

МЕХАНИЗМЫ ОПУХОЛЕВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООКРУЖЕНИЯ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Алиев К. А.¹, Олексенко В. В.¹, Зяблицкая Е. Ю.¹, Сорокина Л. Е.^{1,2}

¹Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С. И. Георгиевского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (Медицинский институт им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»), 295051, бул. Ленина, 5/7, Симферополь, Россия

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 117997, ул. Академика Опарина, 4, Москва, Россия

Для корреспонденции: Зяблицкая Евгения Юрьевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, Медицинский институт им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», e-mail: evgu79@mail.ru

For correspondence: Evgeniia Yu. Ziablitskaya, MD, Leading Researcher at the Central Research Laboratory, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky V. I. Vernadsky Crimean Federal University (Medical Institute named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU), e-mail: evgu79@mail.ru

Information about authors:

Aliev K. A., <https://orcid.org/0000-0003-3911-1245>

Oleksenko V. V., <https://orcid.org/0000-0001-7272-1876>

Zyablitskaya E. Yu., <http://orcid.org/0000-0001-8216-4196>

Sorokina L. E., <https://orcid.org/0000-0002-1862-6816>

РЕЗЮМЕ

Целью данной работы стала оптимизация алгоритма ведения пациенток с местно-распространенным раком молочной железы с учетом проблемы формирования терапевтической химиорезистентности. Материал и методы. На первом этапе в исследование включено 187 пациенток с верифицированным диагнозом первичный местно-распространенный рак молочной железы (T_3N_2 , T_4N_{0-3}). В режиме неoadъювантной химиотерапии всем пациентам проведено лечение по схеме AC (доксорубин 60 мг внутривенно, циклофосфамид 600 мг/м² внутривенно), с учетом иммуногистохимического подтипа: а) пациентки с люминальным вариантом дополнительно получали паклитаксел 175 мг/м² внутривенно суммарно до 4 курсов, либо паклитаксел 80 мг/м² внутривенно еженедельно 12 введений; б) пациентки с трижды негативным раком получали паклитаксел 175 мг/м² внутривенно суммарно до 4 курсов, либо паклитаксел 80 мг/м² в комбинации карбоплатином AUC2 внутривенно еженедельно 12 введений. Эффективность лечения оценивали, вычисляя частоту общего объективного ответа (OR) и полного патоморфологического регресса опухоли (pCR). На втором этапе, исходя из полученных результатов, пациентки с люминальным и трижды негативным раком молочной железы разделены на группы с полным терапевтическим ответом (n=10) и резистентным течением (n=10). Контрольную группу составили пациентки с фибroadеномой (n=10). С целью изучения особенностей и механизмов формирования терапевтической резистентности у пациенток с различными гистологическими подтипами рака была проведена оценка экспрессии иммунологических маркеров CD4, CD8, CD20, CD68 и маркеров ангиогенеза HIFa, VEGF, ANGPT2 в ткани молочной железы методом иммуногистохимии. Результаты. В случае люминального, Her2/неу-негативного, а также трижды негативного подтипов показано, что еженедельное введение таксанов в монорежиме, либо в комбинации с препаратами платины (после терапии антрациклинами) статистически значимо не улучшает показатели частичного объективного ответа и степень лечебного патоморфоза опухоли. В ткани опухоли пациенток с лекарственной резистентностью отмечено увеличение числа CD68+-клеток по сравнению с тканью опухоли пациенток с полным ответом на проводимую терапию (p<0,001) и контрольной (p=0,045) группы; а также снижение числа цитотоксических CD8+-клеток в отношении пациенток с нерезистентным течением рака (p=0,032) и контролем (p=0,001). При оценке экспрессии маркеров ангиогенеза в ткани опухоли пациенток с отсутствием ответа на терапию зафиксировано повышение количества HIF-1a-положительно окрашенных клеток в сравнении образцами тканей группы пациенток контроля (p=0,004); повышение степени экспрессии VEGF по сравнению с группой нерезистентного течения рака (p=0,021) и контрольной группой (p<0,001); а также некоторое усиление степени экспрессии ANGPT2 по сравнению с группой контроля (p=0,05). Данные маркеры являются точками приложения таргетной терапии и иммунотерапии. Заключение. Таким образом, знания о молекулярных основах резистентности опухолей молочной железы к неoadъювантной химиотерапии позволяют оптимизировать алгоритм ведения пациенток, повысить качество медицинской помощи, улучшить результаты лечения.

Ключевые слова: рак молочной железы, неoadъювантная химиотерапия, лекарственная устойчивость, микроокружение опухоли, иммуногистохимия.

MECHANISMS OF TUMOR RESISTANCE IN THE MICROENVIRONMENT OF LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER

Aliev K. A.¹, Oleksenko V. V.¹, Zyablitskaya E. Yu.¹, Sorokina L. E.^{1,2}¹Medical Institute named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia²Academician Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

SUMMARY

The aim of this work was to optimize the algorithm for managing patients with locally advanced breast cancer, taking into account the problem of developing therapeutic chemoresistance. Material and methods. The first stage included 187 patients with a verified diagnosis of primary locally advanced breast cancer (T_3N_2 , T_4N_{0-3}). In the neoadjuvant chemotherapy regimen, all patients were treated according to the AC regimen (doxorubicin 60 mg, cyclophosphamide 600 mg/m² i), taking into account the immunohistochemical subtype: a) patients with the luminal variant additionally received paclitaxel 175 mg/m² for a total of up to 4 courses, or paclitaxel 80 mg/m² weekly for 12 administrations; b) patients with triple-negative cancer received paclitaxel 175 mg/m² for a total of up to 4 courses, or paclitaxel 80 mg/m² in combination with carboplatin AUC2 weekly for 12 administrations. The effectiveness of treatment was assessed by calculating the frequency of the overall objective response (OR) and complete pathomorphological tumor regression (pCR). At the second stage, based on the obtained results, patients with luminal and triple-negative breast cancer were divided into groups with a complete therapeutic response (n=10) and resistant course (n=10). The control group consisted of patients with fibroadenoma (n=10). In order to study the characteristics and mechanisms of formation of therapeutic resistance in patients with different histological subtypes of cancer, an assessment of the expression of immunological markers CD4, CD8, CD20, CD68 and angiogenesis markers HIF-1 α , VEGF, ANG2 in breast tissue was carried out using immunohistochemistry. Results. In the case of luminal, Her2/neu-negative, and triple-negative subtypes, it was shown that weekly administration of taxanes in mono regiment either in combination with platinum drugs (after anthracycline therapy) does not statistically significantly improve the rates of partial objective response and the degree of therapeutic pathomorphosis of the tumor. In the tumor tissue of drug-resistant patients, an increase in the number of CD68+cells was noted compared to the tumor tissue of patients with a complete response to therapy (p<0,001) and the control group (p=0,045); as well as a decrease in the number of cytotoxic CD8+cells in relation to patients with non-resistant cancer (p=0,032) and the control (p=0,001). When assessing the expression of angiogenesis markers in the tumor tissue of patients with no response to therapy, an increase in the number of HIF-1 α -positively stained cells was recorded compared to tissue samples from the control group of patients (p=0,004); an increase in the degree of VEGF expression compared to the group with non-resistant cancer (p=0,021) and the control group (p<0,001); as well as a slight increase in the degree of ANG2 expression compared to the control group (p=0,05). These markers are points of application of targeted therapy and immunotherapy. Conclusion. Thus, knowledge about the molecular basis of breast tumor resistance to neoadjuvant chemotherapy allows us to optimize the algorithm for managing patients, improve the quality of medical care, and improve treatment outcomes.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, drug resistance, tumor microenvironment, immunohistochemistry.

В настоящее время рак молочной железы (РМЖ) является онкопатологией с чрезвычайно высокой заболеваемостью у женщин, а смертность от РМЖ занимает первое место среди всех опухолей у женщин. РМЖ занимает лидирующее место среди женских злокачественных новообразований (ЗНО), следовательно, улучшение показателей диагностики и лечения РМЖ становится проблемой глобального значения [1].

Неоадьювантная химиотерапия (НХТ) относится к системной химиотерапии перед применением локальных методов лечения (хирургический метод или лучевая терапия). Если ранее НХТ проводили в основном для пациенток с местнораспространенным или метастатическим РМЖ, то в последние годы значительно расширились показания для проведения этого вида лечения и для начальных стадий. Цель НХТ — трансформировать неоперабельный РМЖ в операбельный, системное действие на метастатический процесс, деэскалация хирургического метода путем увели-

чения доли органосохранных операций, уменьшения объема лимфаденэктомии и улучшение общей и безрецидивной выживаемости [2].

В настоящее время нет единого стандарта в выборе режима НХТ РМЖ. Современные схемы НХТ являются персонализированными, зависят от молекулярно-биологического подтипа опухоли и ряда иных опухолевых предикторов. Как правило, применяют химиотерапевтические препараты антрациклины (доксорубин и эпирубин) в сочетании с такими препаратами, как циклофосфамид, эпирубин и фторурацил. Появление таксанов и их широкий спектр противоопухолевой активность в отношении распространенного РМЖ повышает эффективность НХТ [3].

Несмотря на то, что эффективность НХТ подтверждена результатами многих клинических исследований, в ряде случаев эффективность НХТ у больных РМЖ может существенно различаться, что обусловлено развитием лекарственной устойчивости опухоли [4]. В настоящее время, лекар-

ственная устойчивость к НХТ является одной из наиболее сложных проблем в терапии РМЖ в связи с множественностью и многообразием механизмов, определяющих резистентность опухолевых клеток к существующим схемам лечения.

Резистентность связана с биологическими свойствами опухоли и организма: работой систем детоксикации и репарации ДНК, инверсией программ апоптотической гибели и дополнительной активацией сигнальных путей пролиферации, изменением проницаемости мембраны для лекарств, влиянием микроокружения опухоли [5-10].

Опухолевое микроокружение (ТМЕ) это микросреда, включающая клетки стромы, в том числе сосудов и гематогенные иммунные клетки, мигрировавшие из кровеносного русла. За счет вырабатываемых цитокиновых молекул и рецепторов к ним они тесно взаимодействуют с опухолью, способствуют либо препятствуют опухолевой прогрессии [11, 12].

Целью данного исследования является оптимизация алгоритма ведения пациенток с местно-распространенным РМЖ с учетом проблемы формирования терапевтической химиорезистентности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено наблюдательное когортное проспективно-ретроспективное исследование на базе ГБУЗ РК «Крымский республиканский онкологический клинический диспансер им. В. М. Ефетова» в период с 2020 по 2024 гг.

Проведение работы одобрено этическим комитетом при ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского». Исследование выполнено в соответствии с Протоколом Хельсинской декларации по правам человека (1964 г.). Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие.

На первом этапе включено 187 пациенток с верифицированным диагнозом первичный местно-распространенный РМЖ.

Для оценки эффективности различных схем НХТ разделили пациенток на группы в зависимости от рецепторных свойств опухолевой ткани к эстрогенам и прогестерону (ER, PR) и митотической активности клеток опухоли: выделили тройной негативный (n=57) и люминальный В (n=130) подтипы опухоли.

В режиме НХТ всем пациенткам провели лечение по схеме АС (доксорубицин 60 мг внутривенно (в/в), циклофосфамид 600 мг/м² в/в), с учетом молекулярно-биологического подтипа:

а) пациентки с люминальным вариантом РМЖ дополнительно получали паклитаксел 175 мг/м²

в/в суммарно до 4 курсов, либо паклитаксел 80 мг/м² в/в еженедельно 12 введений);

б) пациентки с трижды негативным РМЖ получали паклитаксел 175 мг/м² в/в суммарно до 4 курсов, либо паклитаксел 80 мг/м² в комбинации карбоплатином АUC2 в/в еженедельно 12 введений).

После смены режима НПХ, или прогрессии злокачественного процесса, проводили промежуточную оценку терапевтического эффекта, включающую инструментальные методы исследования. Анализ результатов НХТ осуществляли после завершения всех этапов, вычисляли частоту общего объективного ответа (OR), полного патоморфологического регресса опухоли (pCR). Размер опухолевого очага определяли на основании данных клинического осмотра и показателей лучевой диагностики, сопоставляя их на этапе до и после проведения НХТ.

На втором этапе работы, исходя из полученных результатов, выделили группы пациенток с люминальным и трижды негативным РМЖ с полным терапевтическим ответом на НХТ (n=10) и резистентным к НХТ течением (n=10). Контрольную группу составили пациентки с фибroadеномой (n = 10).

С целью изучения особенностей и механизмов формирования терапевтической резистентности у пациенток с различными гистологическими подтипами РМЖ провели оценку экспрессии иммунологических маркеров (CD4, CD8, CD20, CD68) и ангиогенеза (HIF-1 α , VEGF, ANGPT2) в ткани молочной железы методом иммуногистохимии (ИГХ).

Вырезку, фиксацию, пропитывание парафином, нарезку и обзорную окраску проводили по стандартной методике с использованием автоматического комплекса (Leica, Германия), аналитический этап – на ИГХ-стейнере Bond-maX и микроскопе DM2000 (Plan 10, 20, 40x) с камерой DFC295 того же производителя. Протокол включал депарафинизацию, высокотемпературную демаскировку эпитопа, блокировку эндогенной пероксидазы, инкубацию с первичным антителом, визуализацию метки диаминобензидином и окраску ядер. Использовали систему визуализации на основе полимера Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystems, Великобритания), концентрированные моно- и поликлональные антитела с кроссреактивностью к ткани человека производства Leica (CD20, clone L26; CD4, clone 4B12), Elabscience (CD8, clone YN00246m), Abcam (CD68, clone 125212; Angp2, clone 8452), Epitomics (HIF1 α , clone EP118) и Thermo Scientific (VEGF, clone RB-9031-P1) в разведениях и протоколах, рекомендованных производителем.

Статистическая обработка результатов выполнена при помощи программного обеспечения Statistica 12.0. Для оценки распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения данных использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Если распределение отличалось от нормального, применяли критерий Манна-Уитни. Различия признаны значимыми при $p < 0,05$. Связь между

переменными оценивали методом ранговой корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинико-морфологическая характеристика 187 пациенток с верифицированным диагнозом первичный местно-распространённый РМЖ, включенных на первом этапе исследования представлена в табл. 1.

Таблица 1. Стратификация групп пациенток в зависимости от молекулярно-биологического подтипа опухоли, абс (%).

Table 1. Stratification of patient groups depending on the molecular biological subtype of the tumor, abs (%).

Стадия РМЖ	Тройной негативный, her2/neu негативный, (n=57)	Люминальный В, (n=130)
T ₃ N ₂	10 (17,6%)	36 (27,7%)
T ₄ N ₀	6 (10,5%)	12 (9,2%)
T ₄ N ₁	27 (47,4%)	60 (46,2%)
T ₄ N ₂	8 (14,0%)	13 (10%)
T ₄ N ₃	6 (10,5%)	9 (6,9%)

В ходе изучения эффективности различных схем НХТ у пациенток различными подтипами РМЖ были получены следующие результаты. Как в случае люминального, Her2/neu-негативного, так и в случае трижды негативного РМЖ показано, что еженедельное введение таксанов в монорежиме, либо в комбинации с препаратами платины (после терапии антрациклинами) статистически значимо не улучшает показатели частичного объективного ответа и степень лечебного патоморфоза опухоли. Об-

ращает на себя внимание, что в группе люминального, Her2/neu-негативного РМЖ частота резистентного течения на фоне проводимой терапии таксанами (паклитаксел 175 мг/м² 1 раз в 21 день), выше по сравнению с антрациклинами ($p=0,0053$). В группе трижды негативного РМЖ лекарственная резистентность на фоне проводимой терапии таксанами (паклитаксел 175 мг/м² 1 раз в 21 день до 4-х курсов) также достоверно выше, по сравнению с антрациклинами ($p=0,02$) (табл. 2).

Таблица 2. Регресс опухоли после проведенных курсов НХТ.

Table 2. Tumor regression after courses of NCT.

Подтип опухоли	Режим НПХ	Частота объективного ответа			
		стабилизация	частичный регресс	полный регресс	прогрессия
Люминальный В, her2/neu негативный, n=130	АС, n=130	31 (23,9%)	91 (70%)	-	8 (6,1%)
	Паклитаксел 175 мг/м ² 1 раз в 21 день до 4х курсов, n=96	5 (5,2%)	52 (54,2%)	21 (21,9%)	18 (18,7%)
	Паклитаксел 80 мг/м ² до 12 введений еженедельно, n=34	2 (5,9%)	20 (58,8%)	7 (20,6%)	5 (14,7%)
Трижды негативный подтип, n=57	АС, n=57	8 (14,0%)	44 (77,2%)	-	5 (8,8%)
	Паклитаксел 175 мг/м ² 1 раз/ 21 день до 4х курсов, n=42, абс (%)	5 (11,9%)	20 (47,6%)	5 (11,9%)	12 (28,6%)
	Паклитаксел 80 мг/м ² в/в + карбоплатин АUC2 в/в до 12 введ. еженедельно, n=15	1 (6,7%)	8 (53,3%)	2 (13,3%)	4 (26,7%)

Последующее фенотипирование иммунных клеток в группах пациентов с фибroadеномой, а также с резистентным и нерезистентным течением РМЖ позволило отметить следующие особенности (рис. 2). В ткани опухоли пациентов с лекарственной резистентностью отмечено значимое увеличение числа CD68+клеток по сравнению с тканью опухоли пациенток с полным ответом на проводимую терапию ($p < 0,001$) и контрольной ($p = 0,045$) группой; тенденция к повышению числа CD4+клеток по сравнению с группой контроля ($p = 0,05$); снижение чис-

ла цитотоксических CD8+клеток в отношении пациенток с нерезистентным течением РМЖ ($p = 0,032$) и контролем ($p = 0,001$); а также достоверное снижение числа CD20+клеток по отношению к группе с полным терапевтическим ответом ($p = 0,002$) и контрольной ($p < 0,001$) группой. В группе с нерезистентным течением РМЖ по сравнению с группой контроля обращает на себя внимание достоверное повышение уровня CD68+клеток ($p = 0,036$), уменьшение CD8+-цитотоксических ($p = 0,02$) и CD20+клеток ($p = 0,001$).

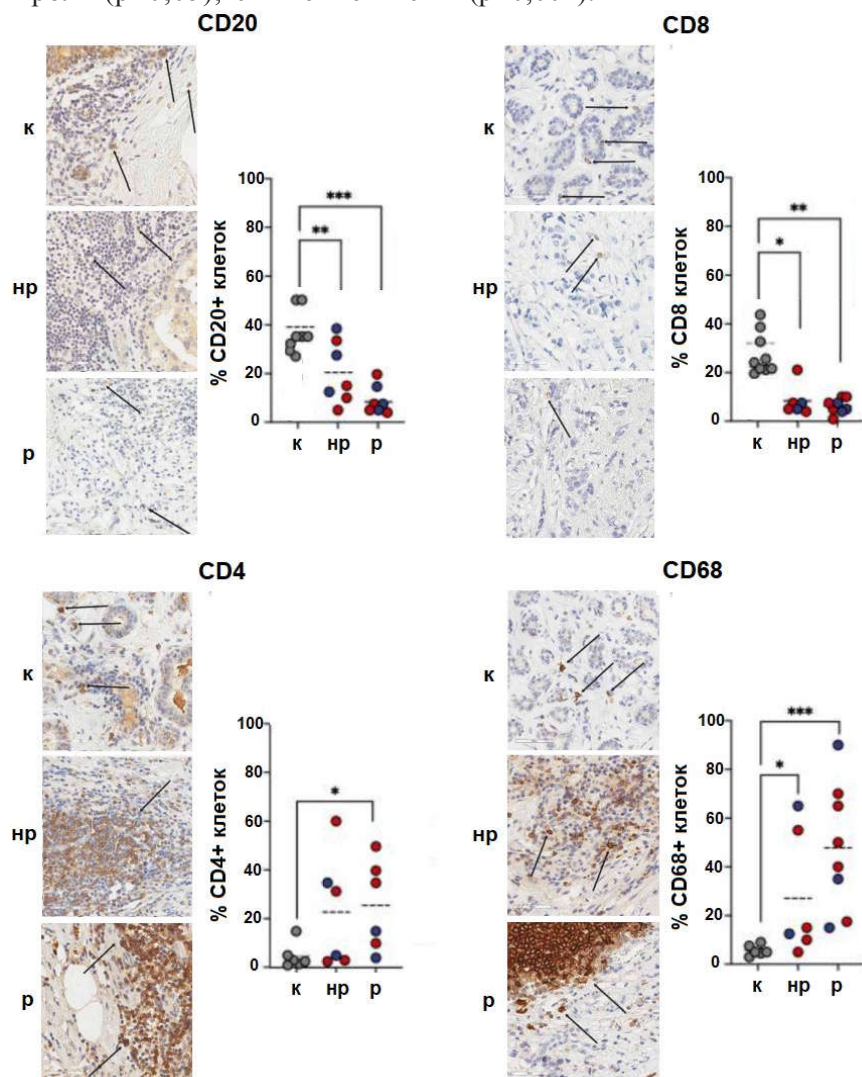


Рис. 1. Экспрессия дифференцировочных маркеров иммунных клеток в группах пациенток контрольной группы (к), с нерезистентным течением РМЖ (нр) и резистентным течением РМЖ (р).

Примечание: Стрелками указаны положительно окрашенные клетки. Серые круги соответствуют контрольной группе, синие круги – пациентки с люминальным, Her2/neu-негативным РМЖ и красные круги – пациентки с трижды негативным РМЖ. * - $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Fig.1. Expression of immune cell differentiation markers in the groups of patients in the control group (c), non-resistant breast cancer (nr) and resistant breast cancer (r).

Note: Arrows indicate positively stained cells. Gray circles correspond to the control group, blue circles – patients with luminal, Her2/neu-negative breast cancer and red circles – patients with triple-negative breast cancer. * - $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Сравнительная оценка экспрессии факторов ангиогенеза представлена на рис. 3. В ткани опухоли пациенток с отсутствием ответа на терапию зафиксировано достоверное повышение количества HIF-1 α -положительно окрашенных клеток в сравнении образцами тканей группы пациенток контроля ($p=0,004$); повышение степени экспрессии VEGF по сравнению с груп-

пой нерезистентного течения РМЖ ($p=0,021$) и контрольной группой ($p<0,001$); а также некоторое усиление степени экспрессированности ANG2 ($p=0,05$) по сравнению с группой контроля. В группе пациенток с полным ответом на НХТ обращает установлено повышение экспрессии HIF-1 α ($p=0,025$), VEGF ($p=0,013$), ANG2 ($p=0,001$).

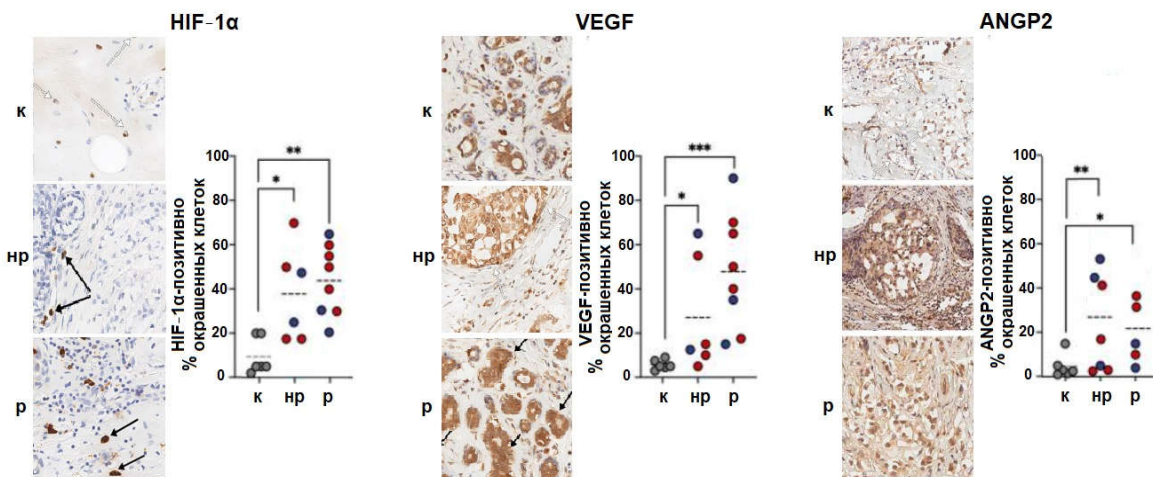


Рис.2. Экспрессия маркеров ангиогенеза в группах пациенток контрольной группы (к), нерезистентным течением РМЖ (nr) и резистентным течением РМЖ (r).

Примечание: Стрелками указаны положительно окрашенные клетки. Серые круги соответствуют контрольной группе, синие круги – пациентки с люминальным, Her2/neu-негативным РМЖ и красные круги – пациенты с трижды негативным РМЖ. * - $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Fig. 2. Expression of angiogenesis markers in the groups of patients of the control group (c), non-resistant breast cancer (nr) and resistant breast cancer (r).

Note: Arrows indicate positively stained cells. Gray circles correspond to the control group, blue circles – patients with luminal, Her2/neu-negative breast cancer and red circles – patients with triple-negative breast cancer. * - $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Проведение корреляционного анализа в группе резистентного течения РМЖ позволило обнаружить значимые корреляционные связи между изучаемыми маркерами. Так, отрицательная корреляция отмечена между количеством CD8+-клеток в ткани опухоли РМЖ и экспрессией HIF ($r=-0,817$, $p=0,002$). Аналогичная ассоциация выявлена для CD8+-клеток и VEGF ($r=-0,620$, $p=0,045$). Положительные корреляционные взаимосвязи выявлены между количеством CD68+-клеток и уровнем HIF ($r=0,851$, $p<0,001$). Аналогичная ассоциация выявлена для CD68+-клеток и VEGF ($r=0,762$, $p=0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день не вызывает сомнения факт целесообразности использования НХТ при РМЖ, однако существующая проблема развития резистентности опухоли к препаратам значитель-

но снижает ожидаемый эффект и является одной из основных причин неудач при лечении [4].

Проведенная нами оценка различных схем НХТ при люминальном, Her2/neu негативном и трижды негативном подтипах РМЖ продемонстрировала отсутствие положительной динамики в отношении показателей частичного объективного ответа и степень лечебного патоморфоза опухоли. Данные результаты указывают на отсутствие универсального режим НХТ и подчеркивают необходимость учета молекулярно-биологических особенностей опухоли при выборе лечения пациенток с РМЖ.

За последние десятилетия механизмы химиорезистентности ЗНО были прецизионно проанализированы. Выявлен ряд механизмов, обеспечивающих устойчивость опухолевых клеток к проводимой комбинированной терапии. Общеизвестным является тот факт, что значительный

вклад в формирование терапевтической резистентности вносит ТМЕ [10].

Особое значение в составе ТМЕ закономерно отводится иммуноцитам, которые являются эффекторами противоопухолевого иммунитета [13]. Проведенное в нашем исследовании фенотипирование иммунных клеток в образцах опухолевой ткани пациенток с различным терапевтическим ответом на НХТ позволило заключить, что один из механизмов формирования лекарственной устойчивости связан с локальной иммунной супрессией. Выявлено, что отсутствие ответа на НХТ сопряжено со смещением соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4⁺/CD8⁺) в сторону снижения цитотоксических CD8⁺ клеток.

CD8⁺ Т-клетки, как первичные эффекторы адаптивной иммунной системы, играют решающую роль в распознавании и уничтожении опухолевых клеток. Клетки CD8⁺, индуцируя апоптоз клеток-мишеней посредством высвобождения цитотоксинов (перфорин, гранзим В) и производя провоспалительные цитокины, такие как IFN- γ и TNF- α , являются важными маркерами эффективности противоопухолевого ответа [14]. Полученные нами данные указывают на прогностическую роль опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в лечении РМЖ и согласуются с результатами работ, выполненных другими авторами. Так, у пациенток с трижды негативным РМЖ, выявили связь между полным ответом на НХТ и количеством опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов [15]. В ходе многофакторного анализа было выявлено, что инфильтрация опухоли молочной железы CD8⁺, CD4⁺ клетками связана с полным ответом на лечение [16]. Прогностическая значимость опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов была также подтверждена проспективно у больных РМЖ, включенных в исследование PREDICT, показавшее, что ответ на НХТ коррелирует с числом лимфоцитов в ТМЕ [17].

Наши результаты показали высокий уровень инфильтрации опухоли CD68⁺ макрофагами при резистентном течении РМЖ. Популяция макрофагов составляет значительную часть ТМЕ и играет регуляторную роль в инвазии и метастазировании РМЖ, иммуносупрессии и формировании лекарственной устойчивости к терапии [18]. В литературе есть противоречивые данные относительно прогностической ценности CD68⁺ макрофагов. Это несоответствие может быть связано с различными методологиями, используемыми для гистологической оценки интратуморальных макрофагов. Кроме того, будучи панмакрофагальным маркером, CD68 не может быть использован для определения принадлежности клеток к субпопуляциям. Между тем преобладание разных типов макрофагов в опухоли харак-

теризует различную успешность лекарственного лечения [19]. В нашем случае повышение количества CD68⁺ клеток в ткани опухоли было сопряжено с формированием терапевтической резистентности. Ранее было экспериментально продемонстрировано, что повышенное количество CD68⁺ клеток в ТМЕ ткани РМЖ, обработанных паклитакселом, способствует формированию терапевтической устойчивости посредством секреции ферментов лизосом, катепсинов В и S-типа [20]. Некоторые исследования показали, что макрофаги могут ограничивать противоопухолевые эффекты химиотерапевтических препаратов, высвобождая протекторные факторы. Например, CD68⁺ клетки могут усиливать резистентность опухоли к НХТ, предоставляя сигналы «выживания» стволовым опухолевым клеткам [21].

В силу патологически быстрого роста клеток РМЖ и высокого уровня метаболизма, последние зачастую находятся в состоянии гипоксии. Гипоксия ТМЕ может вызвать лекарственную устойчивость опухоли, например биологические свойства стволовых опухолевых клеток зависят от гипоксии, поддерживаемой фактором HIF-1 α [22]. Мы также продемонстрировали тенденцию к росту экспрессии HIF-1 α в тканях пациенток с резистентным РМЖ. Ряд работ указывают, что сверхэкспрессия HIF-1 α связана с химиорезистентностью и высоким уровнем смертности пациенток с РМЖ [22, 23].

Изменение сосудистых факторов в нашей работе разнонаправленно: для VEGF характерно увеличение экспрессии в резистентных очагах, а ANG2 в большей степени экспрессируется в тканях пациенток с полным ответом на НХТ. Представленные данные соответствуют общеизвестным представлениям о биологии указанных маркеров. ANG2 считается антиангиогенным фактором, при участии которого сосуды подвергаются регрессии, а секреция VEGF обеспечивает неопластический ангиогенез [24]. Уровень циркулирующего VEGF во время НХТ у пациенток с РМЖ может меняться и зависит от резистентности опухоли [25].

Полученные в нашем исследовании корреляционные взаимосвязи позволяют охарактеризовать потенциальные механизмы формирования лекарственной устойчивости. Обратная корреляция уровня CD8⁺ и степени экспрессии HIF-1 α указывает на возможность истощения Т-клеток под действием гипоксии и ухода опухоли от иммунного надзора [26].

Также обращает на себя внимание отрицательная связь между количеством CD8⁺ клеток и уровнем экспрессии VEGF в группе с лекарственной устойчивостью к НХТ. Эти результаты

согласуются с работами, где отмечена корреляция терапевтической резистентности с повышенной экспрессией VEGF [27], оказывающей влияние на клетки CD8⁺ через подавление созревания антигенпрезентирующих клеток [28].

Прямая связь между количеством CD68⁺ клеток и степенью выраженности экспрессии HIF-1 α и VEGF указывает на вовлеченность популяции макрофагов в процессы стимуляции патологического ангиогенеза и создание гипок-

сического микроокружения вокруг опухолевых клеток [29].

Таким образом, механизм лекарственной резистентности РМЖ более сложен и представляет собой многофакторный и многоэтапный процесс. Накопление знаний о молекулярных основах терапевтической химиорезистентности РМЖ послужили основой оптимизации алгоритма ведения пациенток с местно-распространенными формами (рис. 3).

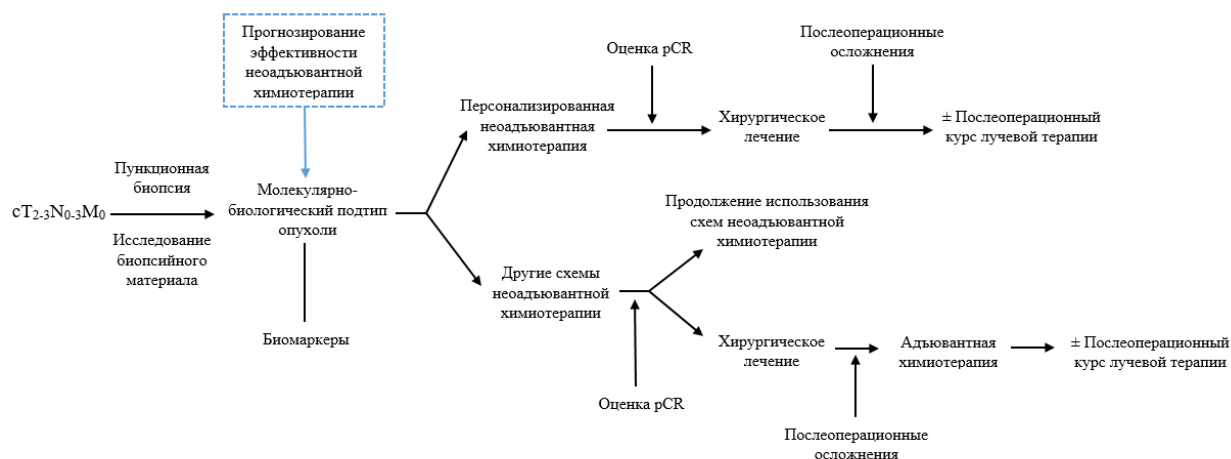


Рис. 3. Алгоритм ведения пациенток с РМЖ
Fig. 3. Algorithm for managing patients with breast cancer

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успешное использование современных химиотерапевтических средств определяется возможностью детального исследования биологических свойств опухоли, включающей определение молекулярных подтипов опухоли в совокупности с комплексным фенотипированием опухолевого микроокружения. Прежде всего, это связано с высокой гетерогенностью ТМЕ, что может обуславливать формирование терапевтической резистентности и прогрессирование заболевания. Проведенное в данной работе многопараметрическое ИГХ-исследование позволило провести точное типирование опухоли и уточнить механизмы, обуславливающие развитие резистентности к НХТ, что необходимо для определения правильного прогноза и подбора оптимальной терапевтической стратегии. Знания о молекулярных основах резистентности опухолей молочной железы к неоадьювантной химиотерапии позволяют оптимизировать алгоритм ведения пациенток, повысить качество медицинской помощи, улучшить результаты лечения.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов

интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Conflict of Interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Финансирование. Работа финансирована государственным заданием по науке Министерства высшего образования и науки Российской Федерации FZEG-2023-0009 «Изучение гетерогенности микроокружения опухоли как фактора ее агрессивности и резистентности к терапии».

Funding. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, state assignment FZEG-2023-0009 «Study of the heterogeneity of the tumor microenvironment as a factor in its aggressiveness and resistance to therapy».

ЛИТЕРАТУРА

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.

2. Wang H., Mao X. Evaluation of the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* 2020;14:2423-33. doi: 10.2147/dddt.s253961.
3. Shen G., Zhao F., Huo X., Ren D., Du F., Zheng F., Zhao J. Meta-Analysis of HER2-Enriched Subtype Predicting the Pathological Complete Response Within HER2-Positive Breast Cancer in Patients Who Received Neoadjuvant Treatment. *Front. Oncol.* 2021;11:632357. doi:10.3389/fonc.2021.632357.
4. Zhao Y., Schaafsma E., Cheng C. Gene signature-based prediction of triple-negative breast cancer patient response to Neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Med.* 2020;9:6281-6295. doi:10.1002/cam4.3284.
5. McDonnell A. M., Dang C. H. Basic review of the cytochrome p450 system. *J Adv Pract Oncol* 2013;4(4):263–8. doi:10.6004/jadpro.2013.4.4.7
6. Salehan M. R., Morse H. R. DNA damage repair and tolerance: a role in chemotherapeutic drug resistance. *Br J Biomed Sci* 2013;70(1):31-40. doi:10.1080/09674845.2013.11669927.
7. Wang Y., Wang X., Zhao H., Liang B., Du Q. Clusterin confers resistance to TNF- α -induced apoptosis in breast cancer cells through NF- κ B activation and Bcl-2 overexpression. *J. Chemother.* 2012;24:348-357. doi: 10.1179/1973947812Y.0000000049.
8. Shen D. W., Goldenberg S., Pastan I., Gottesman M. M. Decreased accumulation of [14 C] carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. *J Cell Physiol* 2000;183(1):108-16. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<108::AID-JCP13>3.0.CO;2-4.
9. Davis N. M., Sokolosky M., Stadelman K. et al. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget.* 2014;5(13):4603–50. doi: 10.18632/oncotarget.2209.
10. Salemme V., Centonze G., Avallè L., Natalini D., Piccolantonio A., Arina P., Morellato A., Ala U., Taverna D., Turco E., Defilippi P. The role of tumor microenvironment in drug resistance: emerging technologies to unravel breast cancer heterogeneity. *Front Oncol.* 2023;13:1170264. doi: 10.3389/fonc.2023.1170264.
11. Зяблицкая Е. Ю., Кубышкин А. В., Сорокина Л. Е., Серебрякова А. В., Алиев К. А., Максимова П. Е., Лазарев А. Э., Балакчина А. И., Головкин И. О. Клеточное микроокружение как объект таргетной терапии злокачественных новообразований. *Успехи молекулярной онкологии.* 2023;10(4):8-20. doi: -10.17650/2313-805X-2023-10-4-8-20.
12. Атаи А., Соловьева В. В., Ризванов А. А., Араб С. Ш. Микроокружение опухоли: ключевой фактор развития рака, инвазии и лекарственной устойчивости. *Ученые записки Казанского университета. Серия «Естественные науки»* 2020;162:507-28. doi: 10.26907/2542-064X.2020.4.507-528.
13. Moura T., Laranjeira P., Caramelo O., Gil A. M., Paiva A. Breast Cancer and Tumor Microenvironment: The Crucial Role of Immune Cells. *Current Oncology.* 2025;32(3):143. doi:10.3390/currncol32030143.
14. Delves P. J., Martin S. J., Burton D. R., Roitt I. M. *Roitt's Essential Immunology*, 13th ed.; Wiley Blackwell: New York, USA; 2017.
15. Ono M., Tsuda H., Shimizu C., Yamamoto S., Shibata T., Yamamoto H., Hirata T., Yonemori K., Ando M., Tamura K., Katsumata N., Kinoshita T., Takiguchi Y., Tanzawa H., Fujiwara Y. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(3):793-805.
16. Seo A. N., Lee H. J., Kim E. J., Kim H. J., Jang M. H., Lee H. E., Kim Y. J., Kim J. H., Park S. Y. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer.* 2013;109(10):2705-13. doi:10.1038/bjc.2013.634.
17. Oda N., Shimazu K., Naoi Y., Morimoto K., Shimomura A., Shimoda M., Kagara N., Maruyama N., Kim S. J., Noguchi S. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;136(1):107-16. doi:10.1016/j.tranon.2018.12.005.
18. Zwager M. C., Bense R., Waaijer S., Qiu S.-Q., Timmer-Bosscha H., De Vries E. G. E., Schröder C. P., Van Der Vegt B. Assessing the Role of Tumour-Associated Macrophage Subsets in Breast Cancer Subtypes Using Digital Image Analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2023;198:11-22. doi:10.1007/s10549-022-06859-y.
19. Qiu S. Q., Waaijer S. J. H., Zwager M. C., de Vries E. G. E., van der Vegt B., Schröder C. P. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? *Cancer Treat Rev.* 2018;70:178-189. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.08.010.
20. Shree T., Olson O. C., Elie B. T., Kester J. C., Garfall A. L., Simpson K., Bell-McGuinn K. M., Zabor E. C., Brogi E., Joyce J. A. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev.* 2011;25(23):2465-79. doi:10.1101/gad.180331.111.

21. De Palma M., Lewis C.E. Macrophage Regulation of Tumor Responses to Anticancer Therapies. *Cancer Cell*. 2013;23(3):277-86. doi: 10.1016/j.ccr.2013.02.013.
22. Myszczyzyn A., Czarnecka A. M., Matak D., Szymanski L., Lian F., Kornakiewicz A., Bartnik E., Kukwa W., Kieda C., Szczylik C. The role of Hypoxia and cancer stem cells in Renal Cell Carcinom Pathogenesis. *Stem Cell Rev*. 2015;11:919-943. doi: 10.1007/s12015-015-9611-y.
23. de Heer E. C., Jalving M., Harris A. L. HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer. *J Clin Invest*. 2020;130(10):5074-5087. doi:10.1172/JCI137552.
24. Danza K., Pilato B., Lacalamita R., Addati T., Giotta F., Bruno A., Paradiso A., Tommasi S. Angiogenetic axis angiopoietins/Tie2 and VEGF in familial breast cancer. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(8):824-30. doi:10.1038/ejhg.2012.273.
25. Ng T., Phey X. Y., Yeo H. L., Shwe M., Gan Y. X., Ng R., Ho H. K., Chan A. Impact of Adjuvant Anthracycline-Based and Taxane-Based Chemotherapy on Plasma VEGF Levels and Cognitive Function in Breast Cancer Patients: A Longitudinal Study. *Clin Breast Cancer*. 2018;18(5):e927-e937. doi:10.1016/j.clbc.2018.03.016.
26. Xie H., Xi X., Lei T., Liu H., Xia Z. CD8+ T cell exhaustion in the tumor microenvironment of breast cancer. *Front Immunol*. 2024;15:1507283. doi:10.3389/fimmu.2024.1507283.
27. Chen P. L., Roh W., Reuben A., Cooper Z. A., Spencer C. N., Prieto P. A., Miller J. P., Bassett R. L., Gopalakrishnan V., Wani K., De Macedo M. P., Austin-Breneman J. L., Jiang H., Chang Q., Reddy S.M., Chen W.S., Tetzlaff M. T., Broaddus R. J., Davies M. A., Gershenwald J. E., Haydu L., Lazar A. J., Patel S. P., Hwu P., Hwu W. J., Diab A., Glitza I. C., Woodman S. E., Vence L. M., Wistuba I. I., Amaria R. N., Kwong L. N., Prieto V., Davis R. E., Ma W., Overwijk W. W., Sharpe A. H., Hu J., Futreal P. A., Blando J., Sharma P., Allison J. P., Chin L., Wargo J. A. Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov*. 2016;6(8):827-37. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1545.
28. Thommen D. S., Schumacher T. N. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(4):547-562. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.012.
29. Zhou J., Tang Z., Gao S., Li C., Feng Y., Zhou X. Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Front Oncol*. 2020;10:188. doi: 10.3389/fonc.2020.00188.
- Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
2. Wang H., Mao X. Evaluation of the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Drug Des. Devel. Ther*. 2020;14:2423-33. doi: 10.2147/dddt.s253961.
3. Shen G., Zhao F., Huo X., Ren D., Du F., Zheng F., Zhao J. Meta-Analysis of HER2-Enriched Subtype Predicting the Pathological Complete Response Within HER2-Positive Breast Cancer in Patients Who Received Neoadjuvant Treatment. *Front. Oncol*. 2021;11:632357. doi:10.3389/fonc.2021.632357.
4. Zhao Y., Schaafsma E., Cheng C. Gene signature-based prediction of triple-negative breast cancer patient response to Neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Med*. 2020;9:6281-6295. doi: 10.1002/cam4.3284.
5. McDonnell A.M., Dang C. H. Basic review of the cytochrome p450 system. *J Adv Pract Oncol*. 2013;4(4):263-8. doi:10.6004/jadpro.2013.4.4.7.
6. Salehan M. R., Morse H. R. DNA damage repair and tolerance: a role in chemotherapeutic drug resistance. *Br J Biomed Sci*. 2013;70(1):31-40. doi:10.1080/09674845.2013.11669927.
7. Wang Y., Wang X., Zhao H., Liang B., Du Q. Clusterin confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in breast cancer cells through NF-kappa B activation and Bcl-2 overexpression. *J. Chemother*. 2012;24:348-357. doi:10.1179/1973947812Y.0000000049.
8. Shen D. W., Goldenberg S., Pastan I., Gottesman M.M. Decreased accumulation of [14C] carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. *J Cell Physiol*. 2000;183(1):108-16. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<108::AID-JCP13>3.0.CO;2-4.
9. Davis N. M., Sokolosky M., Stadelman K. et al. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget*. 2014;5(13):4603-50. doi: 10.18632/oncotarget.2209. doi: 10.3389/fonc.2023.1170264.
10. Salemme V., Centonze G., Avallè L., Natalini D., Piccolantonio A., Arina P., Morellato A., Ala U., Taverna D., Turco E., Defilippi P. The role of tumor microenvironment in drug resistance: emerging technologies to unravel breast cancer heterogeneity. *Front Oncol*. 2023;13:1170264. doi:10.3389/fonc.2023.1170264.
11. Zyablitskaya E. Yu., Kubyshev A. V., Sorokina L. E., Serebryakova A. V., Aliev K. A., Maksimova P. E., Lazarev A. E., Balakchina A. I., Golovkin I. O. Cellular microenvironment

REFERENCES

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global

as an object of targeted therapy for malignant neoplasms. *Advances in Molecular Oncology*. 2023;10(4):8-20. (In Russ.). doi:10.17650/2313-805X-2023-10-4-8-20.

12. Ataei A., Solovyeva V. V., Rizvanov A. A., Arab S. Sh. Tumor microenvironment: a key contributor to cancer progression, invasion, and drug resistance. *Scientific notes of Kazan University. Series "Natural Sciences"* 2020;162:507-28. (In Russ.). doi:10.26907/2542-064X.2020.4.507-528.

13. Moura T., Laranjeira P., Caramelo O., Gil A. M., Paiva A. Breast Cancer and Tumor Microenvironment: The Crucial Role of Immune Cells. *Current Oncology*. 2025;32(3):143. doi:10.3390/currenco132030143.

14. Delves P. J., Martin S. J., Burton D. R., Roitt I. M. *Roitt's Essential Immunology*, 13th ed.; Wiley Blackwell: New York, USA; 2017.

15. Ono M., Tsuda H., Shimizu C., Yamamoto S., Shibata T., Yamamoto H., Hirata T., Yonemori K., Ando M., Tamura K., Katsumata N., Kinoshita T., Takiguchi Y., Tanzawa H., Fujiwara Y. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 132(3):793-805.

16. Seo A. N., Lee H. J., Kim E. J., Kim H. J., Jang M. H., Lee H. E., Kim Y. J., Kim J. H., Park S. Y. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer*. 2013;109(10):2705-13. doi:10.1038/bjc.2013.634.

17. Oda N., Shimazu K., Naoi Y., Morimoto K., Shimomura A., Shimoda M., Kagara N., Maruyama N., Kim S. J., Noguchi S. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;136(1):107-16. doi:10.1016/j.tranon.2018.12.005.

18. Zwager M. C., Bense R., Waaijer S., Qiu S.-Q., Timmer-Bosscha H., De Vries E. G. E., Schröder C. P., Van Der Vegt B. Assessing the Role of Tumour-Associated Macrophage Subsets in Breast Cancer Subtypes Using Digital Image Analysis. *Breast Cancer Res. Treat*. 2023;198:11-22. doi:10.1007/s10549-022-06859-y.

19. Qiu S. Q., Waaijer S. J. H., Zwager M. C., de Vries E. G. E., van der Vegt B., Schröder C. P. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? *Cancer Treat Rev*. 2018;70:178-189. doi:10.1016/j.ctrv.2018.08.010.

20. Shree T., Olson O. C., Elie B. T., Kester J. C., Garfall A. L., Simpson K., Bell-McGuinn K. M., Zabor E. C., Brogi E., Joyce J. A. Macrophages and

cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev*. 2011;25(23):2465-79. doi:10.1101/gad.180331.111.

21. De Palma M., Lewis C. E. Macrophage Regulation of Tumor Responses to Anticancer Therapies. *Cancer Cell*. 2013;23(3):277-86. doi:10.1016/j.ccr.2013.02.013.

22. Myszczyzyn A., Czarnecka A. M., Matak D., Szymanski L., Lian F., Kornakiewicz A., Bartnik E., Kukwa W., Kieda C., Szczylik C. The role of Hypoxia and cancer stem cells in Renal Cell Carcinom Pathogenesis. *Stem Cell Rev*. 2015;11:919-943.

23. de Heer E. C., Jalving M., Harris A. L. HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer. *J Clin Invest*. 2020;130(10):5074-5087. doi:10.1172/JCI137552.

24. Danza K., Pilato B., Lacalamita R., Addati T., Giotto F., Bruno A., Paradiso A., Tommasi S. Angiogenetic axis angiopoietins/Tie2 and VEGF in familial breast cancer. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(8):824-30. doi:10.1038/ejhg.2012.273.

25. Ng T., Phey X. Y., Yeo H. L., Shwe M., Gan Y. X., Ng R., Ho H. K., Chan A. Impact of Adjuvant Anthracycline-Based and Taxane-Based Chemotherapy on Plasma VEGF Levels and Cognitive Function in Breast Cancer Patients: A Longitudinal Study. *Clin Breast Cancer*. 2018;18(5):e927-e937. doi:10.1016/j.clbc.2018.03.016.

26. Xie H., Xi X., Lei T., Liu H., Xia Z. CD8+ T cell exhaustion in the tumor microenvironment of breast cancer. *Front Immunol*. 2024;15:1507283. doi:10.3389/fimmu.2024.1507283.

27. Chen P. L., Roh W., Reuben A., Cooper Z. A., Spencer C. N., Prieto P. A., Miller J. P., Bassett R. L., Gopalakrishnan V., Wani K., De Macedo M. P., Austin-Breneman J. L., Jiang H., Chang Q., Reddy S. M., Chen W. S., Tetzlaff M. T., Broaddus R. J., Davies M. A., Gershenwald J. E., Haydu L., Lazar A. J., Patel S. P., Hwu P., Hwu W. J., Diab A., Glitza I. C., Woodman S. E., Vence L. M., Wistuba I. I., Amaria R. N., Kwong L. N., Prieto V., Davis R. E., Ma W., Overwijk W. W., Sharpe A. H., Hu J., Futreal P. A., Blando J., Sharma P., Allison J. P., Chin L., Wargo J. A. Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov*. 2016;6(8):827-37. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1545.

28. Thommen D. S., Schumacher T. N. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(4):547-562. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.012.

29. Zhou J., Tang Z., Gao S., Li C., Feng Y., Zhou X. Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Front Oncol*. 2020;10:188. doi:10.3389/fonc.2020.00188.