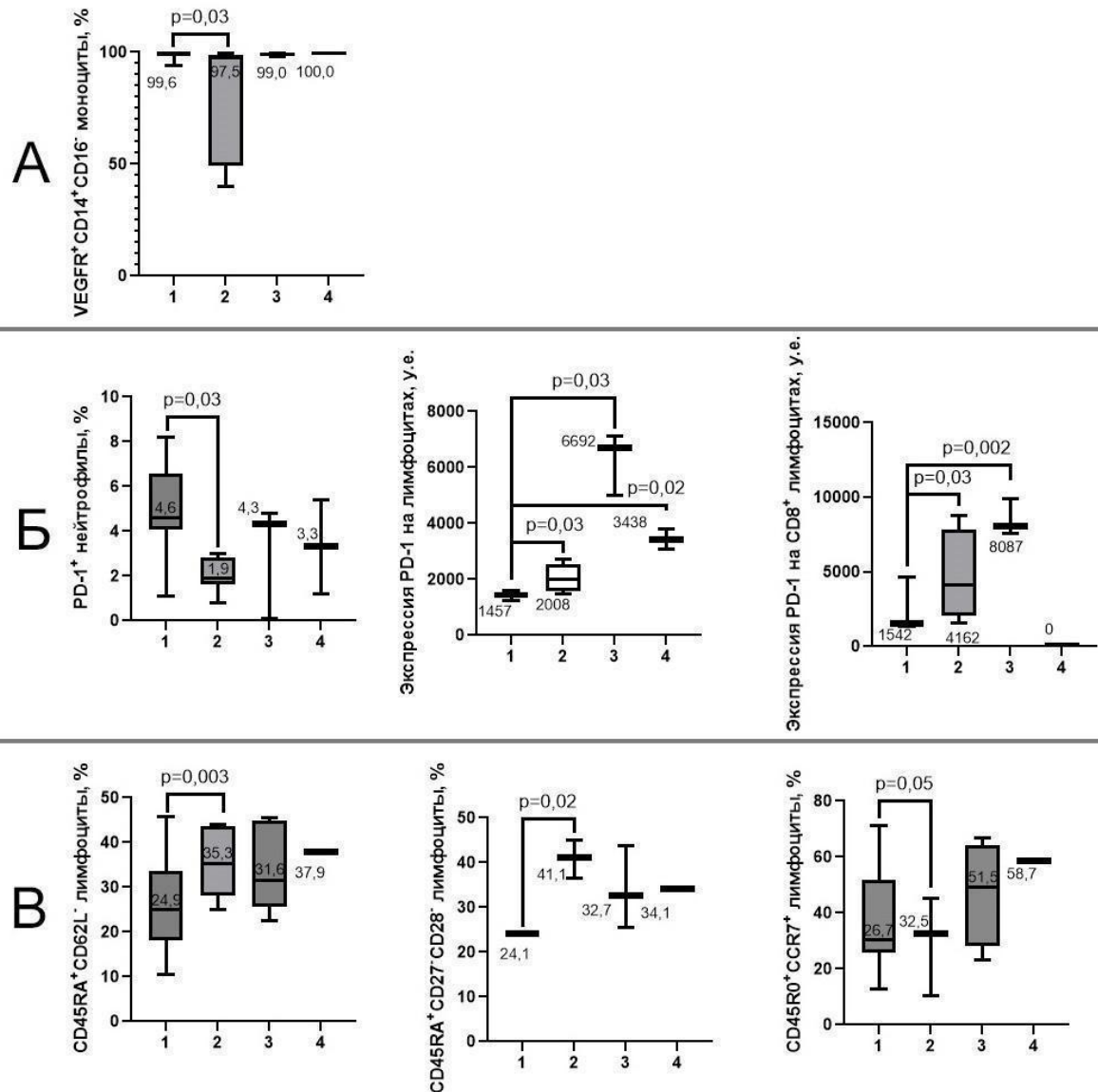


Рисунок 14 – Иммунологические показатели у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в ходе ИТТ: 1 – пациентки с РЭ, неотягощенные прогрессированием и противоопухолевым лечением; 2 – До начала ИТТ; 3 – 2 месяца ИТТ; 4 – 6 месяцев ИТТ; А – экспрессия VEGFR; Б – экспрессия PD-1; В – дифференцировка лимфоцитов

Примечания: % – доля клеток; у.е. – условные единицы, в которых измеряется медиана интенсивности флюоресценции; p – уровень значимости различий.

Таким образом, при проведении эффективной ИТТ у пациенток отмечается приближение субпопуляционной структуры циркулирующих клеток иммунной системы к таковой у больных с РЭ, неотягощенных

прогрессированием и противорецидивной терапией (рисунок 14). Отмеченный факт, говорит о том, что состояние иммунной системы у больных на начальных этапах опухолевой болезни и при отсутствии цитостатических воздействий более благоприятно для реализации терапевтических эффектов комбинации пембролизумаба и ленватиниба.

3.6 Цитотоксический потенциал лимфоцитов периферической крови в отношении опухолевых клеток-мишеней *in vitro* при проведении иммунотаргетной терапии

Одним из главных механизмов элиминации опухоли является разрушение её клеток с помощью цитотоксических лимфоцитов, мигрирующих в ткань из циркуляции. На основании этого нами было проведено исследование *in vitro* цитотоксической активности лимфоцитов периферической крови, полученных у пациенток на различных этапах ИТТ, по отношению к клеткам, выделенным из опухоли эндометрия.

Проведение ИТТ на ранних этапах (2 месяца) приводило к снижению индекса цитотоксичности лимфоцитов в 1,53 раза, не достигшему уровня статистической значимости. Однако к 6-ти месяцам терапии индекс цитотоксичности возрастал на 183 % ($p < 0,05$) относительно сниженного уровня и приближался к значениям у пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением (рисунок 15).

Цитотоксичность лимфоцитов ПК в отношении клеток РЭ in vitro в динамике ИТТ

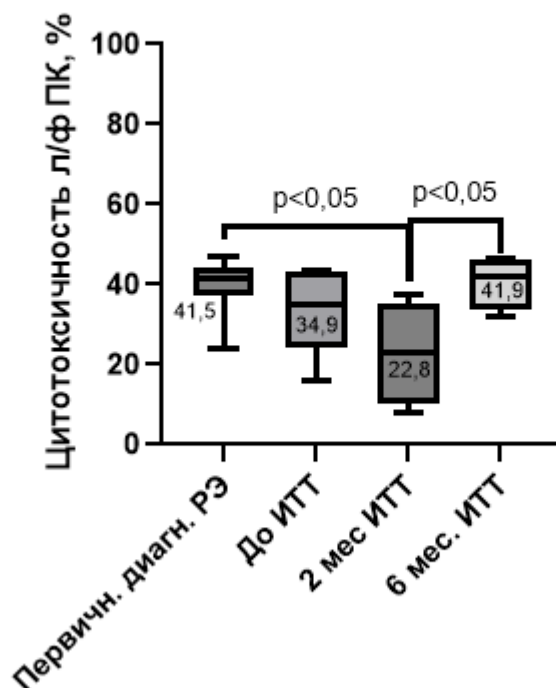


Рисунок 15 – Изменение цитотоксического индекса лимфоцитов периферической крови по отношению к клеткам РЭ в динамике проводимой ИТТ

Примечания: % – доля клеток; у.е. – условные единицы, в которых измеряется медиана интенсивности флюоресценции; p – уровень значимости различий.

Таким образом, длительное применение ИТТ приводило к увеличению цитотоксической активности лимфоцитов, приближаясь к значениям, соответствующих пациенткам с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением.

3.7 Влияние опухолевой прогрессии и противоопухолевой терапии на содержание цитокинов в циркуляции

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 (в том числе остециты, хондроциты, адипоциты, миоциты и т.д.) а также опухолевые клетки. На основании этого нами было проведено исследование влияния проводимой ИТТ на изменение уровня цитокинов.

Влияние опухолевой прогрессии и конвенционального лечения привело к увеличению содержания IL-10 ($p = 0,04$, таблица 6) у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в сравнении с соответствующим показателем у больных РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением.

Таблица 6 – Уровень цитокинов циркулирующей крови у пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением и прогрессирующим MSS/pMMR РЭ

Цитокин	Впервые выявленный РЭ, пг/мл Me (Q1;Q3)	Прогрессирующий MSS/pMMR РЭ, пг/мл Me (Q1;Q3)	p
IL-6	1,6 (1,2;4,2)	6,6 (3,1;17,9)	0,081
IL-8	6,9 (6,0;9,9)	12,1 (6,3;13,3)	0,116
VEGF	528,0 (333,0;868,0)	297,5 (173,5;971,3)	0,891
TNF	0,0 (0,0;0,1)	0,0 (0,0;0,7)	0,567
MCP-1	326,0 (214,7;428,6)	344,0 (248,7;474,2)	0,868
IL-10	4,2 (2,9;7,7)	8,0 (5,3;17,1)	0,041
IFN- γ	0,0 (0,0;0,2)	0,1 (0,0;1,6)	0,110

Таким образом повышенный уровень IL-10 можно рассматривать как фактор, сопровождающий прогрессирование рака эндометрия.

3.8 Влияние иммунотаргетной терапии на содержание цитокинов в периферической крови у больных прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия

В течение первых 6 месяцев ИТТ не приводила к изменению уровня цитокинов в крови у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ. Более длительное применение ИТТ было ассоциировано со снижением уровня как провоспалительных цитокинов (IL-6 и IL-8), так и цитокина с противовоспалительной активностью (IL-10, рисунок 16).

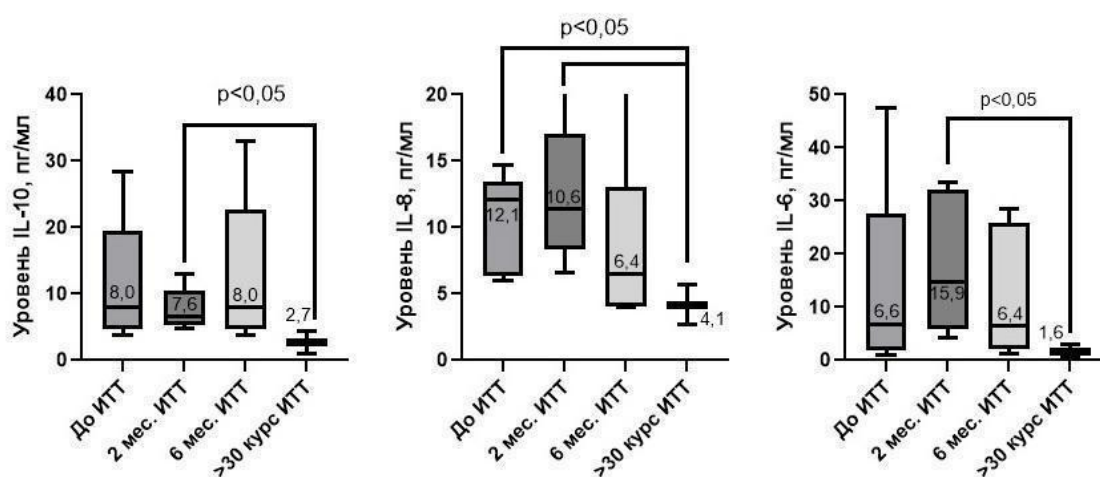


Рисунок 16 – Уровень цитокинов у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в зависимости от длительности ИТТ

Таким образом длительное применение ИТТ оказывало влияние на изменение уровня цитокинов в сыворотке крови.

3.9 Динамика содержания цитокинов в периферической крови у больных прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия в зависимости от эффективности иммунотаргетной терапии

Эффективная ИТТ у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ была сопряжена с изменением уровня нескольких цитокинов.

У пациенток с эффективной ИТТ уровень IL-8 снижался при проведении лечения по сравнению с показателем до начала терапии ($p < 0,1$), в то время, как у больных с прогрессированием на фоне ИТТ в течении 6 месяцев данный показатель оставался на том же уровне, что и до начала ИТТ (рисунок 17).

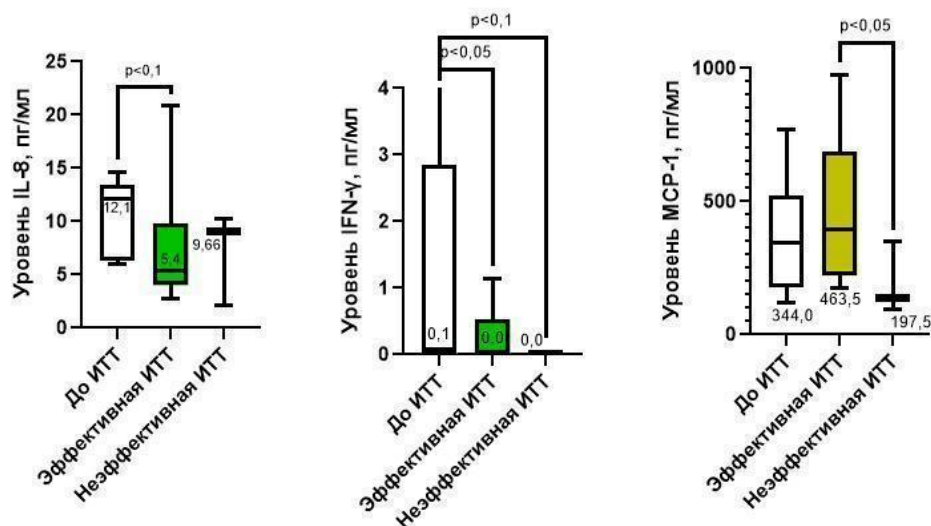


Рисунок 17 – Уровень цитокинов периферической крови у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в зависимости от эффективности ИТТ в момент последнего наблюдения

Эффективная ИТТ приводила к увеличению в 2 раза уровня MCP-1 в сравнении с соответствующим показателем при неэффективной терапии ($p < 0,05$, рисунок 13). Также было отмечено снижение концентрации IFN-γ в точке оценки исхода по сравнению с уровнем до начала ИТТ независимо от эффективности (рисунок 17).

Таким образом эффективная терапия сопровождалась изменениями уровня сывороточных цитокинов IFN-γ и MCP-1, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных маркеров эффективности терапии.

3.10 Связь содержания цитокинов в периферической крови со структурой иммунологических показателей у больных MSS/pMMR раком эндометрия

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.

Для изучения сопряженности уровня цитокинов в периферической крови и структуры иммунологических показателей, каждая из групп исследования была разделена на 2 подгруппы – с низким (<Me) и высоким (>Me) содержанием биологического фактора.

Наибольшим количество связей с дисперсией изучаемых иммунологических показателей у больных РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, обладали провоспалительный цитокин IL-8, противовоспалительный цитокин IL-10 и хемоаттрактант клеток моноцитарно-макрофагального ряда MCP-1 (рисунок 18).

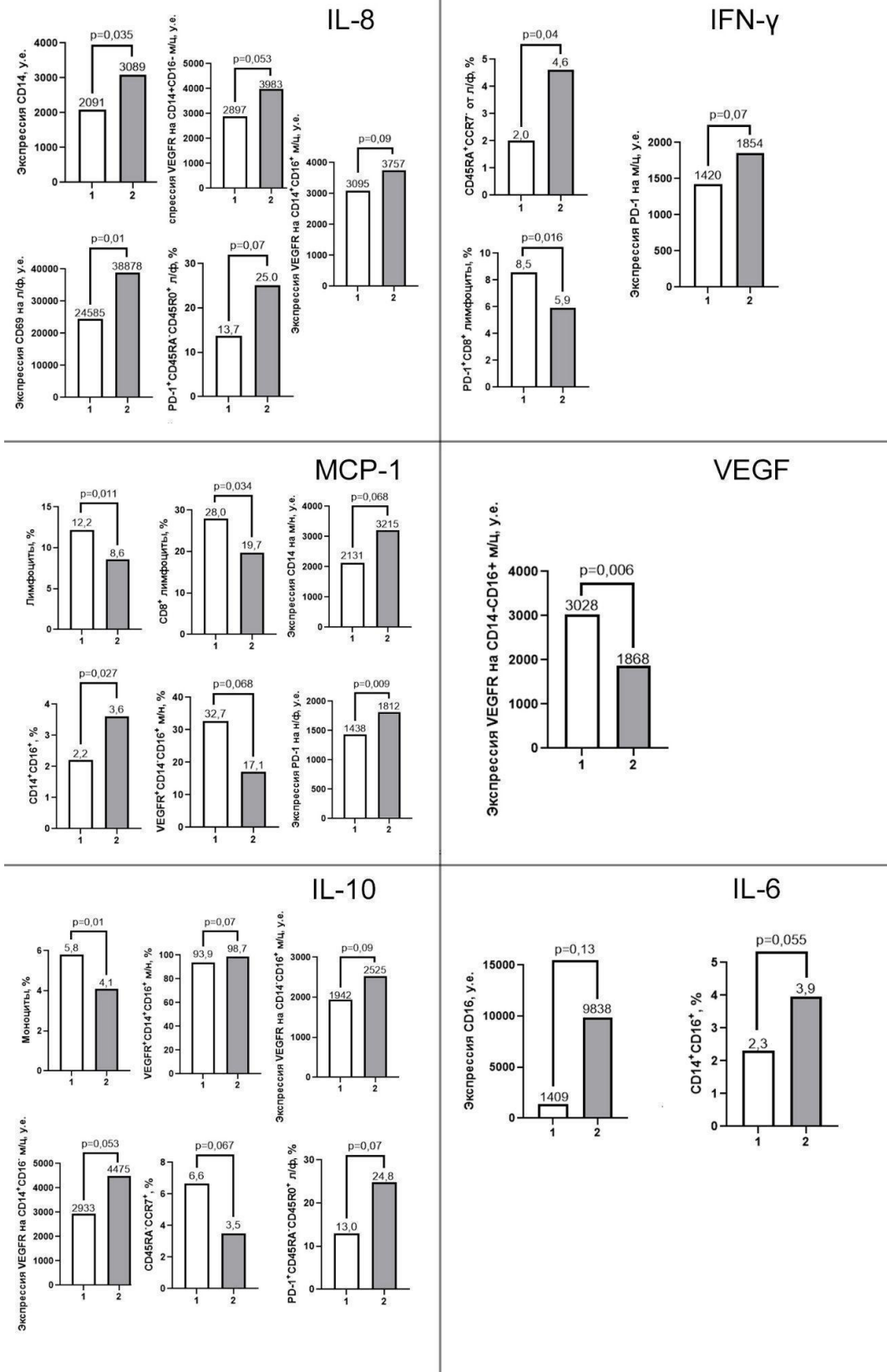


Рисунок 18 – Сопряженность уровня цитокинов и дисперсии иммунологических показателей у больных с впервые выявленным РЭ. 1 – содержание цитокина <Me, 2 – содержание цитокина >Me

Примечания: % – доля клеток; у.е. – условные единицы, в которых измеряется медиана интенсивности флюоресценции; р – уровень значимости различий.

Для ряда цитокинов была отмечена схожая направленность вызываемых изменений в иммунологических показателях. Так, более высокое содержание IL-8 и IL-10 сопровождалось увеличением экспрессии PD-1(CD279) на коммитированных $CD45RA^-CD45R0^+$ лимфоцитах и возрастанием VEGFR (CD309) на поверхности всех субпопуляций моноцитов (рисунок 14). Увеличение VEGF и MCP-1 было связано со снижением экспрессии рецептора к сосудисто-эндотелиальному фактору роста на поверхности $CD14^-CD16^+$ моноцитов неклассической субпопуляции (рисунок 14), а более высокое содержание IL-8 и MCP-1 в циркуляции было ассоциировано с увеличением экспрессии молекулы CD14 на моноцитах (рисунок 18).

Кроме того, увеличение уровня IL-8 сопровождалось более высоким количеством молекулы CD69 на лимфоцитах, характеризую их более выраженную степень активации (рисунок 18). Возрастание MCP-1 в циркуляции, с одной стороны, было ассоциировано с увеличением экспрессии PD-1(CD279) на нейтрофилах, а, с другой стороны, было связано со снижением количества лимфоцитов в целом и $CD8^+$ лимфоцитов (рисунок 18). Более высокие значения IL-10 сопровождались более низким количеством моноцитов и $CD45RA^-CCR7^+$ клеток эффекторной памяти (рисунок 18).

Увеличение содержания основного индуктора иммунного ответа IFN- γ в сыворотке крови у больных РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, было связано со снижением количества PD-1(CD279 $^+$) истощенных $CD8^+$ лимфоцитов и одновременно было связано с увеличением экспрессии иммуносупрессорной молекулы PD-1 на поверхности моноцитов. Более высокий уровень IFN- γ в периферической крови также был ассоциирован с более высоким количеством

CD45RA⁺CCR7⁻ терминально дифференцированных лимфоцитов (рисунок 18).

Высокий уровень в сыворотке крови пациенток IL-6 – цитокина, обладающего системным действием, сопровождался увеличением количества CD16⁺ моноцитов и экспрессии данной молекулы на поверхности клеток данной популяции (рисунок 18). Изменения содержания другого системного цитокина TNF-α в сыворотке крови пациенток с РЭ, неотягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, не были связаны с показателями, ассоциированными с молекулярно-клеточными механизмами действия пембролизумаба и ленватиниба.

Прогрессирование MSS/pMMR РЭ и проведенное по этому поводу противоопухолевое лечение, как было сказано выше, приводило к некоторому изменению содержания цитокинов в циркуляции (увеличение уровня IL-10). Однако, сопряженность цитокинов и дисперсии изучаемых иммунологических показателей, ассоциированных с молекулярно-клеточными механизмами пембролизумаба и ленватиниба, претерпела более выраженные изменения.

Основной направленностью связей большинства изученных цитокинов, при увеличении их содержания в крови, оказалось снижение количества клеточных популяций или уменьшение экспрессии функционально значимых молекул (рисунок 19). При этом IL-8, IFN-γ, TNF-α были связаны с одними и теми же популяциями клеток: CD16⁺ моноциты, CD14⁺CD16⁺ моноциты и CD309⁺CD14⁻CD16⁻ клетки моноцитарного гейта ($p < 0,1$; рисунок 19). Кроме того, высокий уровень IL-8 и TNF-α в циркуляции сопровождался снижением субпопуляции CD14⁻CD16⁺ неклассических моноцитов ($p = 0,057$, рисунок 19).

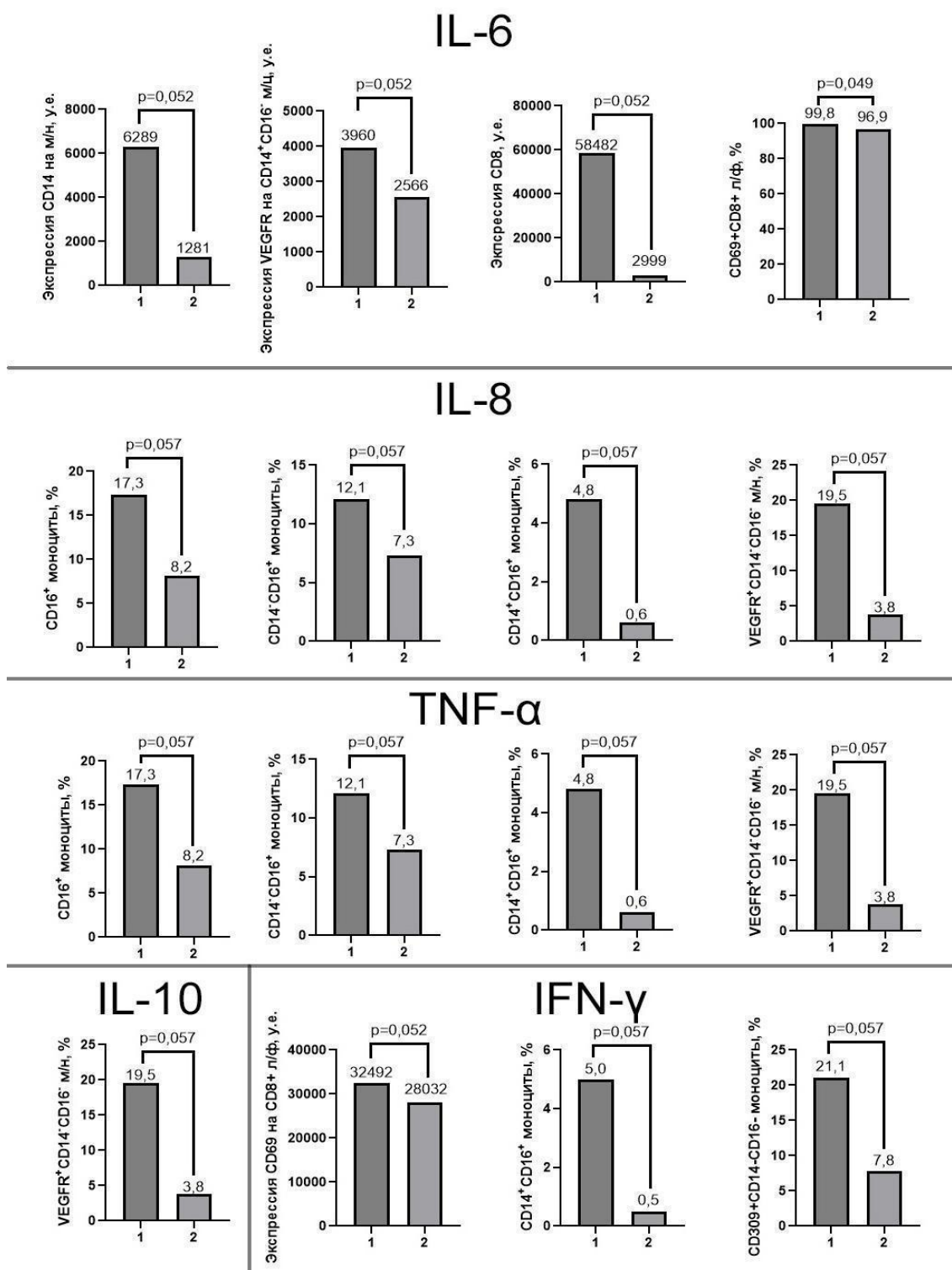


Рисунок 19 – Сопряженность уровня цитокинов и дисперсии иммунологических показателей у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ. 1 – содержание цитокина <Me, 2 – содержание цитокина >Me

Примечания: % – доля клеток; у.е. – условные единицы, в которых измеряется медиана интенсивности флюоресценции; p – уровень значимости различий.

Более высокая концентрация IL-6 была ассоциирована со снижением экспрессии молекулы CD14 ($p = 0,052$), рецептора к сосудисто-эндотелиальному фактору роста VEGFR(CD309) на поверхности моноцитов ($p = 0,052$), а также с уменьшением числа ко-рецептора антиген-распознающего рецептора лимфоцитов CD8 на клеточной мембране лимфоцитов ($p = 0,052$) и с более низким числом активированных $CD69^+CD8^+$ лимфоцитов ($p = 0,049$, рисунок 19). Высокий уровень иммуносупрессорного цитокина IL-10 был связан со снижением экспрессии молекулы активации CD69 на цитотоксических $CD8^+$ лимфоцитах ($p = 0,057$, рисунок 19).

Цитокины MCP-1 и VEGF не были связаны с дисперсией изучаемых иммунологических показателей.

Таким образом, в отличие от пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ основной направленностью эффектов большинства изученных цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ), при увеличении их содержания в крови, оказалось связано со снижением количества клеточных популяций или уменьшением экспрессии функционально значимых молекул.

3.11 Связь иммунологических показателей в циркуляции, в опухоли и в неизменной ткани у больных раком эндометрия

Поскольку микроокружение опухоли является ключевым звеном в реализации терапевтических эффектов ИТТ, нами было проведено исследование популяционной структуры ткани опухоли и проведено сравнение с одноименными параметрами в неизменной ткани эндометрия.

При сравнении популяционного состава неизменной ткани и опухоли было выявлено, что в опухолевой ткани наблюдалось существенное количественное преобладание $CD14^+$ моноцитов по сравнению с

неизменной ткани ($p = 0,04$), а экспрессия молекулы VEGFR на поверхности $CD14^+$ моноцитов оказалась слабее в опухолевой ткани ($p = 0,0009$, рисунок 20 А).

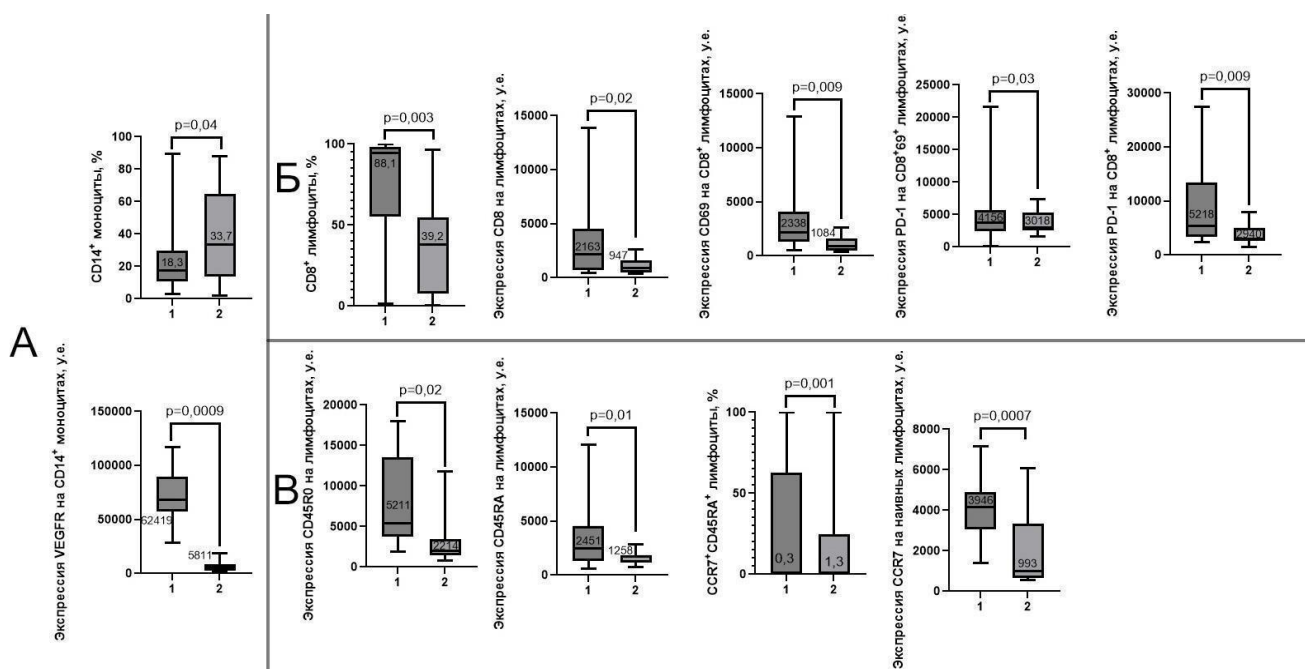


Рисунок 20 – Иммунологические показатели у пациенток с РЭ, неотягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, в неизменной и опухолевой ткани эндометрия: 1 – неизменная ткань эндометрия; 2 – опухолевая ткань эндометрия; А – популяции моноцитов; Б – популяции лимфоцитов; В – клетки памяти

Примечания: % – доля клеток; у.е. – условные единицы, в которых измеряется медиана интенсивности флюоресценции; p – уровень значимости различий.

Количество цитотоксических $CD8^+$ Т-лимфоцитов оказалось почти в 2 раза меньше в опухоли по сравнению с неизменной тканью ($p = 0,003$), как и экспрессия молекулы CD8 на их поверхности ($p = 0,02$, рисунок 20 Б). Количество $CD69^+CD8^+$ лимфоцитов было ниже в опухоли ($p = 0,006$), равно, как и экспрессия CD69 на $CD8^+$ лимфоцитах ($p = 0,009$), аналогично и экспрессия PD-1 на $CD8^+$ клетках в опухоли оказалась ниже, чем в неизменной ткани ($p = 0,009$). Количество $PD-1^+CD8^+$ лимфоцитов и $PD-1^+CD8^+CD69^+$ лимфоцитов оказалось ниже в опухоли ($p = 0,006$, рисунок 20 Б).

Уровень экспрессии CD45RO на поверхности лимфоцитов достоверно ниже в опухоли по сравнению с неизмененным эндометрием ($p = 0,02$, рисунок 20 В), также в опухоли достоверно ниже оказался уровень экспрессии CD45RA на лимфоцитах ($p = 0,01$, рисунок 20 В). Экспрессия молекулы CCR7 на поверхности наивных Т лимфоцитов оказалась слабее в опухоли по сравнению с неизменной тканью ($p = 0,0007$, рисунок 20 В).

Для выявления связи иммунологических параметров опухолевого микроокружения и неизменной ткани эндометрия с одноименными параметрами в периферической крови был проведен корреляционный анализ.

При проведении корреляционного анализа одноименных параметров в опухолевой ткани и периферической крови была выявлена положительная корреляция между уровнем CD8⁺ цитотоксических Т- лимфоцитов (CD8⁺) в периферической крови и долей активированных CD8⁺CD69⁺ Т-клеток в опухолевой ткани ($r = 0,489$, $p < 0,05$, рисунок 21).

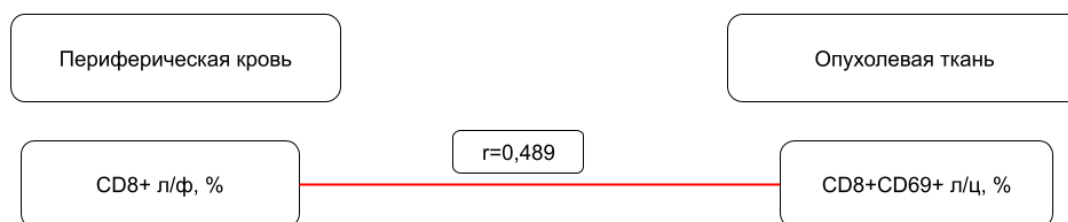


Рисунок 21 – Связь субпопуляций между периферической кровью и опухолевой тканью. Примечание: r – коэффициент корреляции

При проведении корреляционного анализа одноименных параметров периферической крови и неизменённой ткани эндометрия было выявлено, что доля CD45⁺ лимфоцитов в крови положительно коррелировала с числом CD14⁺ моноцитов в неизменённой ткани ($r = 0,781$, $p < 0,05$, рисунок 22). Были установлены прямые положительные связи между количеством CCR7⁺CD45RO⁺ Т-клеток в периферической крови и в неизменённой ткани эндометрия ($r = 0,757$, $p < 0,05$); количество CD45RO⁺ Т-клеток в периферической крови коррелировало с количеством CD45RO⁺ клеток

неизмененной ткани эндометрия ($r = 0,756$, $p < 0,05$); количество CCR7+CD45RA+ Т-клеток в периферической крови коррелировало с количеством CD45RA+ клеток в неизмененной ткани эндометрия ($r = 0,650$, $p < 0,05$, рисунок 22). Отрицательная корреляция была выявлена между уровнем CCR7+CD45RA+ Т-клеток в неизменённой ткани эндометрия и уровнем CCR7+CD45RO+ Т-клеток в периферической крови ($r = -0,660$, $p < 0,05$, рисунок 22).

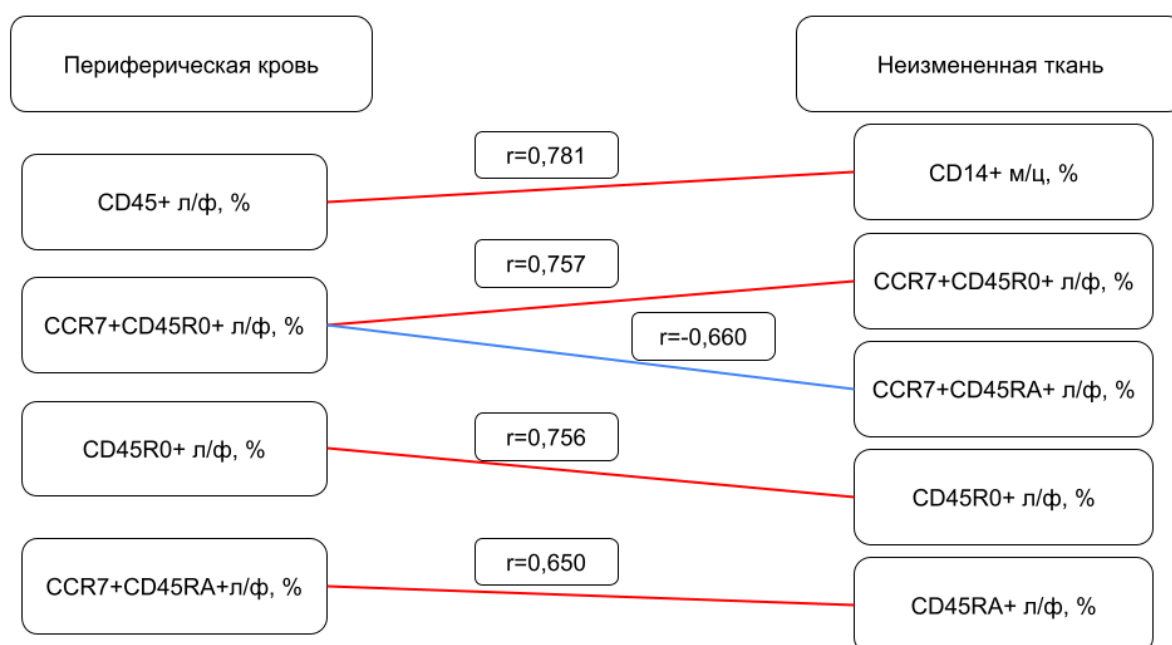


Рисунок 22 – Связь популяций между периферической кровью и неизменной тканью эндометрия

Примечание: r – коэффициент корреляции

При проведении корреляционного анализа одноименных параметров опухолевой и неизменённой тканей было выявлено, что количество CD45+ лимфоцитов в опухолевой ткани положительно коррелировало с количеством CD14+ моноцитов в неизменённой ткани ($r = 0,488$, $p < 0,05$); уровень CD45RO+ и CCR7+CD45RO+ лимфоцитов опухолевой ткани положительно коррелировал с аналогичными популяциями в неизмененной ткани эндометрия ($r = 0,521$ и $r = 0,486$ соответственно, $p < 0,05$, рисунок 23). Также зафиксированы высокие значения корреляций между количеством

CCR7+CD45RA+ клеток в опухоли и количеством CD45RO+ ($r = 0,700$, $p < 0,05$), CCR7+CD45RO+ ($r = 0,544$, $p < 0,05$) и CCR7+CD45RA+ ($r = 0,780$, $p < 0,05$) клеток в неизменённой ткани эндометрия. Уровень CD45RA+ клеток в опухоли также положительно связан с уровнем CCR7+CD45RO+ ($r = 0,539$, $p < 0,05$) и CCR7+CD45RA+ ($r = 0,828$, $p < 0,05$) в неизменённой ткани эндометрия (рисунок 23).

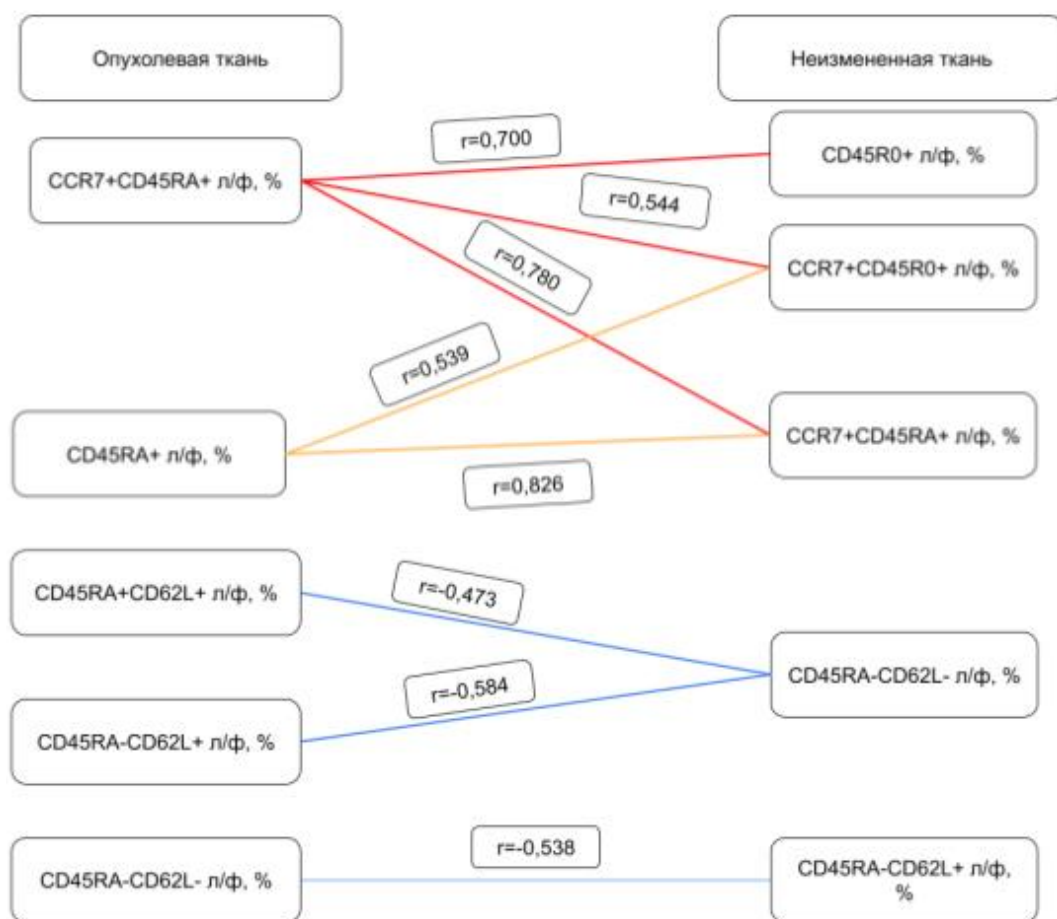


Рисунок 23 – Связь субпопуляций между опухолевой и неизмененной тканью

Примечание: r – коэффициент корреляции

Отрицательная корреляция обнаружена между уровнем CD45RA+CD62L+ в опухоли и уровнем CD45RA-CD62L- в неизменённой ткани ($r = -0,473$, $p < 0,05$), а также между количеством CD45RO+CCR7+ в опухоли и количеством CD45RA-CD62L- в неизмененной ткани эндометрия

($r = -0,584$, $p < 0,05$). Обратная связь ($r = -0,538$, $p < 0,05$) также отмечена между долей CD45RO+CCR7+ в неизменной ткани эндометрия и долей CD45RA-CD62L- в опухоли (рисунок 23).

Таким образом, при сопоставлении опухолевой и неизменной ткани эндометрия выявлены существенные различия в составе и активационном статусе иммунных клеток, отражающие опухолево-индуцированную модификацию локального иммунного фона. Наиболее выраженное различие наблюдалось в отношении CD8+ Т-лимфоцитов (рисунок 23).

Проведенный корреляционный анализ позволил выявить связи между иммунными клетками различных анатомических зон (периферическая кровь, неизменная ткань эндометрия и опухолевая ткань) у пациенток с первичным раком эндометрия. Эти ассоциации не только подтверждают участие как локального, так и системного иммунитета в противоопухолевом процессе, но и указывают на конкретные миграционные траектории и механизмы функциональной дифференцировки клеток (рисунки 21, 22, 23).

3.12 Связь частоты соматических мутаций генов, вовлеченных в патогенез рака эндометрия, в опухоли с эффективностью иммунотаргетной терапии у больных MSS/pMMR раком эндометрия

Наличие соматических мутаций в опухоли способно оказывать модулирующее воздействие на опухолевое микроокружение, которое активно участвует в реализации терапевтических эффектов ИТТ.

Для исследования влияния соматических мутаций, которые включены в патогенез РЭ и могут быть связаны с эффективностью ИТТ, были подобраны следующие варианты: 12, 13 и 61 кодоны 3 экзона гена *KRAS*, ассоциированные с резистентностью к ингибиторам тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста; 9 и 20 экзоны гена *PIK3CA*, ассоциированный с чувствительностью к ингибиторам тирозинкиназ;

Также у пациенток был оценен статус микросателлитной нестабильности, который ассоциирован со структурно-функциональными нарушениями системы репарации неспаренных оснований ДНК.

Было отмечено, что мутантный вариант гена *KRAS* 12-13 чаще встречается у пациенток с прогрессированием MSS/pMMR РЭ, но пока не достигнут уровень статистической значимости (таблица 7).

Таблица 7 – Частота встречаемости мутантных вариантов исследуемых генов у пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, и прогрессирующим MSS/pMMR РЭ

Мутантный вариант гена	Частота встречаемости у больных РЭ, не отягощенных опухолевой прогрессией и противорецидивной терапией	Частота встречаемости у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ	p
<i>KRAS</i> 12-13	0,11	0,4	0,6
<i>KRAS</i> 61	0	0	0,8
<i>PIK3CA</i> 9	0	0	-
<i>PIK3CA</i> 20	0,11	0	-

Было проведено исследование того, как связана частота встречаемости мутантных вариантов исследуемых генов с эффективностью проводимой ИТТ, в результате которого было установлено, что мутантный вариант гена *KRAS* 12-13 чаще встречается у пациенток с эффективной ИТТ, но пока не достигнут уровень статистической значимости (таблица 8).

Таблица 8 – Частота встречаемости мутантный вариантов исследуемых генов в зависимости от эффективности проводимой ИТТ

Ген	Эффективная ИТТ		Неэффективная ИТТ		Р
	Дикий тип	Мутантный тип	Дикий тип	Мутантный тип	
<i>KRAS</i> 12-13	0,5	0,5	1	0	0,6
<i>KRAS</i> 61	0,75	0,25	1	0	00,8
<i>PIK3CA</i> 9	1	0	1	0	-
<i>PIK3CA</i> 20	1	0	1	0	-

Таким образом мутантный вариант гена *KRAS* 12-13 на уровне статистической тенденции может быть ассоциирован с прогрессированием РЭ и эффективностью ИТТ, но требуется дальнейшее изучение.

3.13 Связь наличия соматических мутаций генов, вовлеченных в патогенез рака эндометрия, в опухоли с изучаемыми иммунологическими показателями *in situ* у больных раком эндометрия

Была изучена связь наличия соматических мутаций с субпопуляционной структурой микроокружения опухоли.

Наличие мутаций *KRAS* 12-13 и *PIK3CA* 20 в опухоли эндометрия было ассоциировано с более высоким относительным количеством $CD8^+CD69^+$ лимфоцитов ($p = 0,071$), наивных $CD45RA^+CD62L^+$ Т-лимфоцитов ($p = 0,071$) и увеличением экспрессии молекулы *CD45RA* на их поверхности ($p = 0,071$), увеличением количества $CD45R0^+$ коммитированных лимфоцитов ($p = 0,071$), $CCR7^+ CD45R0^+$ клеток центральной памяти ($p = 0,065$), по сравнению с тканью опухоли без исследованных мутаций. При этом на уровне статистической тенденции была отмечена ассоциация наличия

вышеуказанных мутаций в опухоли со снижением количества $CD45RA^+CD62L^-$ терминально дифференцированных лимфоцитов ($p = 0,071$) и $CD45RA^+CD27^-CD28^-$ эффекторных Т-лимфоцитов, по сравнению с тканью опухоли без исследованных мутаций (рисунок 24).

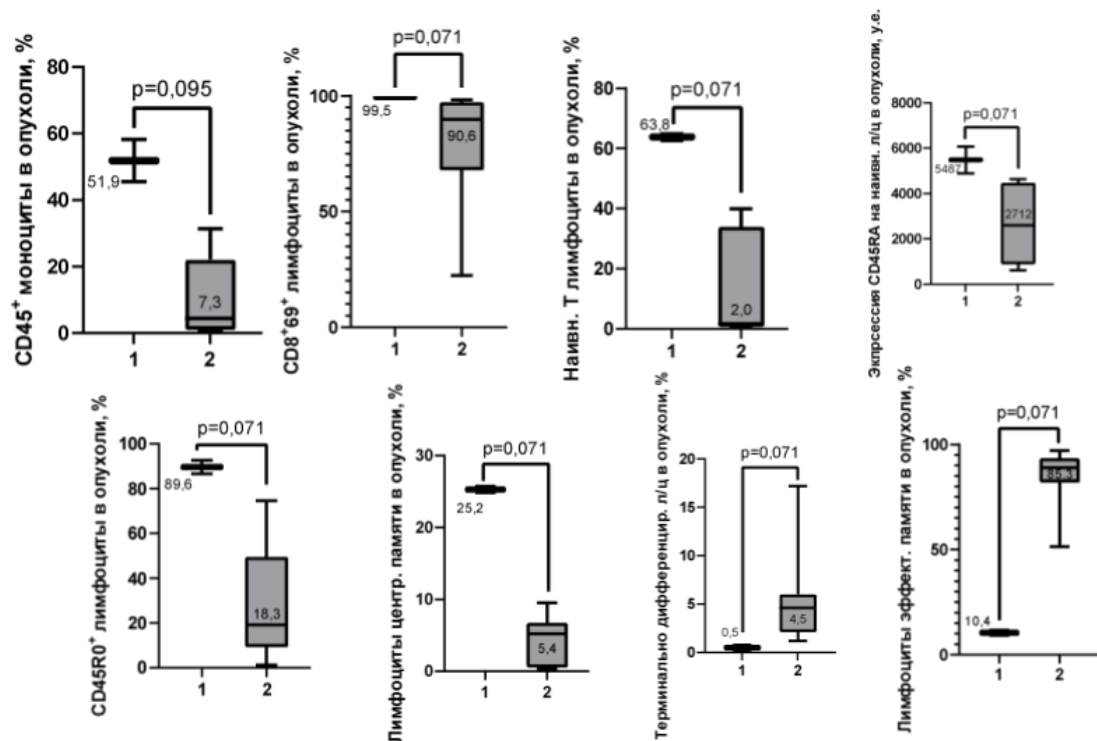


Рисунок 24 – Влияние наличия мутаций на популяционный состав опухолевого микроокружения РЭ. 1 - наличие мутаций, 2 - отсутствие мутаций

Примечания: % – доля клеток; у.е. – условные единицы, в которых измеряется медиана интенсивности флуоресценции; p – уровень значимости различий.

Таким образом достоверно значимых различий не было обнаружено, однако наблюдается статистическая тенденция к связи наличия мутаций в генах *KRAS 12-13* и *PIK3CA 20* с изменениями в популяционном составе опухолевого микроокружения, так что требуется дальнейшее исследование данного аспекта, который может стать важным для проведения эффективной ИТТ.

3.14 Оценка предиктивной ценности иммунологических параметров как маркеров эффективности иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия

Для оценки прогностической ценности выявленных ранее параметров (экспрессия CD14 на моноцитах, доля $\text{VEGFR}^+\text{CD14}^+\text{CD16}^-$ моноцитов, экспрессия VEGFR на $\text{CD14}^-\text{CD16}^+$ моноцитах, доля PD-1^+ лимфоцитов, доля $\text{PD-1}^+\text{CD8}^+$ лимфоцитов, доля $\text{PD-1}^+\text{CD45RO}^+$ лимфоцитов, доля $\text{PD-1}^+\text{CD45RA}^+\text{CD45RO}^-$ лимфоцитов, доля $\text{CD8}^+\text{CD69}^+$ лимфоцитов, доля $\text{CCR7}^+\text{CD45RO}^+$ лимфоцитов), был проведен ROC-анализ. Результаты анализа показали статистическую значимость только для одного параметра - доли $\text{CD8}^+\text{CD69}^+$ активированных цитотоксических лимфоцитов ($p = 0,038$, рисунок 25).

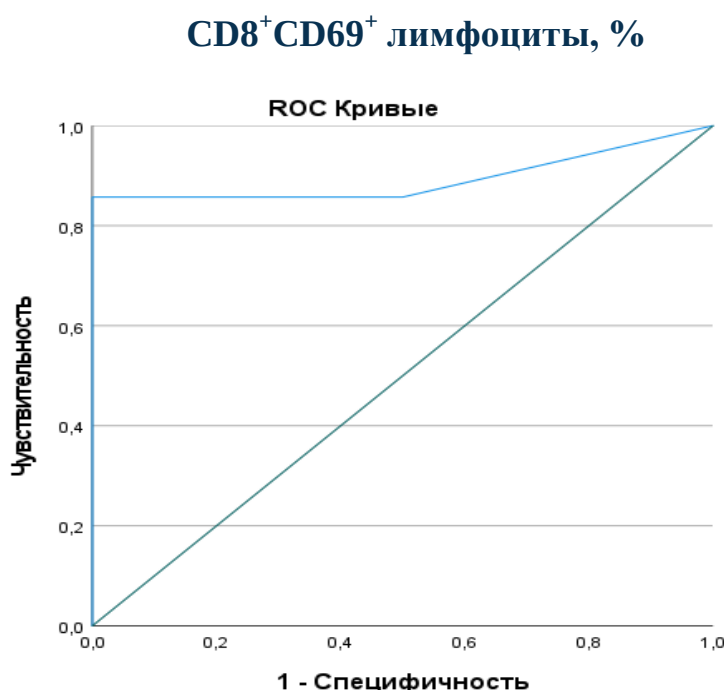


Рисунок 25 – ROC-анализ значимости количества $\text{CD8}^+\text{CD69}^+$ лимфоцитов в периферической крови в качестве предиктора эффективности ИТТ у пациентов с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ

Площадь под кривой составила 0,89 (95 % ДИ 0,68-1,00; $p = 0,038$), а пороговое значение эффективности предсказательного маркера (доля $CD8^+CD69^+$ активированных цитотоксических лимфоцитов, измеряемая в % от общего числа $CD8^+$ цитотоксических лимфоцитов периферической крови) равнялось 99,5 %. Доля $CD8^+CD69^+$ в периферической крови превышала порог 99,5 % у 75 % пациентов с неэффективной ИТТ (3/4) и у 16,6 % пациентов с эффективной ИТТ (1/6). Чувствительность предиктивного критерия составила 85,7 %, а специфичность 100 %.

Полученные данные позволяют использовать выявленный предиктивный критерий прогнозирования эффективности ИТТ у пациентов с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ.

3.15 Решающее правило для прогноза эффективности иммунотаргетной терапии у больных с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия

Для формирования решающего правила на основе полученных нами ранее клинико-морфологических характеристик и иммунологических параметров, ассоциированных с эффективной и неэффективной иммунотаргетной терапией была использована формула Байеса.

В результате выполнения данной процедуры была создана анкета для определения эффективности назначаемой ИТТ пациентам с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия (таблица 9).

Таблица 9 – анкета для определения эффективности назначаемой иммунотаргетной терапии у пациентов с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия

Признаки	Наличие	Диагностический коэффициент	Информативность признака
Степень дифференцировки G1-G2	Да	7,26	4,40
	Нет	-6,28	
Единичные очаги прогрессирования	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 периферической крови	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, представленные в решающем правиле. При сумме баллов “+13” с 95 % долей вероятности длительность ВБП при применении ИТТ составит более 12,6 месяцев.

ГЛАВА 4

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сейчас поиск способов повышения эффективности проводимой ИТТ у больных с прогрессирующим РЭ со стабильным статусом опухоли является актуальной задачей. Важно изучать механизмы, лежащие в основе терапевтической эффективности ИТТ.

В рамках многоцентрового неинтервенционного наблюдательного исследования в реальной клинической практике нами были оценены отдаленные результаты ИТТ 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 $29,69 \pm 7,05$ %. Также нами была определена медиана ОВ, составившая 23 месяца (рисунок 2).

В предыдущей работе, в которой мы оценивали результаты 18-месячного наблюдения за пациентками с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ, приведен показатель мВБП, равный 9,8 месяцев [105]. Увеличение срока наблюдения до 45 месяцев привело к увеличению данного показателя до 12,6 месяцев (рисунок 3).

Эти результаты соотносятся с результатами исследования KEYNOTE 309, где при двухлетнем наблюдении установлена мВБП составившая 7,2 месяцев [81], которая, затем, при увеличении срока наблюдения до 30 месяцев составила 12 месяцев, и данный показатель остается на том же уровне даже при увеличении срока наблюдения до 42 месяцев, медиана ОВ составила 31,3 месяца [106].

При анализе ВБП в группе пациенток, у которых данное событие наступило ранее 12,6 месяцев, было выявлено, что мВБП составила 4,05 месяца (рисунок 4). В группе пациенток, переживших 12,6 месяцев без прогрессирования, мВБП не была достигнута (рисунок 5). Следовательно, если прогрессирование MSS/pMMR РЭ при проводимой ИТТ не наступит в срок ранее 12,6 месяцев, то вероятность дальнейшего прогрессирования становится минимальной. Пациентки должны иметь клинимо-морфологические характеристики, приводящие к такому различию в течении заболевания.

С использованием Log-Rank метода нами был проведен анализ влияния клинимо-морфологических особенностей пациенток на эффективность ИТТ. На основании проведенного исследования были выявлены клинимо-морфологические параметры, ассоциированные с длительностью ВБП при проведении ИТТ: степень дифференцировки опухоли (рисунок 6, $p = 0,04$), наличие очагов прогрессирования (рисунок 7, $p = 0,09$) и метастазы в головной мозг (рисунок 8, $p = 0,02$).

Также было проведено сравнение подгрупп пациенток с различной длительностью ответа на ИТТ по выраженности клинических и морфологических характеристик. При сравнении данных параметров у пациенток с MSS/pMMR РЭ в зависимости от длительности ВБП был составлен клинимо-морфологический “портрет” больной, у которой проведение ИТТ будет эффективно (таблица 5).

Параметры “степень дифференцировки опухоли G1-G2” и “единичные очаги прогрессирования” (поражение тазовых или парааортальных лимфоузлов, или легких, или костей, или головного мозга) говорят о том, что в случае менее распространенного прогрессирующего MSS/pMMR РЭ применение ИТТ более эффективно. Более того, наличие такого признака как “метастазы в головной мозг”, хоть и встречалось редко (5 % пациентов), но во всех случаях было ассоциировано с низкой выживаемостью.

Особый интерес представляет присутствие в “портрете” пациентки, длительно отвечающей на ИТТ, такого признака как “наличие эмболов в лимфо-васкулярных протоках”. С позиции опухолевой прогрессии данный фактор является крайне неблагоприятным, так как связан с диссеминацией опухоли [16]. При этом опухолевые клетки оказываясь в лимфо-васкулярных протоках подавляют противоопухолевый иммунный ответ [107]. Однако, в условиях ИТТ, при которой пембролизумаб отменяет иммуносупрессию лимфоцитов, агрессивные свойства опухолевых клеток, вероятно, дополнительно стимулируют иммунный ответ, что приводит к терапевтическому эффекту.

Также была выявлена ассоциация с неэффективной ИТТ таких параметров как: степень дифференцировки опухоли G3, говорящая о высокой степени злокачественности заболевания, и наличие опухолевых очагов в головном мозге, говорящее об активно идущем метастатическом распространении опухоли (таблица 5).

Из экспериментальных исследований известно, что терапевтические эффекты пембролизумаба и леватиниба связаны с модуляцией иммунологических механизмов: восстановление цитотоксичности CD8⁺T-лимфоцитов в отношении опухолевых клеток [67], изменение субпопуляционной структуры пула лимфоцитов (траектории развития) [108, 109], блокирование ангиогенной активности опухолеассоциированных макрофагов, угнетение T-регуляторных клеток [110], то важным является изучение связи иммунологических параметров с эффективностью ИТТ.

Однако также хорошо известно, что опухолевая прогрессия и проводимое противоопухолевое лечение и, в частности, цитостатические агенты оказывают выраженное воздействие на иммунную систему [111, 112], что может определить эффективность дальнейших терапевтических стратегий, основанных на иммунологических механизмах [113].

Поэтому мы поставили себе задачу изучить как в ходе конвенциональной терапии изменяется субпопуляционная структура

иммунологических клеток периферической крови, связанных с действием ИТТ, назначаемых уже после прогрессирования на фоне ранее проведенного лечения.

На первом этапе данного исследования мы провели сравнение показателей, ассоциированных с основными механизмами вовлечения эффекторов иммунной системы в реализацию терапевтических эффектов пембролизумаба и ленватиниба.

Исследование показало, что вызвавшие наш интерес потенциальные эффекторы терапевтического действия пембролизумаба и ленватиниба подвергаются влиянию опухолевой прогрессии и противоопухолевого лечения при РЭ (рисунок 9). Так, отмечено статистически значимое снижение $\text{VEGFR}^+\text{CD14}^+\text{CD16}^-$ моноцитов классической субпопуляции по сравнению с показателями больных РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением MSS/pMMR РЭ (рисунок 9 А). Классические $\text{CD14}^+\text{CD16}^-$ моноциты являются предшественниками М1-макрофагов и, следовательно, пополняют популяцию цитотоксических ОАМ, способных элиминировать злокачественные клетки [114]. Снижение их числа неблагоприятно для течения опухолевого процесса.

Увеличение экспрессии PD-1(CD279) как на поверхности лимфоцитов в общем пуле, так и на CD8^+ лимфоцитах при прогрессировании на фоне проводимого лечения, по сравнению с группой больных с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, определяет их как мишени для атаки PD-L^+ опухолевыми клетками, следствием чего является анергия или апоптоз клеток иммунной системы (рисунок 9 Б) [115, 116].

Функция терминально дифференцированных эффекторов с фенотипом $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^-$ и $\text{CD45RA}^+\text{CD27}^-\text{CD28}^-$ в настоящее время до конца не определена. Их рассматривают как конечный этап развития лимфоцитов [117]. Вероятно, возрастание при прогрессировании количества клеток, находящихся на этапе завершения функционирования, и одновременное

снижение $CD45R0^+CCR7^+$ клеток центральной памяти, определяющих возможность быстрой индукции иммунного ответа, является неблагоприятным фактором противоопухолевой защиты (рисунок 9 В).

Иммунотаргетная терапия была внедрена в практику лечения РЭ сравнительно недавно. Вероятно, в связи с этим в литературе отсутствуют сведения о состоянии иммунной системы больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ при ИТТ. 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.

Прежде всего, стоит отметить увеличение экспрессии CD14 - рецептора к липополисахаридам на поверхности моноцитов (рисунок 10 А). Данный факт следует расценить как сдвиг функционального профиля моноцитов в сторону M1-поляризации клеток моноцитарно-макрофагального ряда, поскольку липополисахариды - индуктор M1 поляризации [114].

Под влиянием ИТТ происходит возрастание числа $VEGFR^+CD14^+CD16^-$ моноцитов классической субпопуляции и увеличение экспрессии VEGFR на поверхности клеток данного пула, тогда как число данных рецепторов на $CD14^-CD16^+$ моноцитах неклассической субпопуляции снижается (рисунок 10 Б). Полученные данные детализируют известную из литературы негативную роль $VEGFR^+$ моноцитов в опухолевой прогрессии. Без сомнения, данная популяция моноцитов, превращаясь *in situ* в ОАМ, содействует ангиогенезу в опухоли [118, 119]. Известно, что одной из молекулярных мишеней ленватиниба является тирозинкиназа рецептора сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGFR(CD309) [120]. Через ингибирование взаимодействия VEGF/VEGFR ленватиниб способен блокировать опухолестимулирующее влияние $VEGFR^+$ макрофагов [110]. Однако полученные данные говорят о возможном селективном действии

ленватиниба на моноциты определенного функционального профиля: препарат оказывает угнетающее влияние на $CD14^+CD16^+$ моноциты и стимулирует $CD14^+CD16^-$ моноциты (рисунок 10 Б). При этом субпопуляция классических моноцитов является ресурсом провоспалительных M1-макрофагов с цитотоксическим потенциалом, что может способствовать элиминации опухолевых клеток.

Отмеченное при проведении ИТТ уменьшение количества $CD279(PD-1)^+$ лимфоцитов, в том числе, и $CD279(PD-1)^+CD8^+$ лимфоцитов (рисунок 10 В), по-видимому, обусловлено связыванием данной молекулярной мишени с моноклональным антителом – пембролизумабом. Клиническое значение отмеченного феномена заключается в том, что при проведении ИТТ снижается доля лимфоцитов, потенциально подверженных воздействию молекулы PD-L, экспрессируемой опухолевыми клетками или ОАМ, что в целом может быть связано с отменой иммуносупрессирующего влияния опухоли и с увеличением цитотоксического действия лимфоцитов, отражаемого в показателях эффективности ИТТ.

Важным аспектом проведенного исследования было сравнение динамики иммунологических показателей, связанных с механизмами действия пембролизумаба и ленватиниба, у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в зависимости от эффективности ИТТ. Поскольку до начала ИТТ для пациенток с различным ответом на лечение выявлено лишь одно различие в исследуемых показателях на уровне статистической тенденции (более высокое количество $CD14^+CD16^+$ моноцитов в группе прогрессирования на фоне ИТТ, рисунок 11 А), то мы объединили пациенток до ИТТ с ответом на терапию и без ответа в одну группу и сравнили эти параметры с показателями в момент прогрессирования у пациенток с неэффективной терапией или при последнем наблюдении у больных с эффективным применением препаратов.

Изменения иммунологических показателей при проведении ИТТ у пациенток с длительностью ответа менее 12,6 месяцев затронули лишь

популяцию моноцитов. Именно в этой группе пациенток отмечено возрастание к моменту прогрессирования $\text{VEGFR}^+\text{CD14}^-\text{CD16}^-$ клеток моноцитарного гейта и экспрессии данного рецептора как на $\text{CD14}^-\text{CD16}^-$ клетках, так и на моноцитах промежуточной популяции (рисунок 12). Полученные данные соотносятся с литературными данными о том, что VEGFR^+ клетки моноцитарно-макрофагального ряда способствуют росту опухоли [121]. Иными словами, 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 периферической крови при продолжающемся прогрессировании MSS/pMMR РЭ (рисунок 12).

Для пациенток с эффективной ИТТ (длительность выживаемости без прогрессирования более 12,6 месяцев) характерна иная динамика показателей. Именно она определила изменения состояния иммунной системы, которое мы описали выше для общей группы больных, получивших ИТТ: увеличение экспрессии CD14 на моноцитах (рисунок 13 А), увеличение количества VEGFR^+ моноцитов классической субпопуляции и снижение экспрессии VEGFR на поверхности $\text{CD14}^-\text{CD16}^+$ моноцитов промежуточной субпопуляции у больных РЭ (рисунок 13 А), снижение доли PD-1 экспрессирующих лимфоцитов и $\text{PD-1}^+\text{CD8}^+$ лимфоцитов (рисунок 13 Б). Поскольку данная динамика показателей связана с длительным ответом на лечение, то очевидно ее следует рассматривать как маркер эффективности ИТТ.

Однако были отмечены и специфические изменения иммунологических показателей при проведении эффективной ИТТ. Так, выявлено снижение количества коммитированных $\text{PD-1}(\text{CD279})^+\text{CD45R0}^+$ лимфоцитов и увеличение $\text{PD-1}(\text{CD279})^+\text{CD45RA}^+\text{CD45R0}^-$ наивных лимфоцитов (рисунок 13 Б). Подобная динамика свидетельствует, вероятно, о том, что действие пембролизумаба направлено на функционально зрелые эффекторы.

Статистически значимое увеличение количества $CD8^+CD69^+$ активированных лимфоцитов и увеличение $CCR7^+CD45RO^+$ коммитированных лимфоцитов говорит об индукции иммунного ответа, т.к. лимфоциты коммитированы антигеном и способны к миграции в лимфоидные органы для дальнейшей дифференцировки и взаимодействия с мишенью (рисунок 13 В) [117].

Более того, если до начала ИТТ у пациенток с эффективной и неэффективной терапией состояние иммунной системы различалось лишь одним показателем на уровне статистической тенденции, то к моменту достижения исхода (прогрессирование при проведении лечения в течение 12,6 месяцев или отсутствие прогрессирования более 12,6 месяцев) отличия отмечены для ряда параметров, связанных с молекулярно-клеточными механизмами терапевтического действия пембролизумаба и леватиниба, таких как количество моноцитов в целом и $CD16^+$ моноцитов, экспрессия VEGFR на $CD14^+CD16^+$ моноцитах промежуточной субпопуляции и $CD14^-CD16^-$ клетках моноцитарного гейта, количество $CD8^+$ лимфоцитов (рисунок 11 Б).

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 такому изменению ряда параметров (количество $VEGFR^+CD14^+CD16^-$ моноцитов, количество PD-1⁺ нейтрофилов, экспрессия PD-1 на лимфоцитах, количество $CD45RA^+CD27^-CD28^-$ наивных лимфоцитов), что эти показатели достигают значений у пациенток с РЭ, неотягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением (рисунок 14).

По-видимому, эффективная ИТТ приближает морфофункциональное состояние иммунной системы к статусу, обеспечивающему противоопухолевую защиту, компенсируя неблагоприятное влияние опухолевой прогрессии и цитостатического лечения. На основании этого

наблюдения становится перспективной возможностью применения ИТТ у пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противорецидивным лечением, когда иммунная система еще обладает собственными ресурсами для осуществления эффективного противоопухолевого ответа. Это предположение подтверждается полученными результатами многоцентрового клинического исследования 3 фазы 309/Keynote 775, показавшего преимущество использования ИТТ в первой линии противорецидивной терапии по сравнению с ХТ [106].

Одним из главных механизмов элиминации опухоли является разрушение её клеток с помощью цитотоксических лимфоцитов, мигрирующих в ткань из циркуляции. Кроме того, применение анти-PD-1 иммунотаргетных препаратов способно восстанавливать истощенные цитотоксические CD8⁺Т-лимфоциты, способствуя улучшению их противоопухолевой активности [122].

На основании вышесказанного нами было проведено исследование *in vitro* цитотоксической активности лимфоцитов периферической крови, полученных у пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, и больных с прогрессирующим РЭ во время ИТТ по отношению к клеткам, выделенным из опухолевой ткани эндометрия.

На ранних этапах ИТТ (2 месяца) приводила к снижению индекса цитотоксичности лимфоцитов в 1,53 раза, не достигшему уровня статистической значимости. Однако к 6-ти месяцам терапии индекс цитотоксичности возрастал на 183 % ($p < 0,05$) относительно сниженного уровня и приближался к значениям у пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением (рисунок 15). Длительное применение ИТТ приближает цитотоксическую активность лимфоцитов у кровню больных РЭ, не отягощенных прогрессированием и противорецидивной терапией, что, вероятно, обеспечивает элиминацию опухолевых клеток.

Одним из важнейших факторов регуляции иммунной системы, несомненно, являются цитокины [123]. 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 (в том числе остециты, хондроциты, адипоциты, миоциты и т.д.) а также опухолевые клетки [124]. На основании этого нами было проведено исследование влияния проводимой ИТТ на изменение уровня цитокинов.

Опухолевая прогрессия и проведенная по этому поводу противоопухолевая терапия привели к увеличению содержания IL-10 у пациенток с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ в сравнении с соответствующим показателем у пациенток с РЭ, неотягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением (таблица 5). IL-10 является амбивалентным регуляторным фактором, поскольку одновременно способствует опухолевому росту и прогрессированию заболевания (за счет ингибирования Т-хелперов 17 и макрофагов), а с другой стороны имеет противоопухолевую активность (за счет стимулирования пролиферации CD8⁺ Т-лимфоцитов и усиления их цитотоксической активности по отношению к клеткам опухоли) [125]. В настоящее время отсутствуют клинические сведения о влиянии повышенного содержания IL-10 на прогрессирование РЭ, однако в эксперименте *in vivo* было показано, что CD146⁺ опухолеассоциированные фибробласты могут способствовать прогрессированию рака эндометрия индуцируя ангиогенез и васкулогенез за счет активации пути IL-10/JAK1/STAT3 [126].

Также мы провели оценку того, как ИТТ может влиять на изменение уровня цитокинов.

Первые 6 месяцев ИТТ значимых изменений цитокинов в сыворотке не наблюдается, однако при длительном воздействии ИТТ сопряжена со статистически значимым снижением уровня IL-6 (роль которого в инвазии и

диссеминации опухоли известна из литературы [127]) и IL-8, ровно как и IL-10 ($p < 0,05$, рисунок 16). Вероятно, установленное нами снижение уровня цитокинов в на фоне длительной ИТТ свидетельствует об отмене системного регуляторного влияния опухоли.

Эффективная ИТТ у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ оказалась связана с изменением концентраций множества цитокинов. Например, уровень IL-8 снижался при проведении лечения по сравнению с показателем до ИТТ, в то время как у больных с прогрессированием данный показатель не изменялся (рисунок 17), что является неблагоприятным признаком, поскольку, из литературы известна его роль в прогрессировании РЭ [128]. При эффективной ИТТ также было отмечено увеличению в несколько раз уровня MCP-1 в сравнении с соответствующим показателем при неэффективной терапии ($p < 0,05$, рисунок 17).

Данный факт, вероятно, указывает на снижение воспаления, индуцированного опухолью, при эффективном лечении. MCP-1 – основной хемоаттрактант клеток моноцитарно-макрофагального ряда и определяет их миграцию в ткани, в том числе и в опухоль [129]. Связь более высокого уровня MCP-1 с эффективной ИТТ, по-видимому, свидетельствует о привлечении в опухоль моноцитов и макрофагов, обладающих цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток. Кроме того, вне зависимости от эффективности ИТТ отмечено снижение содержания IFN- γ в точке оценки исхода по сравнению с уровнем до начала ИТТ ($p < 0,05$, рисунок 17), что также указывает на снижение системного воспаления при применении пембролизумаба и ленватиниба [130].

Таким образом, эффективность ИТТ у больных РЭ связана с ответом иммунной системы на проводимое лечение. Однако остается открытым вопрос, какими факторами определяется возможность ответа иммунной системы на ИТТ.

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 взаимного влияния содержания цитокинов в периферической крови со структурой изучаемых иммунологических показателей. С этой целью каждая из групп исследования была разделена на 2 подгруппы – с низким ($<Me$) и высоким ($>Me$) содержанием биологического фактора.

В отличие от пациенток с РЭ, не отягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, у больных с прогрессирующим MSS/pMMR РЭ основной направленностью связей большинства цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ), при увеличении их содержания в крови, оказалось снижение количества клеточных популяций или уменьшение экспрессии функционально значимых молекул.

В аспекте направленности изменений показателей иммунной системы, происходящих под влиянием ИТТ, положительным можно признать ассоциативные изменения уровня провоспалительных цитокинов IL-8, TNF- α , IFN- γ , увеличение которых сопровождалось снижением популяций, связанных с неэффективностью комбинации пембролизумаба и леватиниба у больных прогрессирующим MSS/pMMR РЭ, таких как CD16⁺ моноциты, CD14⁺CD16⁺ моноциты ($p = 0,057$) и CD309⁺CD14⁻CD16⁻ клетки моноцитарного гейта ($p = 0,057$, рисунок 19). Эффекты провоспалительного цитокина системного действия IL-6 связаны с изменениями в иммунной системе, характерными для неэффективной ИТТ: увеличение его содержания было ассоциировано со снижением экспрессии молекулы CD14 ($p = 0,052$), рецептора к сосудисто-эндотелиальному фактору роста VEGFR(CD309) на поверхности моноцитов ($p = 0,052$), а также с уменьшением числа ко-рецептора антиген-распознающего рецептора лимфоцитов CD8 на клеточной мембране лимфоцитов ($p = 0,052$) и с более низким числом активированных CD69⁺CD8⁺ лимфоцитов ($p = 0,049$, рисунок 19).

При анализе связи регуляторного влияния цитокинов на иммунологические показатели пациенток с РЭ, неотягощенных прогрессированием и противоопухолевым лечением, ассоциированные с молекулярно-клеточными механизмами терапевтического действия пембролизумаба и ленватиниба при лечении прогрессирующего MSS/pMMR РЭ, нам удалось выделить:

1) Цитокины, эффекты которых сонаправлены с изменениями, сопровождающими эффективное применение ИТТ. Из исследованных цитокинов подобное действие проявили IFN- γ , увеличение которого было связано со снижением количества PD-1(CD279)⁺ истощенных CD8⁺ лимфоцитов ($p = 0,016$), и сосудисто-эндотелиальный фактор роста VEGF, связанный со снижением неблагоприятного фактора неэффективной терапии – экспрессии VEGFR(CD309) на поверхности моноцитов неклассической субпопуляции ($p = 0,006$, рисунок 18).

2) Цитокины, эффекты которых совпадают с изменением состояния иммунной системы при неэффективной ИТТ. В нашем исследовании к ним следует отнести цитокин системного действия IL-6, увеличение которого в сыворотке крови у больных РЭ ассоциировано с наличием неблагоприятного признака – увеличением CD16⁺ моноцитов в циркуляции ($p = 0,055$, рисунок 18).

3) Цитокины, эффекты которых характерны как для изменений иммунной системы при эффективной, так и при неэффективной ИТТ. Это IL-8, MCP-1, IL-10. При этом для ряда активностей действие этих цитокинов синергично. Примером может служить неселективное увеличение экспрессии VEGFR(CD309) на поверхности всего пула моноцитов – как на клетках, ассоциированных с длительным ответом (CD14⁺CD16⁻ моноциты классической субпопуляции), так и на моноцитах неклассической и промежуточной субпопуляций (CD14⁻CD16⁺ и CD14⁺CD16⁺ клетки, соответственно), связанных с прогрессированием в течение 12,6 месяцев ИТТ (рисунок 18).

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 периферической крови в контексте взаимного влияния.

В опухолевой ткани оказались в значительно большем количестве CD14⁺ моноциты (рисунок 20 А), что может быть обусловлено их активной миграцией под действием опухолевых хемокинов. Однако при этом уровень экспрессии VEGFR (CD309) на данных клетках был значительно ниже, чем в неизменной ткани эндометрия ($p = 0,0009$, рисунок 20 А). Данный факт, вероятно, свидетельствует о дифференцировке рекрутированных моноцитов в ТАМ-подобные клетки, утратившие ангиогенную активность или использующие альтернативные пути сосудистой индукции [67, 131, 132]. Также при сопоставлении опухолевой и неизменной ткани эндометрия выявлены существенные различия в составе и активационном статусе лимфоцитов, отражающие опухоле-индуцированную модификацию локального иммунного фона. Наиболее выраженное различие наблюдалось в отношении CD8⁺ Т-лимфоцитов (рисунок 20 Б). В опухолевой ткани как абсолютное количество данных клеток (39,2 %), так и уровень экспрессии CD8 (MFI 947 у.е.) были достоверно ниже, чем в неизменённой ткани (88,1 % и 2163 у.е. соответственно). Вероятно, эти результаты отражают низкий уровень инфильтрации опухоли лимфоцитами, что характерно для “холодных” опухолей, к которым и относится MSS РЭ [133, 134]. Значительно более низкий уровень экспрессии CD69 в опухоли ($p = 0,009$) может свидетельствовать о подавлении локальной активации Т-клеток под действием иммуносупрессорной опухолевой среды (рисунок 20 Б). Экспрессия PD-1 (CD279) на CD8⁺ лимфоцитах также оказался менее выражена в опухолевой ткани ($p = 0,009$, рисунок 20 Б), что тоже может быть связано с тем фактом, что РЭ с MSS статусом, в отличие от MSI-H не относится к “горячим” иммуногенным опухолям и, соответственно, активной миграции CD8⁺ лимфоцитов экспрессирующих PD-1 в ткань опухоли не

происходит [135]. В опухоли наблюдается одновременное статистически значимое снижения уровня экспрессии CD45R0 ($p = 0,02$) на лимфоцитах, который является маркером активированных Т клеток памяти, и уровня экспрессии CD45RA на лимфоцитах ($p = 0,01$, рисунок 20 В), который является маркером наивных лимфоцитов. Данный факт может быть связан с общим снижением количества лимфоцитов. Уровень экспрессии молекулы CCR7 на поверхности наивных Т лимфоцитов в опухоли так же оказался снижен ($p = 0,0007$, рисунок 20 В) при одновременном повышении количества клеток данной популяции ($p = 0,001$), что может говорить о снижении способности наивных лимфоцитов к миграции в ткань опухоли.

Для выявления связи иммунологических параметров опухолевого микроокружения и неизменной ткани эндометрия с одноименными параметрами в периферической крови был проведен корреляционный анализ.

Положительная корреляция была выявлена между долей $CD8^+$ Т-лимфоцитов в крови и долей $CD8^+CD69^+$ активированных клеток в опухоли ($r = 0,489$, рисунок 21). Это позволяет предположить, что циркулирующие цитотоксические клетки участвуют в инфильтрации опухолевого микроокружения и проходят активацию *in situ*. CD69 — маркер ранней активации Т-клеток, необходимый для закрепления эффекторных лимфоцитов в тканях и репрессии рецепторов миграции, включая S1P1 [67, 136, 137].

Высокая корреляция между $CD45^+$ Т-лимфоцитами периферической крови и $CD14^+$ моноцитами в неизменённой ткани эндометрия ($r = 0,781$, рисунок 22) отражает тесную координацию между системным и тканевым врождённым иммунитетом. $CD14^+$ клетки представляют собой преимущественно классические моноциты, способные к миграции в ткань и последующей дифференцировке в макрофаги или дендритные клетки, участвующие в антигенной презентации и запуске адаптивного ответа [138]. В неизменной ткани эндометрия такая активность может обеспечивать контроль за физиологической регенерацией, а в условиях опухоли —

приобретать двойственную роль в зависимости от микросреды.

Количество наивных Т-клеток ($CCR7^+CD45RA^+$) коррелирует между периферической кровью и неизменённой тканью ($r = 0,650$, рисунок 22), что указывает на миграцию данных клеток в эндометрий, вероятно, по градиенту хемокинов CCL19 и CCL21, взаимодействующих с рецептором CCR7 [139, 140]. Наблюдается положительная корреляция количества Т-клеток центральной памяти ($CCR7^+CD45RO^+$) между показателями в периферической крови и неизменной ткани эндометрия ($r = 0,757$, рисунок 22), что может свидетельствовать миграции этих клеток в ткань.

Прямая положительная связь наблюдается между количеством наивных Т-клеток в опухоли и количеством коммитированных клеток ($r = 0,700$, $p < 0,05$) и количеством клеток центральной памяти в неизменной ткани ($r = 0,544$, $p < 0,05$, рисунок 23), что вероятно говорит о том, что существует определенный градиент популяций поступающих из периферической крови, и опухоль вытесняет в окружающие ткани клетки способные на осуществление противоопухолевого ответа за счет более активной миграции наивных клеток. Также прямая положительная связь наблюдается между количеством $CCR7^+CD45RA^+$ наивных Т-клеток в опухоли и количеством аналогичных клеток в неизменной ткани эндометрия может быть результатом общего направления миграции из кровотока ($r = 0,780$, $p < 0,05$, рисунок 23).

Наблюдается обратная корреляция между количеством Т-клеток эффекторной памяти ($CD45RA^-62L^-$), количеством Т-клеток центральной памяти ($CD45RA^-62L^+$) и количеством наивных Т-клеток ($CD45RA^+62L^+$) между опухолью и неизменной тканью ($r = -0,473$, $-0,584$, $-0,538$ соответственно, рисунок 23), что, вероятно, отражает функциональное перераспределение: в опухоль преимущественно поступают зрелые, активированные Т-клетки эффекторной памяти, тогда как ткань эндометрия служит резервуаром для наивных и центральных клеток [138, 139, 141].

Такие ассоциации указывают на то, что опухолевая ткань «перетягивает» на себя активированные эффекторные клетки, тогда как неизменная ткань эндометрия играет роль промежуточной «иммунной станции», обеспечивающей дифференцировку и подготовку клеток памяти. Прямая положительная связь между количеством $CCR7^+CD45RA^+$ Т-клеток в опухоли и аналогичными клетками в неизменной ткани эндометрия ($r = 0,780$, рисунок 23) может быть результатом общего направления миграции из кровотока, подтверждённого и другими исследованиями [111, 142, 143].

Выявленные связи не только подтверждают участие как локального, так и системного иммунитета в противоопухолевом процессе, но и указывают на конкретные миграционные траектории и механизмы функциональной дифференцировки клеток. Реализация данных путей, вероятно, может играть важную роль в обеспечении эффективности ИТТ.

Наличие соматических мутаций в опухоли способно оказывать модулирующее воздействие на опухолевое микроокружение, которое активно участвует в реализации терапевтических эффектов ИТТ.

Согласно литературным данным, наличие мутаций *KRAS* соотносится с изменениями в иммунной системе. Так, экспрессия PD-1 была связана со статусом *KRAS*, а также PD-1 был определен как потенциальный биомаркер ответа на ингибиторы контрольных точек иммунного ответа в НМРЛ [144]. Установлено, что мутации в экзоне 9 и/или экзоне 20 гена *PIK3CA* оказывают негативное влияние на выживаемость пациенток с РЭ [145].

Что касается гена *PIK3CA*, установлено, что мутации в экзоне 9 и/или экзоне 20 оказывают негативное влияние на выживаемость пациенток с ЭК. Эта тенденция была наиболее выражена у пациенток с низкоккачественными опухолями, что позволяет предположить, что эти пациентки могут быть наиболее предпочтительны для тестирования *PIK3CA* и потенциальной таргетной терапии [94]. Изучение ассоциации наличия мутаций в данном гене с эффективностью ИТТ выглядит перспективным.

На основании этого нами была проанализирована связь биологических свойств опухоли с исходом ИТТ.

Как известно, соматические мутации играют одну из решающих ролей в патогенезе многих злокачественных новообразований, так что мы изучили полученный во время операции материал опухоли на предмет наличия возможно связанных с реализацией терапевтических эффектов леватиниба мутаций: кодонов 12, 13 и 61 3 экзона гена *KRAS* (ассоциированы с резистентностью к ингибиторам тирозинкиназы [146]), а также 9 и 10 экзонов гена *PIK3CA* (ассоциированы с чувствительностью к ингибиторам тирозинкиназ [147]).

Нам не удалось обнаружить статистически достоверные различия между исследованными параметрами, но была отмечена тенденция к ассоциации мутантного варианта гена *KRAS* 12-13 с прогрессированием MSS/pMMR РЭ (встречается у 40 % пациенток с прогрессированием РЭ ($p = 0,6$, таблица 7), что перекликается с литературными данными, согласно которым мутация в данном гене может способствовать развитию более агрессивных форм РЭ и способствовать прогрессированию заболевания [148].

Было показано, что мутантный вариант гена *KRAS* 12-13 чаще встречается у пациенток с эффективной ИТТ ($p = 0,6$), что предполагает потенциальное значение данных мутаций в реализации терапевтических эффектов ИТТ, но не был достигнут уровень статистической значимости (таблица 8).

Продолжение исследования может привести к получению достоверно значимых результатов.

Также нами было оценено влияние наличия мутаций вышеуказанных генов на изменение популяционного состава опухолевого микроокружения. Были выявлены некоторые закономерности на уровне статистической тенденции. Наличие мутаций *KRAS* 12-13 и *PIK3CA* 20 ассоциировано с увеличением относительного числа CD45⁺ моноцитов ($p = 0,09$) и

CD8⁺CD69⁺ лимфоцитов ($p = 0,07$, рисунок 24), которые могут представлять собой пластический ресурс для действия ИТТ и быть связаны с эффективностью данной терапии. Также наблюдается увеличение доли наивных Т-лимфоцитов ($p = 0,07$) и увеличение экспрессии молекулы CD45RA на их поверхности ($p = 0,07$), увеличение количества CD45R0⁺ лимфоцитов ($p = 0,07$), экспрессирующих CCR7 CD45R0⁺ лимфоцитов ($p = 0,06$) и экспрессирующих CCR7 CD45RA⁺ лимфоцитов ($p = 0,06$, рисунок 24), по сравнению с микроокружением опухоли без исследуемых мутаций. Эти результаты говорят о повышенной миграции как наивных лимфоцитов, так и клеток иммунологической памяти в очаг опухоли и может быть важным фактором в реализации эффектов ИТТ. В то же время на уровне статистической тенденции наблюдается ассоциация со снижением количества терминально дифференцированных лимфоцитов ($p = 0,071$) и эффекторных Т-лимфоцитов ($p = 0,071$) при увеличении количества лимфоцитов центральной памяти ($p = 0,071$, рисунок 24).

Полученные результаты соотносятся с литературными данными о влиянии соматических мутаций исследованных генов на состав опухолевого микроокружения [149].

Таким образом, наличие соматических мутаций генов *KRAS 12-13* и *PIK3CA 20* в опухоли эндометрия может быть ассоциировано с изменениями в популяционном составе опухолевого микроокружения, однако нами были обнаружены различия на уровне статистической тенденции, требуется дальнейшее изучение данного аспекта для установления роли мутаций в эффективности ИТТ.

Поскольку вопрос поиска новых маркеров эффективности назначаемой ИТТ при прогрессирующем MSS/pMMR РЭ до сих пор является актуальным, мы решили провести оценку предиктивной ценности иммунологических параметров, которые ранее были обозначены нами как ассоциированные с эффективностью проводимой терапии (количество CD8⁺CD69⁺ лимфоцитов, VEGFR⁺CD14⁺CD16⁻ моноцитов, PD-1⁺ лимфоцитов, PD-1⁺CD8⁺ лимфоцитов,

PD-1⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, экспрессия молекулы CD14 на моноцитах и экспрессия VEGFR на CD14⁺CD16⁺ моноцитах). Была проведена оценка их предиктивной ценности. Для этого был осуществлен ROC-анализ, выявивший, что доля активированных цитотоксических CD8⁺CD69⁺ лимфоцитов ниже 99,5 % от общего числа CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов в периферической крови 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 25).

Поскольку цитотоксические лимфоциты являются основной мишенью действия иммунотаргетных препаратов [150], то крайне важно для реализации их терапевтических эффектов чтобы клетки данной популяции оставались на достаточном уровне. Ранняя чрезмерная активация ЦТЛ может приводить к их скорому истощению [151] и, соответственно, неэффективности назначаемой терапии.

На основании полученных результатов нами было разработано решающее правило для прогнозирования назначения ИТТ больным с прогрессирующим MSS/pMMR раком эндометрия (таблица 9). Решающее правило включает как иммунологические, так и клинико-морфологические параметры. 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, представленные в решающем правиле. При сумме баллов “+13” с 95 % долей вероятности длительность ВБП при применении ИТТ составит более 12,6 месяцев.

Для определения чувствительности и специфичности построенного решающего правила требуется дальнейшая валидация на независимой выборке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что терапия пембролизумабом в комбинации с леватинибом 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 леватинибом. 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⁺CD45R0⁺ 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 леватинибом связана с увеличением количества $VEGFR^+CD14^-CD16^-$ клеток моноцитарного гейта в процессе лечения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВБП - выживаемость без прогрессирования
ИКТ - ингибиторы контрольных точек
ИТТ - иммунотаргетная терапия
ОАМ - опухолеассоциированные макрофаги
ОВ - общая выживаемость
РЭ - рак эндометрия
ХТ - химиотерапия
ЦТЛ - цитотоксические Т-лимфоциты
CCR-7 - рецептор к хемокинам 7 типа
CTLA - антиген цитотоксических Т-лимфоцитов
dMMR - дефицит системы репарации неспаренных оснований
IFN- γ - интерферон-гамма
IL - интерлейкин
MCP-1 - моноцитарный хемотаксический протеин-1
MSI-H - высокая микросателлитная нестабильность
MSS - стабильный микросателлитный статус
PD-1 - рецептор программируемой клеточной гибели
PD-L - лиганд рецептора программируемой клеточной гибели
pMMR - профицит системы репарации неспаренных оснований
TCR - антиген-распознающий рецептор Т-лимфоцитов
Th - Т-хелперы
TNF- α - фактор некроза опухоли альфа
Treg - регуляторные Т-клетки
Trm - резидентные тканевые Т-клетки памяти
VEGF - фактор роста эндотелия сосудов
VEGFR - рецептор к фактору роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, А. О. Шахзадова – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. – 276 с.
2. Abu-Rustum N. Uterine neoplasms, version 1.2023, NCCN clinical practice guidelines in oncology / N. Abu-Rustum, C. Yashar, R. Arend [и др.] // Journal of the National Comprehensive Cancer Network. – 2023. – Т. 21, №. 2. – С. 181-209.
3. Wang S., Khan F. I. Investigation of molecular interactions mechanism of pembrolizumab and PD-1 / S. Wang, F. I. Khan // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24, №. 13. – С. 10684.
4. Makker V. Lenvatinib plus pembrolizumab in patients with advanced endometrial cancer / V. Makker, M. H. Taylor, C. Aghajanian [и др.] // Journal of clinical oncology. – 2020. – Т. 38, №. 26. – С. 2981-2992.
5. O'Malley D. M. Pembrolizumab in patients with microsatellite instability–high advanced endometrial cancer: results from the KEYNOTE-158 study / D. M. O'Malley, G. M. Bariani, P. A. Cassier [и др.] // Journal of Clinical Oncology. – 2022. – Т. 40, №. 7. – С. 752-761.
6. Ryan N. A. J. The proportion of endometrial cancers associated with Lynch syndrome: a systematic review of the literature and meta-analysis / N. A. J. Ryan, M. A. Glaire, D. Blake [и др.] // Genetics in Medicine. – 2019. – Т. 21, №. 10. – С. 2167-2180.
7. Capozzi M. Lenvatinib, a molecule with versatile application: from preclinical evidence to future development in anti-cancer treatment / M. Capozzi, C. De Divitiis, A. Ottaiano [и др.] // Cancer management and research. – 2019. – С. 3847-3860.
8. Arora S. FDA approval summary: pembrolizumab plus lenvatinib for endometrial carcinoma, a collaborative international review under project orbis / S. Arora, S. Balasubramaniam, W. Zhang [и др.] // Clinical Cancer Research. – 2020. – Т. 26, №. 19. – С. 5062-5067.
9. Huang C. Peripheral naïve CD8⁺ T cells as a predictive biomarker of response to lenvatinib plus an anti-PD-1 antibody in advanced hepatocellular carcinoma: a biomarker study / C. Huang, B. Xu, X. D. Zhu [и др.] // Cancer Communications. – 2022. – Т. 42, №. 11. – С. 1226.
10. Matsumoto S. Effective prediction of treatment responders with anti-PD-1 antibody in malignant pleural mesothelioma by diversity of peripheral CD8⁺ PD-1⁺ T cell subpopulation / S. Matsumoto, T. Matsutani, Y. Fujita [и др.] // Cancer Research. – 2020. – Т. 80, №. 16_Supplement. – С. 4478-4478.
11. Олейник Е. К. Микроокружение опухоли: формирование иммунного профиля / Е. К. Олейник, М. И. Шибаев, К. С. Игнатьев [и др.] // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22, №. 2. – С. 207-220.
12. Мальцева А. А. Параметры опухолевого микроокружения как предиктор длительности клинической эффективности иммунотаргетной

терапии при прогрессирующем или метастатическом раке эндометрия: пилотное многоцентровое наблюдательное исследование / А. А. Мальцева, А. Ю. Калинин, Н. В. Крахмаль [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2024. – Т. 20, №. 1. – С. 114-123.

13. Zhu J. The immunomodulatory activity of lenvatinib prompts the survival of patients with advanced hepatocellular carcinoma / J. Zhu, P. Fang, C. Wang [и др.] // Cancer medicine. – 2021. – Т. 10, №. 22. – С. 7977-7987.

14. Peng C. Influence of lenvatinib on the functional reprogramming of peripheral myeloid cells in the context of non-medullary thyroid carcinoma / C. Peng, K. Rabold, M. G. Netea [и др.] // Pharmaceutics. – 2023. – Т. 15, №. 2. – С. 412.

15. Chen S. The combined signatures of G protein-coupled receptor family and immune landscape provide a prognostic and therapeutic biomarker in endometrial carcinoma / S. Chen, X. Luo, B. Yang [и др.] // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. – 2023. – Т. 149, №. 16. – С. 14701-14719.

16. Нечушкина В. М. Рак тела матки и саркомы матки / В. М. Нечушкина, Л. А. Коломиец, О. А. Кравец [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2024. – Т. 14, №. 3s2-2. – С. 165-188.

17. León-Castillo A. Molecular classification of the PORTEC-3 trial for high-risk endometrial cancer: impact on prognosis and benefit from adjuvant therapy / A. León-Castillo, S. M. De Boer, M. E. Powell [и др.] // Journal of Clinical Oncology. – 2020. – Т. 38, №. 29. – С. 3388-3397.

18. Siegel R. L. Cancer statistics, 2022 / Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. [и др.] // CA: a cancer journal for clinicians. – 2022. – Т. 72. – №. 1.

19. Morice P. Endometrial cancer / Morice, P., Leary, A., Creutzberg, C. [и др.] //the Lancet. – 2016. – Т. 387. – №. 10023. – С. 1094-1108.

20. Siegel R. L. CA: a cancer journal for clinicians / R. L. Siegel, K. D. Miller, & A. Jemal // Cancer statistics. – 2019. – Т. 69, №. 1. – С. 7-34.

21. Creasman W. T. Carcinoma of the corpus uteri / W. T. Creasman, F. Odicino, P. Maisonneuve [и др.] // International Journal of Gynecology & Obstetrics. – 2006. – Т. 95. – С. S105-S143.

22. Bosse T. Molecular classification of grade 3 endometrioid endometrial cancers identifies distinct prognostic subgroups / T. Bosse, R. A. Nout, J. N. McAlpine [и др.] // The American journal of surgical pathology. – 2018. – Т. 42, №. 5. – С. 561-568.

23. Kandoth C. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types / Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F. [и др.] // Nature. – 2013. – Т. 502. – №. 7471. – С. 333-339.

24. Matei D. Adjuvant chemotherapy plus radiation for locally advanced endometrial cancer / D. Matei, V. Filiaci, M. E. Randall [и др.] // New England Journal of Medicine. – 2019. – Т. 380, №. 24. – С. 2317-2326.

25. De Boer S. M. Adjuvant chemoradiotherapy versus radiotherapy alone for women with high-risk endometrial cancer (PORTEC-3): final results of an international, open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial / S. M. De Boer,

- M. E. Powell, L. Mileskin [и др.] // *The lancet oncology*. – 2018. – Т. 19, №. 3. – С. 295-309.
26. Harries M., Gore M. Part I: Chemotherapy for epithelial ovarian cancer–treatment at first diagnosis / M. Harries, M. Gore // *The lancet oncology*. – 2002. – Т. 3, №. 9. – С. 529-536.
27. Garcia A. A. A phase II evaluation of weekly docetaxel in the treatment of recurrent or persistent endometrial carcinoma: a study by the Gynecologic Oncology Group / A. A. Garcia, J. A. Blessing, S. Nolte [и др.] // *Gynecologic oncology*. – 2008. – Т. 111, №. 1. – С. 22-26.
28. McMeekin S. Phase III randomized trial of second-line ixabepilone versus paclitaxel or doxorubicin in women with advanced endometrial cancer / S. McMeekin, D. Dizon, J. Barter [и др.] // *Gynecologic oncology*. – 2015. – Т. 138, №. 1. – С. 18-23.
29. Царев И. Л., Мелерзанов А. В. Обзор подходов к иммунотерапии в онкологии / И. Л. Царев, А. В. Мелерзанов // *Research'n Practical Medicine Journal*. – 2017. – Т. 4, №. 3. – С. 51-65.
30. Waldman A. D., Fritz J. M., Lenardo M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice / A. D. Waldman, J. M. Fritz, & M. J. Lenardo [и др.] // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Т. 20, №. 11. – С. 651-668.
31. Zamora A. E., Crawford J. C., Thomas P. G. Hitting the target: how T cells detect and eliminate tumors / A. E. Zamora, J. C. Crawford, P. G. Thomas [и др.] // *The Journal of Immunology*. – 2018. – Т. 200, №. 2. – С. 392-399.
32. Chen L., Flies D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition / L. Chen, D. B. Flies // *Nature reviews immunology*. – 2013. – Т. 13, №. 4. – С. 227-242.
33. Jiang Y. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations / Y. Jiang, M. Chen, H. Nie [и др.] // *Human vaccines & immunotherapeutics*. – 2019. – Т. 15, №. 5. – С. 1111-1122.
34. Ishida M. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues / M. Ishida, Y. Iwai, Y. Tanaka [и др.] // *Immunology letters*. – 2002. – Т. 84, №. 1. – С. 57-62.
35. Tang F. Anti-CTLA-4 antibodies in cancer immunotherapy: selective depletion of intratumoral regulatory T cells or checkpoint blockade? / F. Tang, X. Du, M. Liu [и др.] // *Cell & Bioscience*. – 2018. – Т. 8, №. 1. – С. 30.
36. Shin D. S., Ribas A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? / D. S. Shin, A. Ribas // *Current opinion in immunology*. – 2015. – Т. 33. – С. 23-35.
37. Tawbi H. A. Relatlimab and nivolumab versus nivolumab in untreated advanced melanoma / H. A. Tawbi, D. Schadendorf, E. J. Lipson [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Т. 386, №. 1. – С. 24-34.

38. ElTanbouly M. A. VISTA: a novel immunotherapy target for normalizing innate and adaptive immunity / M. A. ElTanbouly, W. Croteau, R. J. Noelle [и др.] // *Seminars in immunology*. – Academic Press. – 2019. – Т. 42. – С. 101308.
39. Ma J. Phase I study of the anti-BTLA antibody tificemalimab as a single agent or in combination with toripalimab in relapsed/refractory lymphomas. / J. Ma, Y. Song, Y. Xie [и др.] // *Blood*. – 2022. – Т. 140., №. 1. – С. 3716-3717.
40. Jing W. Combined immune checkpoint protein blockade and low dose whole body irradiation as immunotherapy for myeloma / W. Jing, J. A. Gershan, J. Weber [и др.] // *Journal for immunotherapy of cancer*. – 2015. – Т. 3, №. 1. – С. 2.
41. Zhao X. From rough to precise: PD-L1 evaluation for predicting the efficacy of PD-1/PD-L1 blockades / X. Zhao, Y. Bao, B. Meng [и др.] // *Frontiers in immunology*. – 2022. – Т. 13. – С. 920021.
42. Antill Y. Clinical activity of durvalumab for patients with advanced mismatch repair-deficient and repair-proficient endometrial cancer. A nonrandomized phase 2 clinical trial / Y. Antill, P. S. Kok, K. Robledo [и др.] // *Journal for immunotherapy of cancer*. – 2021. – Т. 9, №. 6. – С. e002255.
43. Goyal G. Tumor mutational burden and other predictive immunotherapy markers in histiocytic neoplasms / G. Goyal, D. Lau, A. M. Nagle [и др.] // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2019. – Т. 133, №. 14. – С. 1607-1610.
44. Tubbs A., Nussenzweig A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer / A. Tubbs, A. Nussenzweig // *Cell*. – 2017. – Т. 168, №. 4. – С. 644-656.
45. Peters S. Phase II trial of atezolizumab as first-line or subsequent therapy for patients with programmed death-ligand 1–selected advanced non–small-cell lung cancer (BIRCH) / S. Peters, S. Gettinger, M. L. Johnson [и др.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2017. – Т. 35, №. 24. – С. 2781-2789.
46. Basudan A. M. The role of immune checkpoint inhibitors in cancer therapy / A. M. Basudan // *Clinics and Practice*. – 2022. – Т. 13, №. 1. – С. 22-40.
47. Altmann D. M. A Nobel Prize-worthy pursuit: cancer immunology and harnessing immunity to tumour neoantigens / D. M. Altmann // *Immunology*. – 2018. – Т. 155, №. 3. – С. 283-284.
48. Marcus L. FDA approval summary: pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors / L. Marcus, S. J. Lemery, P. Keegan [и др.] // *Clinical Cancer Research*. – 2019. – Т. 25, №. 13. – С. 3753-3758.
49. Le D. T. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade / D. T. Le, J. N. Durham, K. N. Smith [и др.] // *Science*. – 2017. – Т. 357, №. 6349. – С. 409-413.
50. Stewart C. E., Chase D. M. Atezolizumab with chemotherapy for advanced or recurrent endometrial cancer: does targeting PD-1 or PD-L1 matter in this clinical situation? / C. E. Stewart, D. M. Chase // *Gynecology and Pelvic Medicine*. – 2025. – Т. 8.

51. Azad N. S. Nivolumab is effective in mismatch repair-deficient noncolorectal cancers: Results from arm Z1D—A subprotocol of the NCI-MATCH (EAY131) study / N. S. Azad, R. J. Gray, M. J. Overman [и др.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – Т. 38, №. 3. – С. 214-222.
52. Fleming G. F. Clinical activity, safety and biomarker results from a phase Ia study of atezolizumab (atezo) in advanced/recurrent endometrial cancer (rEC) / G. F. Fleming, L. A. Emens, J. P. Eder [и др.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2017. – Т. 35. – С. 5585.
53. Konstantinopoulos P. A. Phase II study of avelumab in patients with mismatch repair deficient and mismatch repair proficient recurrent/persistent endometrial cancer / P. A. Konstantinopoulos, W. Luo, J. F. Liu [и др.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2019. – Т. 37, №. 30. – С. 2786-2794.
54. Antill Y. Updated results of activity of durvalumab in advanced endometrial cancer (AEC) according to mismatch repair (MMR) status: the phase II PHAEDRA trial (ANZGOG1601) / Y. Antill // *Annals of Oncology*. – 2019. – Т. 30. – С. ix192.
55. Rubinstein M. M. A phase II trial of durvalumab with or without tremelimumab in patients with persistent or recurrent endometrial carcinoma and endometrial carcinosarcoma / M. M. Rubinstein, I. Caird, Q. Zhou [и др.] // *Gynecol Oncol*. – 2019. – Т. 169., – С. 64-69.
56. Karamurzin Y., Rutgers J. K. L. DNA mismatch repair deficiency in endometrial carcinoma / Y. Karamurzin, J. K. L. Rutgers // *International journal of gynecological pathology*. – 2009. – Т. 28, №. 3. – С. 239-255.
57. Li X. Lessons learned from the blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy / X. Li, C. Shao, Y. Shi [и др.] // *Journal of hematology & oncology*. – 2018. – Т. 11, №. 1. – С. 31.
58. Makker V. Lenvatinib plus pembrolizumab in patients with advanced endometrial cancer: an interim analysis of a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial / V. Makker, D. Rasco, N. J. Vogelzang [и др.] // *The Lancet Oncology*. – 2019. – Т. 20, №. 5. – С. 711-718.
59. Arora E. Role of immune checkpoint inhibitors in advanced or recurrent endometrial cancer / E. Arora, M. Masab, P. Mittar [и др.] // *Cureus*. – 2018. – Т. 10, №. 4. – С. e2521.
60. Capozzi M. Lenvatinib, a molecule with versatile application: from preclinical evidence to future development in anti-cancer treatment / M. Capozzi, C. De Divitiis, A. Ottaiano [и др.] // *Cancer management and research*. – 2019. – С. 3847-3860.
61. Samstein R. M. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types / R. M. Samstein, C. H. Lee, A. N. Shoushtari [и др.] // *Nature genetics*. – 2019. – Т. 51, №. 2. – С. 202-206.
62. Roudko V. Shared immunogenic poly-epitope frameshift mutations in microsatellite unstable tumors / V. Roudko, C. C. Bozkus, T. Orfanelli, C. B. McClain [и др.] // *Cell*. – 2020. – Т. 183, №. 6. – С. 1634-1649.

63. Perumal D. Mutation-derived neoantigen-specific T-cell responses in multiple myeloma / D. Perumal, N. Imai, A. Lagana [и др.] // *Clinical Cancer Research*. – 2020. – Т. 26, №. 2. – С. 450-464.
64. Riaz N. The role of neoantigens in response to immune checkpoint blockade / N. Riaz, L. Morris, J. J. Havel [и др.] // *International immunology*. – 2016. – Т. 28, №. 8. – С. 411-419.
65. Skoulidis F. STK11/LKB1 mutations and PD-1 inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma / F. Skoulidis, M. E. Goldberg, D. M. Greenawalt [и др.] // *Cancer discovery*. – 2018. – Т. 8, №. 7. – С. 822-835.
66. Wang X. Tumor cell-intrinsic PD-1 receptor is a tumor suppressor and mediates resistance to PD-1 blockade therapy / X. Wang, X. Yang, C. Zhang [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Т. 117, №. 12. – С. 6640-6650.
67. Kato Y. U. Lenvatinib plus anti-PD-1 antibody combination treatment activates CD8⁺ T cells through reduction of tumor-associated macrophage and activation of the interferon pathway / Y. U. Kato, K. Tabata, T. Kimura [и др.] // *PloS one*. – 2019. – Т. 14, №. 2. – С. e0212513.
68. Кудрявцев И. В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки / И. В. Кудрявцев // *Российский иммунологический журнал*. – 2014. – Т. 8, №. 4. – С. 947-964.
69. Sallusto F. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions / F. Sallusto, D. Lenig, R. Förster [и др.] // *Nature*. – 1999. – Т. 401, №. 6754. – С. 708-712.
70. Harari A., Vellelian F., Pantaleo G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load / A. Harari, F. Vellelian, G. Pantaleo // *European journal of immunology*. – 2004. – Т. 34, №. 12. – С. 3525-3533.
71. Chevalier N. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses / N. Chevalier, D. Jarrossay, E. Ho, [и др.] // *The Journal of Immunology*. – 2011. – Т. 186, №. 10. – С. 5556-5568.
72. Farber D. L., Yudanin N. A., Restifo N. P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis / D. L. Farber, N. A. Yudanin, & N. P. Restifo // *Nature Reviews Immunology*. – 2014. – Т. 14, №. 1. – С. 24-35.
73. Thommen D. S., Schumacher T. N. T cell dysfunction in cancer / D. S. Thommen, T. N. Schumacher // *Cancer cell*. – 2018. – Т. 33, №. 4. – С. 547-562.
74. Siddiqui I. Intratumoral Tcf1⁺ PD-1⁺ CD8⁺ T cells with stem-like properties promote tumor control in response to vaccination and checkpoint blockade immunotherapy / I. Siddiqui, K. Schaeuble, V. Chennupati [и др.] // *Immunity*. – 2019. – Т. 50, №. 1. – С. 195-211. e10.
75. Jenkins E. The current state and future of T-cell exhaustion research / E. Jenkins, T. Whitehead, M. Fellermeier [и др.] // *Oxford Open Immunology*. – 2023. – Т. 4, №. 1. – С. iqad006.

76. Masopust D. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium / Masopust, D., Choo, D., Vezys, V. [и др.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2010. – Т. 207. – №. 3. – С. 553-564.
77. Wakim L. M., Woodward-Davis A., Bevan M. J. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence / Wakim L. M., Woodward-Davis A., Bevan M. J. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Т. 107. – №. 42. – С. 17872-17879.
78. Wakim L. M. Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues / Wakim, L. M., Waithman, J., Van Rooijen, N. [и др.] // *Science*. – 2008. – Т. 319. – №. 5860. – С. 198-202.
79. Cheuk S. CD49a expression defines tissue-resident CD8⁺ T cells poised for cytotoxic function in human skin / S. Cheuk, H. Schlums, I. G. S  rezal [и др.] // *Immunity*. – 2017. – Т. 46, №. 2. – С. 287-300.
80. Nicolet B. P. CD29 identifies IFN-  -producing human CD8⁺ T cells with an increased cytotoxic potential / B. P. Nicolet, A. Guislain, F. P. van Alphen [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Т. 117, №. 12. – С. 6686-6696.
81. Makker V. Lenvatinib plus pembrolizumab for advanced endometrial cancer / V. Makker, N. Colombo, A. Casado Herr  ez [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Т. 386, №. 5. – С. 437-448.
82. Pizzimenti C. Predictive biomarkers for immunotherapy in endometrial carcinoma / C. Pizzimenti, V. Fiorentino, L. Pepe [и др.] // *Cancers*. – 2025. – Т. 17. – №. 15. – С. 2420.
83. Ding S. Molecular mechanism of tumor-infiltrating immune cells regulating endometrial carcinoma / Ding, S., Hao, Y., Qi, Y. [и др.] // *Genes & Diseases*. – 2025. – Т. 12, №. 3. – С. 101442.
84. Li X. Lessons learned from the blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy / X. Li, C. Shao, Y. Shi [и др.] // *Journal of hematology & oncology*. – 2018. – Т. 11, №. 1. – С. 31.
85. Jiang F. Immunologic signatures across molecular subtypes and potential biomarkers for sub-stratification in endometrial cancer / F. Jiang, S. Jian, D. Cao [и др.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Т. 24, №. 2. – С. 1791.
86. Yang Y., Wu S. F., Bao W. Molecular subtypes of endometrial cancer: Implications for adjuvant treatment strategies / Y. Yang, S. F. Wu, W. Bao // *International journal of gynecology & obstetrics*. – 2024. – Т. 164, №. 2. – С. 436-459.
87. Diehl A. C. KRAS mutation variants and co-occurring PI3K pathway alterations impact survival for patients with pancreatic ductal adenocarcinomas / A. C. Diehl, L. M. Hannan, D. B. Zhen [и др.] // *The oncologist*. – 2022. – Т. 27, №. 12. – С. 1025-1033.
88. van Maldegem F., Downward J. Mutant KRAS at the heart of tumor immune evasion / F. van Maldegem, J. Downward // *Immunity*. – 2020. – Т. 52, №. 1. – С. 14-16.

89. Liu C. KRAS-G12D mutation drives immune suppression and the primary resistance of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in non-small cell lung cancer / C. Liu, S. Zheng, Z. Wang [и др.] // Cancer Communications. – 2022. – Т. 42, №. 9. – С. 828-847.
90. Watterson A., Coelho M. A. Cancer immune evasion through KRAS and PD-L1 and potential therapeutic interventions / A. Watterson, M. A. Coelho // Cell Communication and Signaling. – 2023. – Т. 21, №. 1. – С. 45.
91. Kilowski K. A. KRAS mutations in endometrial cancers: Possible prognostic and treatment implications / K. A. Kilowski, M. F. Dietrich, J. Xiu [и др.] // Gynecologic oncology. – 2024. – Т. 191. – С. 299-306.
92. Thorpe L. M., Yuzugullu H., Zhao J. J. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting / L. M. Thorpe, H. Yuzugullu, J. J. Zhao [и др.] // Nature Reviews Cancer. – 2015. – Т. 15, №. 1. – С. 7-24.
93. Yang J. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials / J. Yang, J. Nie, X. Ma [и др.] // Molecular cancer. – 2019. – Т. 18, №. 1. – С. 26.
94. Bredin H. K., Krakstad C., Hoivik E. A. PIK3CA mutations and their impact on survival outcomes of patients with endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis / H. K. Bredin, C. Krakstad, E. A. Hoivik // PLoS One. – 2023. – Т. 18, №. 3. – С. e0283203.
95. Mjos S. PIK3CA exon9 mutations associate with reduced survival, and are highly concordant between matching primary tumors and metastases in endometrial cancer / S. Mjos, H. M. Werner, E. Birkeland [и др.] // Scientific reports. – 2017. – Т. 7, №. 1. – С. 10240.
96. Hayes M. P. PIK3CA and PTEN mutations in uterine endometrioid carcinoma and complex atypical hyperplasia / M. P. Hayes, H. Wang, R. Espinal-Witter [и др.] // Clinical cancer research. – 2006. – Т. 12, №. 20. – С. 5932-5935.
97. Velasco A. PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma. Correlation with PTEN and K-RAS alterations / A. Velasco, E. Bussaglia, J. Pallares [и др.] // Human pathology. – 2006. – Т. 37, №. 11. – С. 1465-1472.
98. Berger A. C. A comprehensive pan-cancer molecular study of gynecologic and breast cancers / A. C. Berger, A. Korkut, R. S. Kanchi [и др.] // Cancer cell. – 2018. – Т. 33, №. 4. – С. 690-705. e9.
99. Konopka B. PIK3CA mutations and amplification in endometrioid endometrial carcinomas: relation to other genetic defects and clinicopathologic status of the tumors / B. Konopka, A. Janiec-Jankowska, E. Kwiatkowska [и др.] // Human pathology. – 2011. – Т. 42, №. 11. – С. 1710-1719.
100. Mei Z. B. Prognostic role of tumor PIK3CA mutation in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis / Z. B. Mei, C. Y. Duan, C. B. Li [и др.] // Annals of Oncology. – 2016. – Т. 27, №. 10. – С. 1836-1848.
101. Mollon L. E. A systematic literature review of the prognostic and predictive value of PIK3CA mutations in HR+/HER2 – metastatic breast cancer

- / L. E. Mollon, E. J. Anderson, J. L. Dead [и др.] // *Clinical Breast Cancer*. – 2020. – Т. 20, №. 3. – С. e232-e243.
102. Lin D. I. Improved survival associated with somatic PIK3CA mutations in copy-number low endometrioid endometrial adenocarcinoma / D. I. Lin // *Oncology letters*. – 2015. – Т. 10, №. 5. – С. 2743-2748.
103. McIntyre J. B. PIK3CA missense mutation is associated with unfavorable outcome in grade 3 endometrioid carcinoma but not in serous endometrial carcinoma / J. B. McIntyre, G. S. Nelson, P. Ghatage [и др.] // *Gynecologic Oncology*. – 2014. – Т. 132, №. 1. – С. 188-193.
104. Catasus L. Concomitant PI3K–AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis / L. Catasus, A. Gallardo, M. Cuatrecasas, & J. Prat [и др.] // *Modern Pathology*. – 2009. – Т. 22, №. 4. – С. 522-529.
105. Коломиец Л. А. Клинико-морфологические особенности у пациенток с прогрессирующим раком эндометрия, получивших иммунотаргетную терапию / Л. А. Коломиец, М. Н. Стахеева, О. Н. Чуруксаева [и др.] // *Опухоли женской репродуктивной системы*. – 2023. – Т. 19, №. 2. – С. 109-118.
106. Makker V. Lenvatinib plus pembrolizumab in previously treated advanced endometrial cancer: updated efficacy and safety from the randomized phase III study 309/KEYNOTE-775 / V. Makker, N. Colombo, A. C. Herráez [и др.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2023. – Т. 41, №. 16. – С. 2904-2910.
107. Basto P. A., Reticker-Flynn N. E. Interrogating the roles of lymph node metastasis in systemic immune surveillance / P. A. Basto, N. E. Reticker-Flynn // *Clinical & experimental metastasis*. – 2024. – Т. 41, №. 4. – С. 351-359.
108. Chen W. Development of a mechanism of action-reflective, dual target cell-based reporter bioassay for a bispecific monoclonal antibody targeting human CTLA-4 and PD-1 / W. Chen, M. Pandey, H. Sun [и др.] // *MAbs*. – Taylor & Francis, 2021. – Т. 13, №. 1. – С. 1914359.
109. Gitto S. The emerging interplay between recirculating and tissue-resident memory T cells in cancer immunity: lessons learned from PD-1/PD-L1 blockade therapy and remaining gaps / S. Gitto, A. Natalini, F. Antonangeli, & F. Di Rosa [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Т. 12. – С. 755304.
110. Kudo M. Lenvatinib as an initial treatment in patients with intermediate-stage hepatocellular carcinoma beyond up-to-seven criteria and Child–Pugh a liver function: a proof-of-concept study / M. Kudo, K. Ueshima, S. Chan [и др.] // *Cancers*. – 2019. – Т. 11, №. 8. – С. 1084.
111. Hong W. Impact of Chemotherapy on Circulating Lymphocyte Subsets in Lung Cancer Patients / W. Hong, L. Zhang, Y. Qi, [и др.] // *Cancer Management and Research*. – 2024. – С. 1205-1213.
112. Patysheva M. Monocyte programming by cancer therapy / M. Patysheva, A. Frolova, I. Larionova [и др.] // *Frontiers in immunology*. – 2022. – Т. 13. – С. 994319.

113. Sharma A., Jasrotia S., Kumar A. Effects of chemotherapy on the immune system: implications for cancer treatment and patient outcomes / A. Sharma, S. Jasrotia, & A. Kumar // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2024. – T. 397, №. 5. – C. 2551-2566.
114. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation / P. Italiani, D. Boraschi // *Frontiers in immunology*. – 2014. – T. 5. – C. 514.
115. Robert C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy / C. Robert // *Nature communications*. – 2020. – T. 11, №. 1. – C. 3801.
116. Batorov E. V. Common γ -chain cytokine receptors as functional phenotype markers of PD-1 and TIM-3-positive T cells in multiple myeloma / E. V. Batorov, V. A. Aristova, G. Y. Ushakova [и др.] // *Siberian journal of oncology*. – 2023. – T. 22, №. 1. – C. 43-54.
117. Kudryavtsev I. V. Phenotypic characterisation of peripheral blood cytotoxic T lymphocytes: regulatory and effector molecules / I. V. Kudryavtsev // *Medical Immunology (Russia)*. – 2018. – T. 20, №. 2. – C. 227-240.
118. Lin E. Y. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer / E. Y. Lin, J. F. Li, L. Gnatovskiy [и др.] // *Cancer research*. – 2006. – T. 66, №. 23. – C. 11238-11246.
119. Noy R., Pollard J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy / R. Noy, J. W. Pollard // *Immunity*. – 2014. – T. 41, №. 1. – C. 49-61.
120. Lorusso D. Optimizing the use of lenvatinib in combination with pembrolizumab in patients with advanced endometrial carcinoma / D. Lorusso, R. Danesi, L. D. Locati [и др.] // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – T. 12. – C. 979519.
121. Qian B. Z., Pollard J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis / B. Z. Qian, J. W. Pollard // *Cell*. – 2010. – T. 141, №. 1. – C. 39-51.
122. Raskov H. Cytotoxic CD8⁺ T cells in cancer and cancer immunotherapy / H. Raskov, A. Orhan, J. P. Christensen, & I. Gögenur // *British journal of cancer*. – 2021. – T. 124, №. 2. – C. 359-367.
123. Rahman T. Cytokines and their role as immunotherapeutics and vaccine Adjuvants: The emerging concepts / T. Rahman, A. Das, M. H. Abir [и др.] // *Cytokine*. – 2023. – T. 169. – C. 156268.
124. Zhang J. M., An J. Cytokines, inflammation, and pain / J. M. Zhang, J. An // *International anesthesiology clinics*. – 2007. – T. 45, №. 2. – C. 27-37.
125. Zang Y. The roles and clinical applications of interleukins in endometrial carcinoma / Y. Zang, H. Li, S. Liu, [и др.] // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – T. 12. – C. 1001693.
126. Yu Z. CD146⁺ CAFs promote progression of endometrial cancer by inducing angiogenesis and vasculogenic mimicry via IL-10/JAK1/STAT3 pathway / Z. Yu, Q. Zhang, S. Wei, [и др.] // *Cell communication and signaling*. – 2024. – T. 22, №. 1. – C. 170.

127. Che Q. IL-6 promotes endometrial cancer cells invasion and migration through signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway / Q. Che, X. Xiao, M. Liu [и др.] // Pathology-Research and Practice. – 2019. – Т. 215, №. 6. – С. 152392.
128. Ciortea R., Mihiu D., Mihiu C. M. Association between visceral fat, IL-8 and endometrial cancer / R. Ciortea, D. Mihiu, C. M. Mihiu [и др.] // Anticancer research. – 2014. – Т. 34, №. 1. – С. 379-383.
129. Singh S., Anshita D., Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease / S. Singh, D. Anshita, V. Ravichandiran // International immunopharmacology. – 2021. – Т. 101. – С. 107598.
130. Jorgovanovic D. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review / D. Jorgovanovic, M. Song, L. Wang, & Y. Zhang [и др.] // Biomarker research. – 2020. – Т. 8, №. 1. – С. 49.
131. Crumley S. Identification of a subset of microsatellite-stable endometrial carcinoma with high PD-L1 and CD8+ lymphocytes / S. Crumley, K. Kurnit, C. Hudgens [и др.] // Modern Pathology. – 2019. – Т. 32, №. 3. – С. 396-404.
132. Romero D. Survival benefit with second-line combination in endometrial cancer / D. Romero // Nature Reviews Clinical Oncology. – 2022. – Т. 19, №. 3. – С. 149-149.
133. Kim H., Kim H. J., Ahn H. S. Does endometriosis increase the risks of endometrial hyperplasia and endometrial cancer? / H. Kim, H. J. Kim, H. S. Ahn // Gynecologic Oncology. – 2023. – Т. 169. – С. 147-153.
134. Yamashita H. Evaluation of ARID1A as a potential biomarker for predicting response to immune checkpoint inhibitors in patients with endometrial cancer / H. Yamashita, K. Nakayama, K. Kanno [и др.] // Cancers. – 2024. – Т. 16, №. 11. – С. 1999.
135. Wang L. Hot and cold tumors: Immunological features and the therapeutic strategies / L. Wang, H. Geng, Y. Liu [и др.] // MedComm. – 2023. – Т. 4, №. 5. – С. e343.
136. Beltra J. C. Developmental relationships of four exhausted CD8+ T cell subsets reveals underlying transcriptional and epigenetic landscape control mechanisms / J. C. Beltra, S. Manne, M. S. Abdel-Hakeem [и др.] // Immunity. – 2020. – Т. 52, №. 5. – С. 825-841. e8.
137. Romero P. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes / P. Romero, A. Zippelius, I. Kurth [и др.] // The Journal of Immunology. – 2007. – Т. 178, №. 7. – С. 4112-4119.
138. Suto A. CD25+ FOXP3+ CD45RA– regulatory T-cell infiltration as prognostic biomarker for endometrial carcinoma / A. Suto, T. Minaguchi, N. Qi, [и др.] // BMC cancer. – 2024. – Т. 24, №. 1. – С. 1100.
139. Cai M. C. T-cell exhaustion interrelates with immune cytolytic activity to shape the inflamed tumor microenvironment / M. C. Cai, X. Zhao, M. Cao [и др.] // The Journal of Pathology. – 2020. – Т. 251, №. 2. – С. 147-159.
140. Gitto S. The emerging interplay between recirculating and tissue-resident memory T cells in cancer immunity: lessons learned from PD-1/PD-L1 blockade

- therapy and remaining gaps / S. Gitto, A. Natalini, F. Antonangeli, & F. Di Rosa, // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – T. 12. – C. 755304.
141. Kolben T. Presence of regulatory T-cells in endometrial cancer predicts poorer overall survival and promotes progression of tumor cells / T. Kolben, M. Mannewitz, C. Perleberg, [и др.] // *Cellular Oncology*. – 2022. – T. 45, №. 6. – C. 1171-1185.
142. Li L. ARID1A mutations are associated with increased immune activity in gastrointestinal cancer / L. Li, M. Li, Z. Jiang, & X. Wang // *Cells*. – 2019. – T. 8, №. 7. – C. 678.
143. Wu Z. Identification and validation of a novel multiomics signature for prognosis and immunotherapy response of endometrial carcinoma / Z. Wu, Q. Wang, X. Liu [и др.] // *Journal of Oncology*. – 2022. – T. 2022, №. 1. – C. 8998493.
144. D'incecco A. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients / A. D'incecco, M. Andreozzi, V. Ludovini [и др.] // *British journal of cancer*. – 2015. – T. 112, №. 1. – C. 95-102.
145. Dong Z. Y. Potential predictive value of TP53 and KRAS mutation status for response to PD-1 blockade immunotherapy in lung adenocarcinoma / Z. Y. Doing, W. Z. Zhong, X. C. Zhang [и др.] // *Clinical cancer research*. – 2017. – T. 23, №. 12. – C. 3012-3024.
146. Uniyal P. KRAS mutations in cancer: understanding signaling pathways to immune regulation and the potential of immunotherapy / P. Uniyal, V. K. Kashyap, T. Behl [и др.] // *Cancers*. – 2025. – T. 17, №. 5. – C. 785.
147. Leenhardt F., Alexandre M., Jacot W. Alpelisib for the treatment of PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer / F. Leenhardt, M. Alexandre, W. Jacot [и др.] // *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. – 2021. – T. 22, №. 6. – C. 667-675.
148. Sideris M. The role of KRAS in endometrial cancer: A mini-review / M. Sideris, E. I. Emin, Z. Abdullah [и др.] // *Anticancer Research*. – 2019. – T. 39, №. 2. – C. 533-539.
149. Dias Carvalho P. KRAS oncogenic signaling extends beyond cancer cells to orchestrate the microenvironment / P. Dias Carvalho, C. F. Guimaraes, A. P. Cardoso [и др.] // *Cancer research*. – 2018. – T. 78, №. 1. – C. 7-14.
150. Ribas A. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial / A. Ribas, I. Puzanov, R. Dummer [и др.] // *The lancet oncology*. – 2015. – T. 16, №. 8. – C. 908-918.
151. Jenkins E. The current state and future of T-cell exhaustion research / E. Jenkins, T. Whitehead, M. Fellermeier [и др.] // *Oxford Open Immunology*. – 2023. – T. 4, №. 1. – C. iqad006.

[illegible]

Глубина инвазии миометрия	Эмболы в лимфатических щелях	ИГХ рецепторы эстрогенов	ER PR code	ИГХ HER2	Синдром Линча	ECOG на момент начала ИТТ	НАХТ	Операция

Лимфодиссекция	Адьювант. ЛТ	Адьювант. ХТ	Адьювант. ХТ (режим)	Время между операцией и прогрессированием	Медиана между операцией и датой 1 прогрессирования (в месяцах)	Максимальный ответ на конвенциональное лечение	Наличие ответа 1

Причина смены режима 1	Время между адъювантом и 2-м прогрессир.	Медиана между адъювантной терапией и вторым прогрессир.	Системная терапия 2	Время 2 линии и 3 линии	Медиана между 2 и 3 прогрессир.	Причина смены режима 2	Системная терапия 3	Причина смены режима 3

Системная терапия 4	Причина смены режима 4	Адъювантная системная терапия	Количество рецидивов до начала иммунотерапии	Ме рецидивов	Количество линий терапии до ИТТ	Ме линий	Препараты платины в анамнезе	Сроки рецидива после начала терапии препаратами платины

ЛЕНВАТИНИБ + ПЕМБРОЛИЗУМАБ начало	ЛЕНВАТИНИБ + ПЕМБРОЛИЗУМАБ конец	ЛЕНВАТИНИБ + ПЕМБРОЛИЗУМАБ прогрессирование	Исход	Терапия продолжается, 1- да, 0 - прекращена	Причина отмены терапии ЛЕНВАТИНИБ+ ПЕМБРОЛИЗУМАБ

Дата последнего наблюдения	Число курсов ИТТ	Продолжительность ИТТ, месяцы	Максимальный ответ (1- полный, 2- частичный, 3- стаб, 0-прог)	Эффективность ИТТ	Редукция дозы	Редукция дозы, количество шагов редукции	Количество очагов прогрессирования

Наличие висцеральных мтс	Локализация очагов в тазовых ЛУ	Локализация очагов в парааортальных ЛУ	Локализация очагов во влагалище	Локализация очагов по брюшине	Локализация очагов в легких	Локализация очагов в головном мозге	Локализация очагов в костях

Локализация очагов в отдаленных л\у	Локализация очагов в брюшной стенке	Локализация очагов в мышцах	Нежелательные явления	ОВ (со дня операции)	Общая выживаемость (со дня начала ИТТ)