

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЭНДОКРИНОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



Пачуашвили Нано Владимировна

**Иммуногистохимическая характеристика и прогностическое значение иммунного
микроокружения при аденокортикальном раке**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Решетов Игорь Владимирович

кандидат медицинских наук

Урусова Лилия Сергеевна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Современная концепция опухолевого микроокружения	13
1.1.1. Понятие и роль опухолевого микроокружения.....	13
1.1.2. Иммунное микроокружение опухоли	14
1.1.2.1. Противоопухолевый иммунный ответ	14
1.1.2.2. Прогностическое значение иммунного микроокружения.....	15
1.1.3. Иммуноредактирование и уклонение опухоли от иммунного ответа.....	17
1.1.3.1. Роль PD-L1 в ускользании опухоли.....	18
1.1.3.2. Опухоль-ассоциированные макрофаги	19
1.2. Современные представления о раке коры надпочечников	19
1.2.1. Эпидемиология.....	19
1.2.2. Клиническое течение	20
1.2.3. Диагностика	21
1.2.4. Прогноз и выживаемость пациентов	26
1.2.4.1. Клинические прогностические факторы.....	27
1.2.4.2. Морфологические прогностические факторы.....	29
1.2.5. Современный статус лекарственной терапии	30
1.2.6. Иммунное микроокружение в аденокортикальном раке.....	32
1.2.7. Ингибиторы иммунных контрольных точек в терапии аденокортикального рака	35
1.3. Заключение	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1. Материалы и дизайн исследования	39
2.2. Методы исследования.....	41
2.2.1. Морфологические методы.....	41
2.2.2. Иммуногистохимические методы	41
2.2.3. Морфометрические методы	42
2.3. Статистические методы анализа полученных данных	46
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ	
АДЕНОКОРТИКАЛЬНОГО РАКА	47
3.1. Характеристика изучаемой популяции	47

3.2. Клинико-иммуногистохимическая характеристика иммунного микроокружения в различных морфологических подтипах аденокортикального рака.....	49
3.2.1. Анализ экспрессии CD45-пан-лейкоцитарного маркера.....	49
3.2.2. Анализ экспрессии CD3-пан-Т-клеточного маркера	56
3.2.3. Анализ экспрессии маркера CD4.....	63
3.2.4. Анализ экспрессии маркера CD8.....	69
3.2.5. Анализ экспрессии маркера CD68.....	76
3.3. Анализ экспрессии PD-L1 в аденокортикальном раке	83
ГЛАВА 4. ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИММУННОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В АДЕНОКОРТИКАЛЬНОМ РАКЕ.....	87
4.1. Влияние иммунного микроокружения на общую выживаемость пациентов с аденокортикальным раком	87
4.1.1. Общая выживаемость пациентов с аденокортикальным раком в зависимости от различных морфологических подтипов.....	87
4.1.2. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от количества CD45+ иммунных клеток	89
4.1.3. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от количества CD3+ иммунных клеток	92
4.1.4. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от количества CD4+ иммунных клеток	94
4.1.5. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от количества CD8+ иммунных клеток	97
4.1.6. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от количества CD68+ иммунных клеток	99
4.1.7. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от PD-L1 статуса опухоли.....	102
4.2. Влияние иммунного микроокружения на безрецидивную выживаемость пациентов с аденокортикальным раком	103
4.2.1. Безрецидивная выживаемость пациентов в зависимости от различных морфологических подтипов	103
4.2.2. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества CD45+ иммунных клеток	105
4.2.3. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества CD3+ иммунных клеток	108
4.2.4. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества CD4+ иммунных клеток	110

4.2.5. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества CD8+ иммунных клеток	113
4.2.6. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества CD68+ иммунных клеток	115
4.2.7. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от PD-L1 статуса опухоли.....	118
4.3. Прогностические модели для оценки рецидива и выживаемости пациентов с адренокортикальным раком	119
4.3.1. Разработка модели для прогнозирования выживаемости пациентов с адренокортикальным раком	119
4.3.2. Разработка модели для прогнозирования рецидива у пациентов с адренокортикальным раком.....	122
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129
ВЫВОДЫ.....	136
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	138
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	139
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	141
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	161

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Адренкортикальный рак (АКР) – редкая злокачественная эндокринная опухоль из клеток коры надпочечника с частотой встречаемости 0,7–2 случая на 1 млн населения в год [49, 50, 69]. Из-за трудностей диагностики у большинства пациентов опухоль обнаруживается уже на стадии метастазирования, что ограничивает возможности хирургического вмешательства и предполагает крайне неблагоприятный прогноз [29, 52, 152, 189]. При местно-распространенных случаях АКР 5-летняя выживаемость пациентов составляет около 80%, в то время как при распространенном нерезектабельном или метастатическом процессе данный показатель составляет менее 15% [99]. Единственным вариантом полного излечения заболевания является операция, но, к сожалению, она эффективна только у 10% больных [57].

Митотан, препарат с адренолитическими свойствами, является основным препаратом для лечения АКР, но, к сожалению, он часто плохо переносится, в связи с чем его применение ограничено [26, 29, 137, 219]. За последние годы стратегия терапии АКР не изменилась, используемая в настоящее время цитотоксическая химиотерапия включает в себя препараты, которые демонстрируют ограниченную эффективность и высокую токсичность, что свидетельствует о необходимости поиска новых мишеней для таргетной терапии АКР [26, 29, 167].

Согласно литературным данным, АКР является гетерогенной группой заболеваний с различными патоморфологическими и геномными особенностями, что обуславливает вариабельность клинической картины и прогноза для данных пациентов [131]. На протяжении многих лет с целью выявления новых прогностических маркеров проводилось множество исследований, однако большинство из них включали лишь небольшие ретроспективные выборки пациентов, в основном без валидации полученных результатов [77, 127, 154, 166]. Таким образом, необходимость определения прогностических параметров для выбора наиболее эффективной и персонализированной тактики ведения пациентов остается одной из главных и нерешенных проблем

Состав микроокружения опухоли имеет решающее значение для разработки стратегий иммунотерапевтического лечения рака. Одним из компонентов микроокружения опухоли являются иммунные клетки, наличие которых нередко ассоциируется с лучшим прогнозом для пациентов при многих злокачественных новообразованиях [26, 216, 225]. Известно, что в зависимости от спектра вырабатываемых цитокинов различные субпопуляции иммунных клеток способны оказывать разнонаправленное действие на рост опухолевых клеток: часть

иммуноцитов обладает опухоль-стимулирующим действием, другая часть может оказывать противоопухолевое действие. Поэтому для определения прогностического значения иммунного микроокружения опухоли необходимо определять как интенсивность, так и состав иммунного инфильтрата.

Хотя ингибиторы контрольных точек иммунного ответа продемонстрировали впечатляющую клиническую эффективность при ряде злокачественных новообразований, у большинства пациентов по-прежнему обнаруживалась резистентность к иммунотерапии [155, 156]. Данные клинических испытаний демонстрируют, что экспрессия PD-L1 не всегда является надежным предиктором ответа пациента на иммунотерапию [6,7, 157, 158, 164]. Таким образом, в настоящее время также остается нерешенным вопрос поиска соответствующих биомаркеров при АКР для выбора пациентов, которые потенциально могут получать пользу от назначения иммунотерапевтических препаратов, а также от комбинированной терапии для преодоления резистентности. Устойчивость рака к ингибиторам иммунных контрольных точек может быть обусловлена как внутренними опухолевыми клетками (например, экспрессией PD-L1), так и внешними факторами (например, опухоль-инфильтрирующими иммунными клетками), которые способствуют уклонению от иммунного ответа [40, 41, 130].

Степень разработанности темы исследования

Учитывая наличие сравнительно небольшого количества исследований касаясь иммунного микроокружения при АКР, нужно отметить, что в настоящее время детальный анализ состава опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток при АКР, особенно в различных гистологических подтипах опухоли, ранее не проводился [40, 41, 63, 121, 203]. В то же время большинство опубликованных исследований с использованием результатов секвенирования РНК рассматривают весь набор данных The Tumor Genome Cancer без учета морфологических подтипов опухолей, однако имеющиеся данные показывают, что различные подтипы опухоли могут различаться не только по характерным цитологическим особенностям опухолевых клеток, но и по количеству и субпопуляционному составу иммунного инфильтрата, что может играть существенную роль в определении прогностического значения иммунного микроокружения при АКР [122].

Выявление экспрессии иммунологических маркеров и ее уровня являются перспективными направлениями в фундаментальных исследованиях АКР. При этом изучение интенсивности и субпопуляционного состава иммунного инфильтрата опухолей коры надпочечников является абсолютно новым направлением, позволяющим не только расширить

наши представления о биологии АКР, но и, возможно, выявить новые критерии диагностики и прогнозирования биологического поведения данной опухоли.

Таким образом, отсутствие альтернативных препаратов, ограниченная эффективность цитостатической терапии, а также низкая чувствительность клеток опухоли к терапии диктуют нам необходимость проведения клинических исследований, направленных на изучение новых молекулярно-биологических мишеней, которые помогут в определении чувствительности опухоли к иммунотерапии.

Цели и задачи

Целью работы является оценка субпопуляционного состава и прогностического значения иммунного микроокружения опухоли в различных гистологических подтипах аденокортикального рака.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать интенсивность и субпопуляционный состав иммунного инфильтрата в аденокортикальном раке с учетом морфологического подтипа опухоли (классический, онкоцитарный, миксоидный, смешанный);
2. Изучить влияние клинических параметров на интенсивность иммунного инфильтрата при аденокортикальном раке (возраст, пол, гормональная активность, размер первичного опухолевого узла и/или метастатических очагов и др.);
3. Изучить влияние интенсивности иммунного инфильтрата на PDL-1-статус опухоли при аденокортикальном раке;
4. Изучить влияние интенсивности иммунного инфильтрата на выживаемость пациентов с аденокортикальным раком с учетом морфологических подтипов опухоли;
5. Оценить влияние PDL-1-статуса опухоли на выживаемость пациентов с аденокортикальным раком;
6. По результатам полученных данных создать математические модели для прогнозирования риска летального исхода и прогрессирования аденокортикального рака на основании иммунного инфильтрата опухоли.

Научная новизна исследования

В рамках диссертационной работы впервые исследована характеристика состава иммунного микроокружения опухоли в аденокортикальном раке с учетом различных

морфологических подтипов опухоли. Продемонстрировано, что онкоцитарный гистологический подтип демонстрирует статистически значимо более выраженную иммунную инфильтрацию, чем классический.

Впервые определено влияние гормональной активности опухоли на интенсивность иммунного микроокружения в аденокортикальном раке, а также влияние опухоль-инфильтрирующих CD68+ макрофагов на вероятность метастазирования опухоли. Установлено, что у пациентов с признаками отдаленного метастазирования опухоли отмечается достоверно более низкое содержание CD68+ макрофагов в паренхиме опухоли.

Впервые определено влияние состава и интенсивности иммунного микроокружения опухоли на выживаемость пациентов с аденокортикальным раком. Показано, что повышенная экспрессия маркеров иммунных клеток (CD45, CD3, CD4, CD8) ассоциирована с лучшей как общей так и безрецидивной выживаемостью.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выявление состава и интенсивности иммунной инфильтрации в различных гистологических подтипах аденокортикального рака позволяет патоморфологам и онкологам судить о биологических свойствах опухоли и клиническом течении обсуждаемого заболевания.

Выявленные прогностические факторы могут быть использованы клиницистами для определения персонализированной тактики ведения пациентов с аденокортикальным раком. Разработанные математические модели могут помочь в определении риска летального исхода и рецидива данного заболевания.

Полученные результаты открывают перспективы для поиска и разработок новых таргетных иммунных препаратов для лечения пациентов с различными гистологическими подтипами аденокортикального рака.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа представляет собой ретроспективное когортное исследование на материале 73 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом аденокортикального рака.

В ходе исследования проведен тщательный анализ иммуногистохимических характеристик иммунного инфильтрата опухоли, панель антител включала в себя маркеры CD45, CD3, CD4, CD8, CD68, а также маркер PD-L1. Выполнен анализ прогностической значимости иммунного инфильтрата опухоли в различных гистологических подтипах, далее на основании

полученных результатов разработаны две математические модели для прогнозирования рисков летального исхода и рецидива аденокортикального рака.

Полученные данные были проанализированы и обработаны с применением передовых статистических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Онкоцитарный гистологический подтип аденокортикального рака характеризуется более выраженной CD45+ иммунной инфильтрацией в паренхиме и строме опухоли, а также CD3+, CD4+ и CD8+ иммунной инфильтрацией в паренхиме опухоли по сравнению с классическим подтипом, что в свою очередь ассоциировано с лучшей общей и безрецидивной выживаемостью пациентов.

2. Низкая экспрессия CD68+ макрофагов в паренхиме опухоли ассоциирована с наличием отдаленных метастазов аденокортикального рака.

3. В PD-L1-позитивных аденокортикальных карциномах отмечается менее выраженная инфильтрация CD68+ макрофагами в паренхиме опухоли в сравнении с PD-L1-негативными образцами, в то же время пациенты с PD-L1-позитивными опухолями демонстрируют более низкую общую и безрецидивную выживаемость.

4. Факторами достоверно влияющими на общую и безрецидивную выживаемость пациентов с аденокортикальным раком являются уровни CD45+, CD3+, CD4+ и CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли, а также PD-L1 статус опухоли.

5. Разработаны две прогностические математические модели на основании иммуногистохимической оценки иммунного инфильтрата опухоли – модель для прогнозирования риска летального исхода ($p=0,01$, χ^2) и модель для прогнозирования риска развития рецидива аденокортикального рака ($p=0,002$, χ^2).

Степень достоверности и апробация результатов

Теоретические аспекты, методология и выводы, изложенные в данной работе, базируются на основательном и детальном анализе клинических данных, при этом использованы различные современные статистические методы, соответствующие целям исследования. Количество и качество представленных данных обеспечивают их репрезентативность и адекватность для достижения поставленных целей, а также надежность полученных результатов и сделанных на их основе выводов.

Основные результаты исследования представлены в виде докладов на российских и международных конференциях, конгрессах и форумах: “ESMO Targeted Anticancer Therapies Congress (TAT)” (Paris, France, 2023), Международном форуме «Инновационная онкология» посвященный 95-летию со дня рождения Н.Н. Трапезникова (Москва, 2023), VI Международном форуме онкологии и радиотерапии «For Life» (Москва, 2023), конференции «Вычислительная биология и искусственный интеллект для персонализированной медицины – 2023» (Москва, 2023), II Конференции по онкоэндокринологии и аутоиммунным эндокринным заболеваниям (Москва, 2023), Научно-практической конференции «Абрикосовские чтения» (Москва, 2023), Конкурсе молодых ученых в рамках XXVI Российского онкологического конгресса (Москва, 2022), VIII Петербургском Международном онкологическом форуме «Белые ночи 2022» (Санкт-Петербург, 2022), V Инновационном Петербургском медицинском форуме «Алмазовский медицинский форум» (Санкт-Петербург, 2022), 80-ой Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2022), IV Съезде патологоанатомов республики Беларусь с международным участием «Современная патологическая анатомия: научно-практический опыт, пути совершенствования и инновационные технологии морфологической диагностики, роль в клинической практике, актуальные проблемы и перспективы развития» (Минск, 2022), XVII Международной / XXVI Всероссийской Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2022), Всероссийской научно-практической студенческой конференции с международным участием «Медицинская весна – 2022» (Москва, 2022), I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Орфанные болезни: прошлое, настоящее, будущее» (Москва, 2022), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной проведению международного года фундаментальных наук в интересах устойчивого развития «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, 2022), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская весна – 2021» (Москва, 2021), Научно-практической конференции с международным участием «Путь в науку-2021».

Работа стала победителем на конкурсах в рамках конференций и форумов: Международном форуме «Инновационная онкология» посвященный 95-летию со дня рождения Н.Н. Трапезникова (Москва, 2023) – 1 место в постерной сессии; II Конференции по онкоэндокринологии и аутоиммунным эндокринным заболеваниям (Москва, 2023) – 1 место в постерной сессии; 80-ой Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2022) – 2 и 3 место в конкурсе молодых ученых; Всероссийской научно-практической студенческой конференции с международным участием «Медицинская весна – 2022» (Москва,

2022) – 1 и 2 место в конкурсе молодых ученых; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Орфанные болезни: прошлое, настоящее, будущее» (Москва, 2022) – 1 место в номинации «Лучший постерный доклад»; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская весна – 2021» (Москва, 2021) – 1 место в конкурсе молодых ученых; Научно-практической конференции с международным участием «Путь в науку-2021» – 1 место в конкурсе молодых ученых.

Апробация диссертационной работы проведена на совместном расширенном межучрежденческом заседании кафедры онкологии, радиотерапии и реконструктивной хирургии Института клинической медицины, Института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и кафедры персонализированной и трансляционной медицины ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, протокол №2-2024 от 05.02.2024 г.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует отрасли медицинских наук, паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, согласно пункту 2 направлений исследований (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.)), а также паспорту научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия, а именно пункту 2 (Научный анализ патологических процессов, лежащих в основе заболевания, прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов) и 4 научных исследований (Исследование морфо- и танатогенеза заболеваний, роли различных органных, тканевых систем в становлении основного заболевания (полиорганность патологии) и его исходах).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований используются в лечебном процессе Клиники онкологии, реконструктивной хирургии и радиологии Университетской Клинической больницы №1 (Акт №343 от 11.01.2024 г.), а также в учебный процесс Института клинической морфологии и цифровой патологии при изучении дисциплин патологическая анатомия, читаемых ординаторам

(аспирантам) по направлению подготовки (специальности) 31.08.07 патологическая анатомия (Акт №345 от 11.01.2024 г.).

Личное участие автора в получении научных результатов

Диссертант непосредственно участвовал во всех этапах исследовательской работы. Автором проанализирован большой объем научной литературы по изучаемой теме. Автор лично выполнил весь экспериментальный фрагмент работы, непосредственно проводил гистологические и иммуногистохимические исследования операционного материала от пациентов с аденокортикальным раком. Автором лично выполнена статистическая обработка и интерпретация полученных данных, сформулированы основные положения, выводы и практические рекомендации, написан текст рукописи и подготовлены основные научные публикации по теме диссертационной работы.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования опубликовано 28 печатных работ, в том числе 5 научных статей в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus, 23 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, двух глав с описанием полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Общий объем диссертации изложен на 161 странице, включает 74 рисунка, 57 таблиц и 1 схему. Список литературы включает 225 источников, в том числе 45 русскоязычных и 180 англоязычных публикаций.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современная концепция опухолевого микроокружения

1.1.1. Понятие и роль опухолевого микроокружения

Опухолевые клетки стимулируют значительные молекулярные, клеточные и физические изменения в окружающих тканях. Формирующееся опухолевое микроокружение (tumor microenvironment, TME) является сложной и динамической средой, в которой опухолевые и неопухолевые клетки активно взаимодействуют между собой [110]. Считается, что TME является не просто «молчаливым наблюдателем», а скорее активным стимулятором прогрессирования рака. На ранних стадиях роста опухоли между раковыми клетками и компонентами TME развиваются динамичные и взаимовыгодные отношения, способствующие выживанию раковых клеток, локальной инвазии и распространению метастазов [212]. Чтобы преодолеть гипоксическую и кислую микросреду, TME координирует программу, которая способствует ангиогенезу для восстановления снабжения кислородом/питательными веществами и удаления метаболических продуктов [62, 132]. TME представлена опухоль-ассоциированными фибробластами и внеклеточным матриксом, эндотелиоцитами и перицитами, а также иммунными и воспалительными клетками. TME также включает внеклеточные сигнальные молекулы, цитокины, хемокины, факторы роста, а также метаболические регуляторы. Опухоли инфильтрированы различными адаптивными и врожденными иммунными клетками, которые могут оказывать как про-, так и противоопухолевое действие [221].

Накопленные за последние годы данные свидетельствуют о том, что иммунное микроокружение играет важнейшую роль в патогенезе, росте, прогрессировании и биологическом поведении опухоли, а также ответе на противоопухолевую терапию [101, 111].

1.1.2. Иммунное микроокружение опухоли

ТМЕ включает в себя все типы клеток врожденного и специфического иммунитета, в том числе макрофаги, дендритные клетки (ДК), естественные киллеры (NK-клетки), В-лимфоциты и различные субпопуляции эффекторных Т- лимфоцитов – Т-хелперы 1, 2 и 17 (Th1, Th2, Th17), регуляторные Т-лимфоциты (Treg) и цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) [28, 30, 31, 218]. Gu-Trantien C. et al. в своем исследовании пришли к выводу, что в опухоль-инфильтрирующих лимфоциты (TIL) CD3+ Т-лимфоциты составляют около 75%, CD20+ В-лимфоциты – менее 20%, моноциты – менее 10%, а NK-клетки – менее 5% от общего количества опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) [28, 31, 75].

Наличие иммунных клеток в опухоли обеспечивает противоопухолевый неспецифический и антигенспецифический адаптивный иммунный ответ, который направлен на уничтожение новообразования [30, 181].

1.1.2.1. Противоопухолевый иммунный ответ

Главными клетками обеспечивающими адаптивный противоопухолевый иммунный ответ являются Т-лимфоциты, они мигрируют из кровотока в опухоль и нацелены на уникальные пептиды, известные как опухолеассоциированные антигены (ОАА), которые, в свою очередь, образуются в результате злокачественной трансформации и располагаются на поверхности опухолевых клеток в составе главного комплекса гистосовместимости I класса (MCH I) [20].

CD3 является общим маркером всех Т-лимфоцитов, среди которых выделяют CD4+ Т-хелперы, CD8+ ЦТЛ и FoxP3+ Treg [6, 7]. CD8+ ЦТЛ способны распознавать ОАА. Активированные ЦТЛ проникают в опухоль и путем перфорин/гранзим-зависимого контактного цитолиза напрямую уничтожают опухолевые клетки, на поверхности которых находятся ОАА, также ЦТЛ способны вызывать опосредованное разрушение опухолевых клеток путем выделения эффекторных цитокинов, таких как интерферон-гамма (IFN γ) и фактор некроза опухоли [6, 7, 115].

CD4+ Т-лимфоциты представлены Th1, Th2 и FoxP3+ Treg. CD4+ Th1 необходимы для помощи CD8+ Т-киллерам в реализации их функции посредством секреции IFN γ . В большинстве случаев, опухолевые клетки на своей поверхности не экспрессируют молекулы МНС II класса,

которые необходимы для идентификации Т-лимфоцитами. Однако, некоторые виды опухолей, такие как меланома, способны экспрессировать МНС II класса, как естественным образом, так и под воздействием индукции $IFN\gamma$, что позволяет им представлять антигены Th1. FoxP3+ T-регуляторные клетки способны подавляют противоопухолевый иммунный ответ, а также поддерживать иммунологическую толерантность к собственным антигенам организма [6,7, 115]. Как утверждают Gu-Trantien C. et al. большинство CD4+ Т-лимфоцитов также могут быть представлены CD45RO+ клетками памяти [75].

1.1.2.2. Прогностическое значение иммунного микроокружения

За последние годы появилось множество научных работ, демонстрирующих связь между ТЛ и клиническими исходами для пациентов с различными злокачественными новообразованиями [5, 216, 225].

Мета-анализ 43 исследований, включавших в общей сложности 21 015 пациентов с колоректальным раком (КРР), показал, что высокая иммунная инфильтрация опухоли связана с лучшей общей выживаемостью (ОВ) (HR 0,65; 95% CI 0,54–0,77), онкоспецифической (HR 0,58; 95% CI 0,46–0,73) и безрецидивной выживаемостью (БРВ) больных (HR 0,72; 95% CI 0,60–0,88) [205]. Rozek et al. посредством многофакторного анализа 2369 случаев КРР также обнаружили, что высокое значение ТЛ (HR = 0,76, 95% CI 0,64–0,89, $p < 0,001$) являются благоприятными прогностическими факторами для онкоспецифической и ОВ [215].

Недавнее исследование субпопуляционного состава опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток показало, что наибольшее влияние на выживаемость пациентов оказывают CD8+ Т-клетки [6, 41, 71]. Роль CD8+ ЦТЛ впервые была проанализирована в большой когорте пациентов с КРР более 15 лет назад, с тех пор было опубликовано множество исследований, которые также показали, что высокий уровень ЦТЛ в ТМЕ связан с противоопухолевым действием и лучшим прогнозом при различных видах рака [217, 92].

Мета-анализ 14 исследований, с участием в общей сложности 2015 пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой выявил положительную корреляцию между высоким уровнем CD8+ Т-лимфоцитов и ОВ (HR 0,71; 95% CI 0,51–0,99; $p = 0,04$) и БРВ (HR 0,66; 95% CI 0,47–0,92; $p = 0,01$) [208]. Крупное когортное исследование, включавшее 1815 пациентов с раком яичников продемонстрировало, что наличие CD8+ Т-лимфоцитов сопровождалось лучшей ОВ (ОР 0,45; 95% ДИ 0,34–0,58; $p = 0,001$) и БРВ (ОР 0,46; 95% ДИ 0,25–0,67), независимо от

клинико-патологических характеристик [175]. В большинстве исследований отмечается, что присутствие в опухолевом инфильтрате CD8⁺ клеток имеют большее значение, в сравнении с CD3⁺ клетками [59]. Однако, несмотря на то, что CD8⁺ Т-клетки связаны с лучшим прогнозом, разнообразные функциональные профили и маркеры CD8⁺ клеток в ТМЕ усложняет интерпретацию полученных данных [6, 7, 67].

Как уже было сказано, CD4⁺ Т-лимфоциты являются медиаторами клеточного иммунитета и играют ключевую роль в активации других иммунных клеток, таких как В-клетки и цитотоксические Т-клетки, таким образом модулируя иммунные ответы. CD4⁺ Т-клетки дифференцируются в субпопуляции клеток, включая Th1, Th2, Th17 и Treg клетки.

Th1 обеспечивают клеточно-опосредованный иммунный ответ путем активации других иммунных клеток (макрофагов, В-клеток и CD8⁺ ЦТЛ), которые играют важную роль в устранении внутриклеточной инфекции и уничтожении опухолевых клеток. Th1 и производные от них цитокины (например, IFN- γ , TNF- α и т. д.) тесно связаны с хорошими клиническими исходами почти при всех типах рака [67, 84, 184]. Однако в отличие от эффектов Th1, анализ влияния других подмножеств CD4⁺ Т-клеток на клинические исходы носит в литературе довольно противоречивый характер.

Прогностические эффекты Th2, Th17 и Treg клеток также различаются в зависимости от типа и стадии рака. Th2 способны к активации В-клеток, а также продукции IL-10, который обладает иммуносупрессивным действием, что объясняет их преобладание в иммунном инфильтрате агрессивных типов опухолей [74, 123, 185]. В то же время многочисленные исследования показали, что Th2 связаны с хорошим прогнозом при лимфоме Ходжкина [169] и раке молочной железы [109], но с плохими клиническими исходами при раке яичников [185], желудка [98] и поджелудочной железы [123].

Прогностическая роль Th17 при немелкоклеточном раке легкого [117] и гепатоцеллюлярной карциноме [118] была связана с плохим прогнозом для пациентов, однако с лучшей выживаемостью при раке пищевода, желудка, яичников и шейки матки [124, 143, 182, 197]. Th17 клетки известны своей способностью к трансдифференцировке в более иммуносупрессивный фенотип, что, как предполагается, может приводить к уклонению опухоли от иммунного ответа. Кроме того, IL-17, вырабатываемый Th17 клетками, связывают с увеличением ангиогенеза, что может способствовать росту и распространению опухоли. С другой стороны Th17 привлекают в опухоль ЦТЛ и дендритные клетки, что способствует уничтожению опухолевых клеток [124]. Влияние клеток Th17 на развитие рака, по всей видимости, в значительной степени определяется спецификой микроокружения опухоли. Эта гибкость Th17 клеток служит основанием для изучения антитуморного иммунного ответа и разработки новых стратегий иммунотерапии рака. [195].

Роль Treg клеток в течении последнего десятилетия также остается предметом дискуссий [195]. Curiel et al. впервые продемонстрировали корреляцию между опухоль-инфильтрирующими Treg клетками и низкой выживаемостью пациентов с раком яичников [191]. Однако в последующих исследованиях сообщалось, что Treg клетки не оказывают влияние на выживаемость при глиобластомах [172], но оказывают положительное влияние при раке носоглотки [90], головы и шеи [176].

В мета-анализе 2011 г. авторы пришли к выводу, что при большинстве солидных опухолей (в том числе раке яичников, эндометрия, шейки матки, молочной железы, гепатоцеллюлярной карциноме, почечно-клеточном раке, раке желудка, а также КРР) FoxP3+ T-регуляторные клетки не оказывают значимого влияния на ОВ и БРВ [17, 206], однако в более поздних исследованиях была обнаружена связь FoxP3 + TIL с негативным прогнозом при некоторых видах рака [100, 177, 208, 209]. Тем не менее Asahi et al. не обнаружили статистически значимой корреляции между высокой плотностью внутриопухолевых FoxP3+ TIL и ОВ при раке желудка и холангиокарциноме [168].

1.1.3. Иммуноредактирование и уклонение опухоли от иммунного ответа

Иммуноредактирование рака — это динамический процесс, включающий иммунный надзор и прогрессирование опухоли. Он описывает взаимосвязь между опухолевыми клетками и иммунной системой и включает в себя три фазы: элиминация, равновесие и ускользание. Во время элиминации эффекторные клетки могут обнаруживать и уничтожать злокачественные клетки, что приводит к высвобождению ОАА и их презентации T-лимфоцитам, запуская специфический адаптивный противоопухолевый иммунный ответ. Во время фазы равновесия опухолевые клетки уклоняются от уничтожения, однако адаптивный иммунитет продолжает контролировать рост опухоли, поддерживая опухолевые клетки в состоянии функционального покоя. На стадии ускользания опухолевые клетки продолжают бесконтрольно расти и размножаться и больше не ограничиваются иммунным ответом. Субклоны опухолей, которые приобрели изменения, могут избежать обнаружения и уничтожения [11, 129, 147].

1.1.3.1. Роль PD-L1 в ускользании опухоли

Известно, что уклонение опухоли от иммунного ответа обеспечивает множество механизмов, ключевым из которых является PD1/PDL1-сигнальный путь [146].

PD-1 (рецептор программируемой клеточной гибели 1, англ. Programmed (cell) Death 1, CD279), член семейства B7-CD28, представляет собой трансмембранный белок клеточной поверхности [106]. Задача PD-1 заключается в ингибировании цитотоксических Т-лимфоцитов, что приводит к развитию иммунной толерантности к собственным клеткам и белкам организма, таким образом предотвращая возникновения аутоиммунных реакции [130].

PD-1 имеет два известных лиганда: PD-L1 (Programmed (cell) Death Ligand 1, B7-H1) и PD-L2 (B7-DC), которые имеют разные профили экспрессии [6, 7]. Оба лиганда экспрессируются на антигенпрезентирующих клетках (АПК), в том числе на дендритных клетках. PD-L1, который играет ключевую роль в PD-1-зависимой иммуносупрессии, экспрессируется в широком спектре клеток, включая клетки кроветворной, эндотелиальной и эпителиальной ткани. В отличие от него, PD-L2 имеет ограниченную экспрессию, в основном на активированных макрофагах и ДК. Связывание PD-L1 или PD-L2 с PD-1 приводит к ингибированию передачи сигналов Т-клеточного рецептора и подавлению экспрессии определенных антиапоптотических молекул и провоспалительных цитокинов [106, 183].

Известно, что опухолевые клетки могут использовать PD1/PDL1-сигнальный путь иммунных контрольных точек для создания иммуносупрессивной среды и обеспечения роста опухоли. Некоторые типы рака сверхэкспрессируют PD-L1, что помогает им избегать иммунного надзора со стороны Т-эффекторных клеток [6, 7]. Доказано, что опухоль-ассоциированные нейтрофилы и макрофаги, дендритные клетки, естественные киллеры, В-лимфоциты, опухолеспецифические Т-лимфоциты и их регуляторные помощники способны также экспрессировать PD-L1, однако точное значение экспрессии PD-L1 активированными Т-лимфоцитами до сих пор остается предметом дискуссии [6, 7, 155, 156].

Экспрессия PD-L1 была проанализирована во многих солидных опухолях, включая опухоли легкого [157], молочной железы [158], уrogenитального [8, 159] и желудочно-кишечного трактов [6, 7, 164], меланому [183], глиобластому [76] и другие злокачественные опухоли. Было установлено, что в иммунотерапия оказывает большую эффективность в опухолях с положительной экспрессией PD-L1 [58]. В то же время результаты клинических исследований показывают, что для множества опухолей PD-L1 является крайне неоднозначным прогностическим маркером, что связано с высокой гетерогенностью его экспрессии, в том числе в зависимости от ранее проводимой терапии [6, 7, 13, 155].

1.1.3.2. Опухоль-ассоциированные макрофаги

Известно, что опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) играют важную роль в формировании иммуносупрессирующего опухолевого микроокружения [213].

В зависимости от набора поверхностных маркеров, факторов, влияющих их дифференцировку и спектра продуцируемых цитокинов ОАМ подразделяют на две основные субпопуляции: М1 макрофаги, которые являются провоспалительными, и М2 макрофаги, обладающие противовоспалительными свойствами. Известно, что в присутствии противоопухолевого цитокина $IFN\gamma$ ОАМ способны приобретать в М1 фенотип. Данная субпопуляция ОАМ обеспечивает презентацию антигена, а также способна к выработке фактора некроза опухоли, $IL-6$, $IL-1$ и $IL-12$, что способствует стимуляции Th1-опосредованного иммунного ответа [30, 214]. В присутствии $IL-4$, $IL-10$ и $TGF-\beta$ ОАМ могут приобретать М2 фенотип. М2 макрофаги способны подавлять активность эффекторных Т-клеток, тем самым способствуя ангиогенезу, росту и метастазированию опухоли [9, 30, 192, 194].

Согласно данным литературы М1 макрофаги ассоциированы с повышенной ОВ, а их обнаружение является благоприятным прогностическим фактором, например при колоректальном раке [101, 174].

1.2. Современные представления о раке коры надпочечников

1.2.1. Эпидемиология

Адренокортикальный рак (АКР) – редкая злокачественная эндокринная опухоль из клеток коры надпочечника [40, 41, 69]. Частота встречаемости данного заболевания составляет 0,7–2 случая на 1 млн населения в год [10, 49, 50]. АКР может обнаруживаться в любом возрасте, однако в некоторых исследованиях описано бимодальное распределение с пиком заболеваемости в 1-й и 4–5-й декадах жизни, в других же исследованиях описан один пик заболеваемости со средним возрастом 50-56 лет [4, 189]. Тем не менее независимо от возраста АКР демонстрирует

повышение частоты заболеваемости у пациентов женского пола (соотношение женщин и мужчин: 1,5-2,5:1) [52].

АКР носит преимущественно спорадический характер, реже наблюдается в составе наследственных синдромов, таких как синдром Ли-Фраумени, синдром Беквита-Видеманна, синдром Карнея и множественная эндокринная неоплазия (МЭН) I [35, 45]. Эпидемиологические факторы риска развития АКР изучены недостаточно, тем не менее ряд исследований отмечают значимую связь между курением и АКР. Фактически АКР может составлять до 14% всех инциденталом надпочечников и является одним из наиболее частых показаний к адреналэктомии при случайно выявленных опухолях [94, 190].

Интересно, что в Южной и Юго-Восточной Бразилии наблюдается более чем 10–15-кратное увеличение заболеваемости АКР, что объясняется более высокой распространенностью мутации зародышевой линии опухолевого белка p53 (*TP53*), примерно 78% у детей и 13% у взрослых [25, 52, 161].

Из-за трудностей диагностики АКР обнаруживается уже на стадии метастазирования, что ограничивает возможности хирургического вмешательства и предполагает крайне неблагоприятный прогноз [29, 102]. При этом прогноз крайне неоднороден и трудно предсказуем в клинической практике. Наблюдается большая вариабельность клинических проявлений, встречаются как вялотекущие так и агрессивные опухоли [133].

1.2.2. Клиническое течение

В 40-60% случаев клинические проявления АКР связаны с симптомами гормональной гиперсекреции, включая кортизол, андрогены и альдостерон. Около 30% случаев характеризуются неспецифическими симптомами, например, болями в брюшной и/или поясничной области и ощущением полноты в животе, что может быть вызвано компрессионным давлением, оказываемым на прилежащие внутренние органы большой опухолью или конституциональными симптомами злокачественного новообразования. В 20-30% случаев АКР протекает бессимптомно [2, 49].

Наиболее распространенным симптомом избыточной секреции гормонов является синдром Кушинга, который отмечается примерно у 45% пациентов с АКР и проявляется в виде общей и мышечной слабости, повышения массы тела, перераспределения подкожно-жировой клетчатки по диспластическому типу, багровых стрий в области живота, артериальной

гипертензии и остеопороза [42, 125]. Смешанная клиническая картина синдрома Кушинга и вирилизация вследствие сопутствующей гиперсекреции кортизола и андрогенов также может наблюдаться у 20–30% больных [36, 54]. Автономная гиперсекреция альдостерона при АКР наблюдается редко, а артериальная гипертензия и мышечная слабость в следствие гипогликемии чаще всего обусловлены вторичной глюкокортикоид-индуцированной активацией минералокортикоидных рецепторов у пациентов с гиперкотицизмом [79]. Феминизация больных мужского пола из-за избыточной выработки эстрогена встречается в 1–5% случаев [135].

Патологоанатомическое исследование послеоперационного материала является «золотым стандартом» диагностики АКР, в то время как, биопсия опухолей коры надпочечников, как правило, противопоказана в виду высоких рисков осложнений и малоинформативности [55].

1.2.3. Диагностика

При макроскопическом исследовании АКР обычно представлен крупной солидной опухолью с максимальным размером от 1 до 12 см (иногда может достигать 25 см и иметь массу более 2 кг) желтовато-коричневатый цвета, на разрезе часто отмечаются множественные узелки, имеющие пестрый вид за счет участков некроза и кровоизлияний (Рисунок 1.1) [37, 97, 120].



Рисунок 1.1 – Адренокортикальный рак. Макропрепарат

При микроскопическом исследовании определяется толстая фиброзная капсула, нередко с инвазией опухоли в капсулу и прилежащие кровеносные сосуды. Как правило, опухолевая ткань имеет солидный характер роста, может наблюдаться рост в виде компактных гнезд и тяжей. Часто отмечаются участки некрозов и кровоизлияний, также могут присутствовать множественные фиброзные тяжи. Некроз, как правило, выявляют при карциномах коры надпочечников высокой степени злокачественности [37, 120, 153].

На основе цитоморфологических особенностей опухолевой ткани выделяют следующие гистологические подтипы АКР: классический, онкоцитарный, миксоидный и саркоматоидный [3, 85].

Для АКР также характерно наличие митотических фигур. С целью прогностической стратификации АКР подразделяют на опухоль с высоким и низким уровнем митотической активности. Иными словами опухоли с более чем 5 фигурами митоза на 10 мм² (50 полей зрения при увеличении микроскопа х400) отнесены к опухолям с высоким уровнем митотической активности, с менее, чем с 5 митозами – к опухолям с низким уровнем митотической активности [40, 41, 120, 153].

Классический подтип АКР (Рисунок 1.2) является преобладающим и, согласно исследованию Ткачук А.В. и др., составляет 68% (51 из 75) случаев. Авторы также подчеркивают, что данный гистологический подтип может демонстрировать различные паттерны роста: диффузный (солидные поля опухоли с минимальным количеством стромы), трабекулярный

(тяжи опухолевой ткани разделенные тонкими соединительнотканными перемычками), альвеолярный (в виде крупных гнезд), псевдожелезистый (похожий на железы с просветом в центре), рост в виде цепочек (аналогичный росту дольковой карциномы молочной железы) и карциноидоподобный [40, 41]. Отмечаются опухоли представленные преобладанием крупных полиморфных клеток или мономорфных клеток различного размера [1].

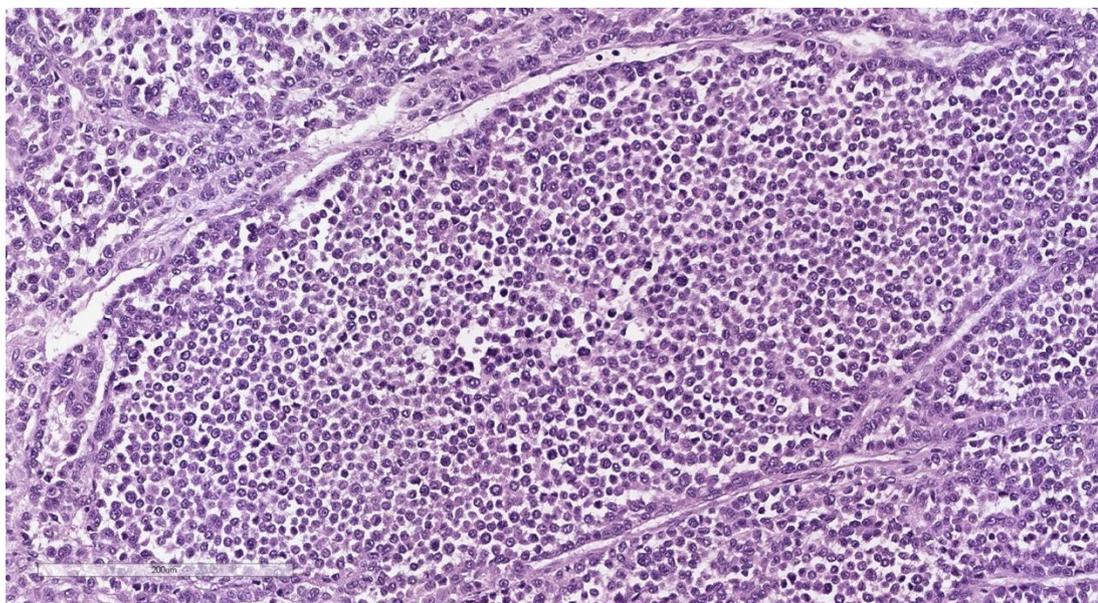


Рисунок 1.2 – Адренокортикальный рак. Классический подтип. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x100

Вторым по распространенности является онкоцитарный подтип АКР (Рисунок 1.3), по данным литературы данный подтип составляет 11-22% случаев [40, 41, 91, 149]. Опухоли преимущественно состоят из онкоцитов, которые почти в два раза крупнее нормальных клеток надпочечника. Важно отметить, что онкоциты должны составлять более 90% от объема опухолевой ткани, чтобы опухоль можно было рассматривать как полностью онкоцитарное новообразование коры надпочечников [24, 120, 152]. Онкоцитарные клетки имеют характерную зернистую ярко-эозинофильную цитоплазму за счет накопления большого количества митохондрий, занимающих больше половины от объема клетки. Для данного подтипа Ткачук А.В. и др. также выделяют несколько паттернов роста: диффузный, трабекулярный и псевдожелезистый [1].

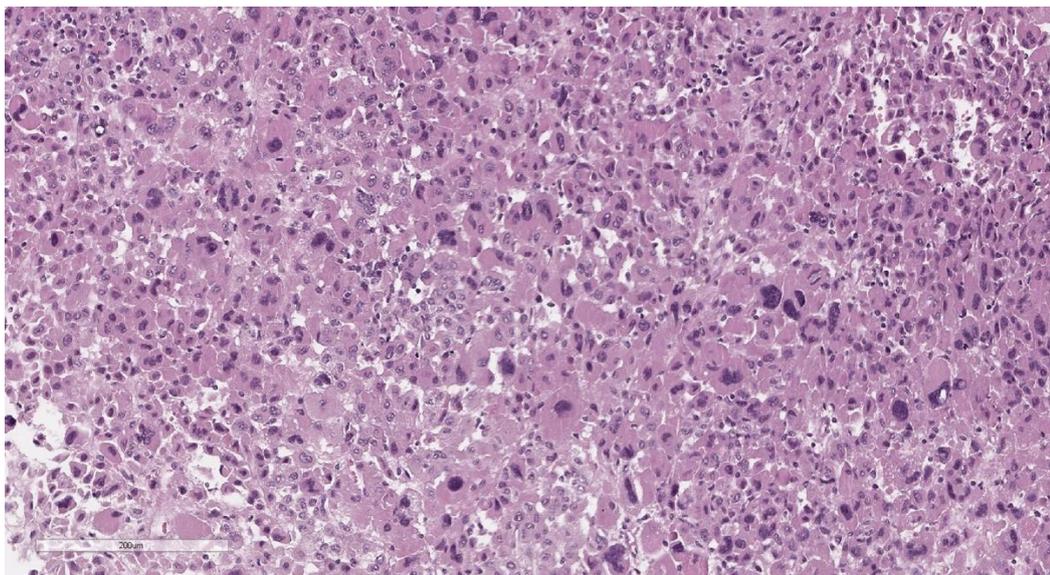


Рисунок 1.3 – Адренокортикальный рак. Онкоцитарный подтип. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x100

Миксоидный подтип (Рисунок 1.4) встречается в 10% случаев и характеризуется наличием большого количества внеклеточного миксоидного компонента (5-90%). Отличительным признаком миксоидных опухолей также является наличие относительно мономорфных клеток со слабой/умеренно выраженной ядерной атипией [141, 142]. Выделяют трабекулярный, псевдожелезистый и кривбразный паттерны роста [1].

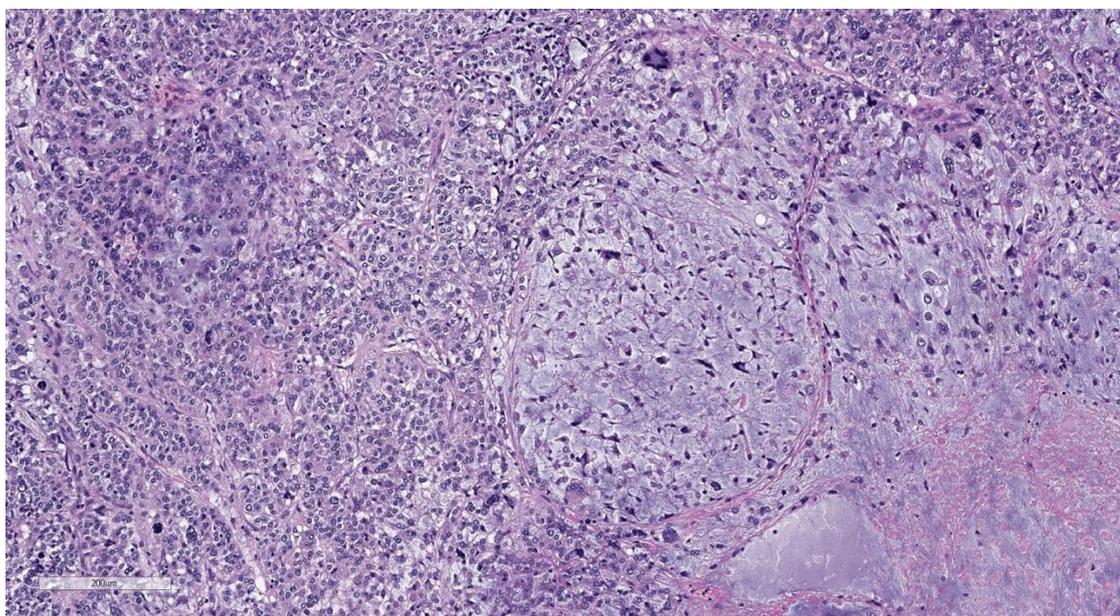


Рисунок 1.4 – Адренокортикальный рак. Миксоидный подтип. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x100

Саркоматоидный подтип (Рисунок 1.5) является самым редким и крайне агрессивным подтипом АКР, по данным литературы зарегистрировано всего около 30 случаев [131, 141]. Для

данного подтипа опухоли свойственна потеря кортикальной дифференцировки. Часто опухоль демонстрирует диффузный характер роста и состоит в основном из веретенообразных клеток с редкими эпителиоидными и гигантскими клетками [141].

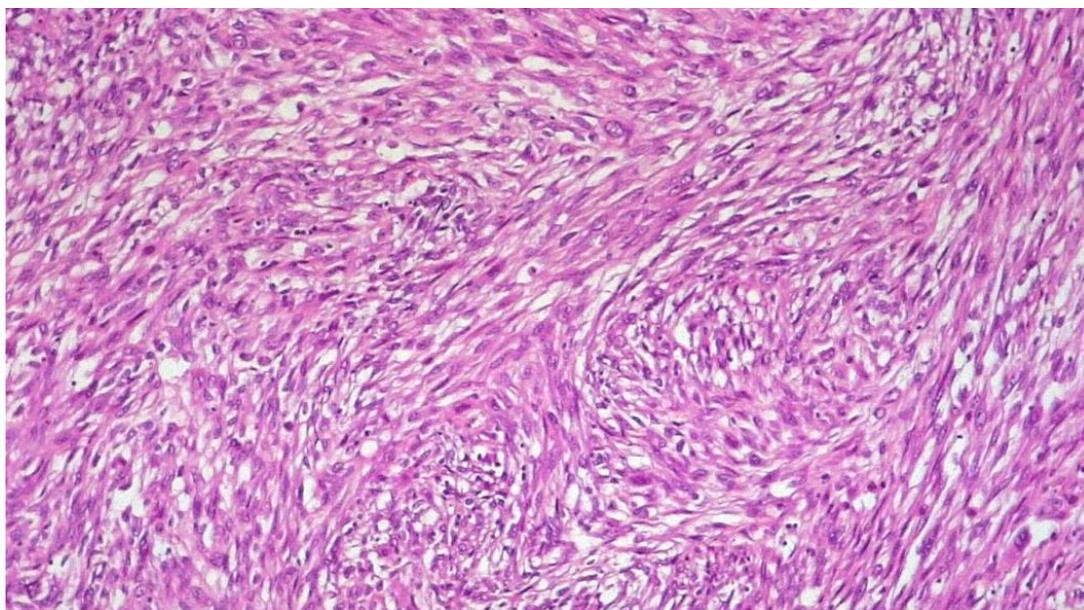


Рисунок 1.5 – Адренокортикальный рак. Саркоматоидный подтип. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x100

Несмотря на то, что АКР часто имеет клинически агрессивное течение, его дифференциальная диагностика может вызывать трудности, особенно у пациентов на ранней стадии с высокодифференцированной опухолью [19]. SF-1 — ядерный транскрипционный фактор, регулирующий выработку стероидных гормонов в коре надпочечников, является наиболее чувствительным (98%) и специфичным (100%) маркером АКР [89, 108]. При подозрении на АКР в обязательном порядке необходимо проведение серии иммуногистохимических исследований. В основную панель маркеров, позволяющих исключить или подтвердить диагноз АКР, на сегодняшний день также принято включать Melan A и Inhibin A, однако, согласно данным литературы, их использование не столь специфично [1, 114, 120].

В 1984 г. Louis Weiss предложил систему гистопатологической классификации опухолей коры надпочечников, основанную на девяти критериях (ядерная атипия, митотическая активность, патологические митозы, клетки со светлой цитоплазмой, диффузный характер роста, капсулярная инвазия, венозная инвазия, синусоидальная инвазия, участки некроза опухоли), каждый из которых оценивается в 1 балл. Согласно данной системе, если опухоль набирает более 3 баллов, то подтверждается ее злокачественный потенциал, и выставляется диагноз АКР [222, 223]. Для оценки злокачественности онкоцитарных подтипов новообразований коры надпочечников позднее была разработана система Lin–Weiss–Bisceglia, так как применение

системы Weiss для данного подтипа опухолей не рекомендовано. Необходимость создания другой системы оценки связана с гистологическими особенностями данных опухолей, которые состоят из клеток с обильной эозинофильной цитоплазмой, высоким ядерным полиморфизмом и диффузным характером роста, что в случае применения системы Weiss неизбежно приведет к ошибочному диагнозу АКР, что в свою очередь противоречит их более частому доброкачественному биологическому поведению [15, 56, 204, 120].

Система Lin–Weiss–Bisceglia состоит из «больших критериев» (митотическая активность более 5 в 50 полях зрения, атипичные митозы и венозная инвазия) и «малых критериев» (размер опухоли более 10 см или масса более 200 г, наличие некроза, синусоидальная инвазия и капсульная инвазия) [24]. Диагноз АКР устанавливается при наличии хотя бы одного из «больших критериев», если отмечается минимум один «малый критерий» – диагностируется онкоцитарная опухоль с пограничным злокачественным потенциалом, при отсутствии как «больших критериев», так и «малых критериев» – онкоцитарная опухоль расценивается как доброкачественная. Если опухоль нельзя отнести к полностью онкоцитарной, то следует использовать критерии, применяемые в случае классического подтипа АКР [56, 120, 148].

Обновленная классификация ВОЗ 2022 г. [152] также предлагает использовать другие многопараметрические диагностические алгоритмы, к ним относятся ретикулиновый алгоритм и шкала Хельсинки, которые, согласно данным литературы, могут использоваться для классических, онкоцитарных и миксоидных подтипов новообразований [107, 120, 152]. Ретикулиновый алгоритм основан выявлении изменений нормальной структуры ретикулиновой сети (окрашивание ткани надпочечника методом импрегнации серебром по Гордон-Свиту) в сочетании с одним из следующих параметров: количество митозов более 5 на 50 полей зрения при большом увеличении, участки некроза опухоли и сосудистая инвазия [40, 41]. Однако этот метод не нашел широкого применения в патоморфологической практике в связи с технической сложностью [152]. Значение использования шкалы Хельсинки будет описано далее.

1.2.4. Прогноз и выживаемость пациентов

В недавно опубликованном датском исследовании 160 пациентов с АКР медиана выживаемости пациентов составила 35 месяцев [154], тогда как в исследовании на базе данных Программы эпиднадзора, эпидемиологии и конечных результатов (англ. the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)) Национального института рака США, в которую входит

более 2000 случаев, медиана выживаемости составила всего 17 месяцев [198]. Пятилетняя опухоль-специфическая выживаемость пациентов с АКР, согласно базе данных SEER, составляет 38%. Стоит отметить, что резекция первичной опухоли даже в случаях с отдаленными метастазами демонстрировала лучшую ОВ и опухоль-специфическую выживаемость [166]. Пятилетняя послеоперационная выживаемость пациентов с АКР из нескольких наборов данных колеблется от 40% до 70% [46, 77]. Также предполагаемая пятилетняя ОВ пациентов с АКР в недавних исследованиях составляет чуть менее 50%. При этом прогноз заболевания крайне неоднороден и трудно предсказуем, наблюдается большая вариабельность клинических проявлений, встречаются как вялотекущие так и агрессивные опухоли, а также отмечаются случаи заболевания ассоциированные с длительной БРВ и ОВ [14, 120, 154].

1.2.4.1. Клинические прогностические факторы

Стадия опухоли была признана независимым предиктором выживаемости при АКР и, на сегодняшний день, представляет собой основной прогностический фактор. Стадирование АКР, как и при других злокачественных новообразованиях, производится по классификации TNM, которая учитывает распространенность первичной опухоли (T), наличие метастатического поражения регионарных лимфатических узлов (N) и наличие отдаленных метастазов (M).

Первая классификация TNM была предложена в 2004 г. Международным союзом по борьбе с онкологическими заболеваниями (англ. International Union Against Cancer (UICC)) и Американским объединенным комитетом по злокачественным опухолям (англ. American Joint Commission on Cancer (AJCC)) [184]. Опухоли, локализованные в надпочечнике при размере новообразования менее 5 см были классифицированы как I стадия (T1N0M0), а опухоли более 5 см – стадия II (T2N0M0) [40, 41, 184]. Распространенные опухоли с признаками инфильтрации опухоли в окружающие ткани (T3N0M0) или вовлечением в опухолевый процесс регионарных лимфатических узлов (T1-2N1M0) были классифицированы как III стадия. К IV стадии заболевания были отнесены опухоли инфильтрирующие окружающие ткани с поражением регионарных лимфатических узлов (T3N1M0) или опухоли с признаками инвазии в прилежащие органы (T4N0-1M0) или опухоли с наличием отдаленных метастазов (T1-4N0-1M1) [184].

Европейская сеть по изучению опухолей надпочечников (англ. European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT)) оценила прогностическую значимость классификации UICC и продемонстрировала, что наличие отдаленных метастазов было связано с худшей БРВ по

сравнению с выживаемостью пациентов с другими распространенными стадиями злокачественных новообразований без признаков метастазирования (HR=2.93) [40, 41, 99]. В результате была предложена модифицированная система стадирования ENSAT, согласно которой к III стадии были отнесены все местнораспространенные опухоли (T3-4N0M0 или T1-4N1M0), а к IV стадии – только опухоли с наличием отдаленных метастазов (T1-4N0-1M1) [99].

Для уточнения прогноза распространенного АКР была предложена модифицированная классификация ENSAT (mENSAT). В данную систему были внесены иные определения для III стадии заболевания (инвазия в окружающие ткани / органы или почечную / полую вену) и выделены новые стадии IVa, IVb, IVc (2, 3 или более 3 метастатически пораженных органов, включая поражение лимфатических узлов, соответственно) [40, 41, 167].

Следует подчеркнуть, что лишь 5% пациентов АКР имеют опухоли I стадии, что существенно затрудняет анализ выживаемости в данной группе. В то же время, размер опухоли не всегда является ключевым прогностическим фактором при АКР, а использование различных разграничений по размеру новообразования не улучшает стратификацию прогноза для пациентов со стадией II в сравнении с пациентами со стадией заболевания I [65, 201]. Влияние функционального статуса опухоли на выживаемость пациентов с АКР является спорным, однако некоторые исследования показывают, что гормональная гиперсекреция является независимым фактором риска снижения общей выживаемости (ОВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ) [77, 127]. Vanbrabant et al. в своем мета-анализе продемонстрировали повышенный риск смертности (HR=1,71) и рецидива (HR=1,43) при опухолях коры надпочечника, секретирующих кортизол, но не секретирующих андроген [119]. Однако неясно, были ли связаны данные результаты с эффектами гиперсекреции кортизола, а не с биологией и агрессивностью опухоли. В то же время у пациентов с нефункциональными опухолями заболевание диагностируется на более поздних стадиях, чем у пациентов с гормональной гиперсекрецией, в связи с чем выдвигается несколько гипотез о плохой прогностической ценности кортизола-секретирующих опухолей. Во-первых у пациентов с опухолями, секретирующими кортизол, как правило, наблюдается тяжелый синдром Кушинга, что вероятно приводит к более тяжелым послеоперационным осложнениям по сравнению с пациентами с нефункциональными опухолями [151]. А во-вторых, гиперсекреция кортизола может способствовать уклонению опухоли от иммунного ответа, что, вероятно, приводит к росту, прогрессированию и рецидиву опухоли [73].

Как уже было сказано, АКР наблюдается в любом возрасте. Некоторые исследования показывают, что пожилой возраст пациентов с АКР ассоциирован с низкой ОВ [49, 53, 167, 171]. На основании данных результатов Asare et al. разработали систему стадирования, в которой стадия I и II были дифференцированы по возрасту пациентов (≤ 55 лет для стадии I против > 55 лет для стадии II), а не размеру опухоли [47]. В дальнейшем данная классификация

продемонстрировала незначительные различия по ОВ между стадиями I и II, однако большинство исследований, включавших многомерные модели, не выявили возраст в качестве предиктора рецидива [51, 134, 171] или смертности непосредственно от заболевания [107]. Следовательно, возраст пациентов нельзя относить к независимым прогностическим факторам при АКР.

1.2.4.2. Морфологические прогностические факторы

Как уже было сказано ранее, количество митотических фигур является фундаментальным критерием диагностики АКР. Среди всех параметров шкалы Weiss количество митозов является единственным критерием, ассоциированным с прогнозом пациентов [40, 41, 107, 120]. Было предложено ограничение в 20 митозов на 50 полей зрения при увеличении микроскопа $\times 400$ для классификации АКР на опухоли с высоким и низким уровнем митотической активности [40, 153]. Однако существуют некоторые ограничения для использования количества митозов для прогнозирования клинического течения: подсчет количества митотических фигур требует значительных временных затрат и характеризуется значительной вариабельностью между различными специалистами [21]. В то же время нет согласия относительно порогового значения количества митотических фигур, так как в некоторых исследованиях в качестве независимого прогностического фактора был определен порог в 9 митозов [91].

Крупное исследование, в которое было включено более 500 случаев локализованной карциномы коры надпочечников выявило, что Ki67 является наиболее мощным прогностическим фактором БРВ после радикальной адреналэктомии, в связи с чем было предложено классифицировать АКР на основании следующих значений индекса Ki67: 1-я степень – Ki67 <10%, 2-я степень – Ki67 10-19% (HR = 1,94) и 3-я степень – Ki67 \geq 20% (HR = 2,58) [81]. Также было установлено, что индекс Ki67 является независимым прогностическим фактором для оценки ОВ [49, 134, 180]. Согласно некоторым данным, что индекс Ki67 >10% коррелирует с более высоким риском рецидива АКР и связан с худшей ОВ [165, 170]. В недавнем исследовании Martins-Filho S.N. et al. также продемонстрировали, значение индекса Ki67 \geq 15% можно использовать для определения группы пациентов с более высоким риском развития рецидива и/или исхода заболевания [78].

В 2015 г. Pennanen M. et al. разработали новую прогностическую систему оценки АКР – шкалу Хельсинки. Данная шкала предлагает суммировать числовое значение индекса Ki67 и

баллы, присвоенные повышенной митотической активности (оценка 3 для митотической активности более 5 митозов на 10 мм 2) и некрозу опухоли (5 баллов). Оценка по шкале Хельсинки $> 8,5$ является диагностическим признаком АКР, а оценка > 17 позволяет расценивать опухоль как прогностически неблагоприятную [107, 120]. Прогностическая ценность данной шкалы также была подтверждена в независимых исследованиях [220].

Согласно литературным данным, были исследованы и другие иммуногистохимические маркеры. Так, например, Duregon E. et al. установили, что высокая экспрессия опухолью SF1 положительно коррелирует большим количеством митозов, высоким значением индекса Ki67, а также стадией ENSAT [89]. Таким образом, было выдвинуто предположение, что SF1 может быть использован не только в качестве диагностического, но и прогностического маркера при АКР. В недавнем исследовании Zlatibor L. et al. показали, что отрицательное окрашивание АКР на ингибин ($p = 0,010$, HR = 0,25, 95%; CI 0,08–0,72), D2-40 ($p = 0,040$, HR = 0,37; 95% CI 0,14–0,97) и синаптофизин ($p = 0,010$, HR = 0,20; 95% CI 0,06–0,67) было достоверно связано с низкой выживаемостью пациентов [173].

1.2.5. Современный статус лекарственной терапии

Хирургическое лечение пациентов с АКР является единственным возможным вариантом полного излечения [72, 136, 150, 193], однако в виду трудностей диагностики, опухоль часто обнаруживается уже на стадии метастазирования, что ограничивает возможности хирургического вмешательства [16, 18, 29]. На сегодняшний день Митоган является единственным препаратом, зарегистрированным и одобренным для лечения АКР [27, 38]. Данный препарат первоначально был получен из пестицида дихлордифенилтрихлорэтана еще в 1960 г., однако полный механизм действия все еще изучается [61]. Одна из гипотез, объясняющих цитотоксическое действие Митогана, предполагает, что он ингибирует фермент стерол-О-ацилтрансферазу 1 (*SOAT1*), активно синтезируемый в клетках надпочечников. Такая блокировка приводит к накоплению в клетках свободного холестерина, оксистеролов и жирных кислот, что вызывает стресс эндоплазматического ретикулума, что, в свою очередь, инициирует апоптоз клеток [39, 139, 200].

Исследования, изучающие влияние Митогана на стероидогенез, описывают ингибирующее действие препарата на синтез 11 β -гидроксилазы, 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы и 18-гидроксилазы. В качестве индуктора цитохрома *CYP3A4*

Митотан влияет на метаболизм нескольких других лекарственных препаратов, включая химиотерапевтические средства, используемые для лечения АКР [138]. Данный эффект может быть компенсирован увеличением дозы препарата, однако в некоторых случаях приводит к нецелесообразности использования митотана.

Применение Митотана ассоциировано с большим количеством побочных эффектов. Порядка у 40-60 % пациентов препарат демонстрирует значительную нейротоксичность [55]. Согласно проведенным исследованиям, установлено, что побочные эффекты препарата дозозависимы и наблюдаются у пациентов при превышении необходимой дозы. Также установлено, что Митотан обладает довольно узким коридором концентраций (14–20 мг/л), при которых эффективность препарата высокая, а токсическое воздействие приемлемо [1, 137, 163].

Руководство Европейского общества эндокринологов (ESE) за 2018 год рекомендует использовать Митотан пациентам с АКР, особенно тем, у кого отмечается наличие по крайней мере одного из признаков: (1) заболевание III стадии, (2) R1-хирургический край резекции или (3) индекс Ki67 более 10% [219]. Таким образом, Митотан рекомендуется для ведения пациентов с высоким риском рецидива, однако данный подход остается предметом дискуссий из-за неоднозначности и противоречивости ретроспективных данных об эффективности лечения, а также разнообразия результатов среди пациентов [128]. Проспективное рандомизированное исследование ADIUVO, проводимое в период с 2008 по 2021 год, включавшее 91 пациента с низким и промежуточным риском развития рецидива АКР, не выявило различий выживаемости между группой, получавшей Митотан и контрольной. Тем не менее, последующие метаанализы показывают тенденцию к повышению БРВ и ОВ при использовании Митотана в качестве адъювантной терапии [68, 96]. В настоящее время инициировано новое исследование ADIUVO-2, целью которого является сравнение эффективности Митотана как в монотерапии, так и в комбинации с цисплатином и этопозидом у пациентов высокого риска [40, 41, 80, 196].

В случаях нерезектабельного или метастатического заболевания часто используется монотерапия Митотаном или его комбинация с химиотерапевтическими препаратами, такими как Этопозид, Доксорубин и Цисплатин (схема EDP-M) [38, 196]. Данные рекомендации основываются на результатах клинического исследования FIRM-ACT, которое включало 304 пациентов с поздней стадией заболевания. В исследовании наблюдалась лучшая беспрогрессивная выживаемость в группе с терапией по схеме EDP-M, по сравнению с теми, кто получал Митотан в комбинации со Стрептозоцином (5 месяцев против 2,1 месяца). Однако разница в общей выживаемости не была статистически значимой (14,8 месяца против 12 месяцев), что может быть связано с возможностью перехода пациентов на схему EDP-M после прогрессирования заболевания на предыдущей терапии [80].

Относительно момента отмены Митотана существуют различные мнения: некоторые исследователи предлагают прекратить прием после второй прогрессии заболевания [57], в то время как другие рекомендуют делать это, если прогрессия происходит через год после начала лечения [211]. Существует консенсус о том, что решение об отмене Митотана должно приниматься индивидуально, с учетом клинической ситуации и толерантности пациента к лекарству.

При непереносимости химиотерапии Митотан в монотерапии может быть использован для контроля симптомов, вызванных избыточным выделением кортизола у пациентов с метастатическим заболеванием. Однако важно учитывать наличие других ингибиторов стероидогенеза, таких как Метирапон или Кетоконазол, которые обладают более благоприятным профилем безопасности, что ставит под вопрос целесообразность применения Митотана в таких случаях.

1.2.6. Иммунное микроокружение в аденокортикальном раке

АКР традиционно описывается как опухоль с истощенным иммунитетом, что часто связывают с биосинтезом стероидных гормонов опухолью, которые играют иммуносупрессивную роль [63, 203]. Хорошо известно, что глюкокортикоиды оказывают противовоспалительное и проапоптотическое действия, то есть оказывают значительное влияние на множество физиологических процессов. Кроме того гиперсекреция глюкокортикоидов усиливает пролиферацию опухолевых клеток, а также нарушает функцию периферических Т-лимфоцитов, таким образом снижая их способность уничтожать опухолевые клетки и способствуя ускользанию опухоли от иммунного ответа [104].

Фактически, АКР является эндокринной злокачественной опухолью, часто сопровождающейся спонтанной секрецией стероидных гормонов, включая кортизол, половые гормоны и предшественники стероидов или альдостерон. Landwehr L.S. et al. провели иммунофлуоресцентный анализ для визуализации TIL в 146 образцах опухолевой ткани АКР, включая 107 образцов первичных опухолей, 16 – локальных рецидивов и 23 – метастатических образцов [121]. В 86,3% образцов АКР были обнаружены CD3+Т-лимфоциты (7,7 клеток/поле высокой мощности (HPF)), включая CD4+ Т-хелперы (74,0%, 6,7 клеток/HPF), CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты (84,3%, 5,7 клеток/HPF) и FoxP3 + Т регуляторные клетки (49,3%, 0,8 клеток/HPF). Согласно проведенному анализу наличие CD4+ и CD8+TIL было связано с

лучшей ОВ (HR=0,47; 95% CI 0,25–0,87). Авторы отмечают отрицательную корреляцию CD4+ Т-хелперов с гиперсекрецией глюкокортикоидов ($\Phi=-0.290$, $p=0.009$), а также, что интересно, у пациентов с гормонально активными опухолями наблюдалась низкая лимфоцитарная инфильтрация и, следовательно плохая ОВ (27 месяцев против 121 месяца у пациентов с ТП без избытка глюкокортикоидов).

Недавнее клиническое исследование иммунотерапии выявило, что среди пациентов с секретирующим кортизол АКР наблюдалась более высокая частота резистентности к иммунотерапии по сравнению с пациентами без гиперсекреции [122].

В то же время опухолевые клетки способны тормозить активность Т-лимфоцитов (CD4+ и CD8+) путем экспрессии ко-ингибирующих молекул, таких как CTLA-4 и PD-L1, что вызывает анергию опухоль-специфических клонов и подавление противоопухолевого иммунного ответа [6, 7, 40].

Детальный анализ состава опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток при АКР не проводился [40, 41]. Тем не менее, существует несколько работ, демонстрирующих присутствие иммунных клеток в АКР [122]. Так, в 2018 г. была опубликована работа Thorsson V. et al., в которой провели анализ опухолей из базы данных The Tumor Genome Cancer (TCGA) и выделили шесть кластеров на основе профилей экспрессии опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток, принадлежащих к разным субпопуляциям [5, 203]. Кластер С1 отличался повышенной экспрессией ангиогенных генов, высоким уровнем пролиферации клеток и преобладанием Т-хелперов 2 типа в иммунном инфильтрате. Кластер С2 (IFN γ -доминантный) характеризовался наибольшим соотношением макрофагов М1/М2, активной CD8-опосредованной сигнальной передачей и, наряду с кластером С6, обладал наибольшим разнообразием Т-клеточного рецептора (TCR) [5]. Кластер С3, определяемый как воспалительный, был характерен повышенной экспрессией генов, ассоциированных с Th17 и Th1, а также низким уровнем пролиферации опухолевых клеток. Кластер С4 (истощение лимфоцитов) демонстрировал более выраженную М2 макрофагальную сигнатуру. Кластер С5 демонстрировал самый низкий ответ лимфоцитов и самый высокий ответ макрофагов, в котором также преобладали макрофаги М2. И наконец, кластер С6, который представлял собой небольшую группу смешанных опухолей, не доминировавших ни в одном подтипе TCGA, и демонстрировавших самую высокую экспрессию TGF- β ассоциированных генов и высокую лимфоцитарную инфильтрацию с равномерным распределением Th1 и Th2. Среди проанализированных авторами опухолей детально было охарактеризовано 78 случаев АКР, среди которых 63% случаев (49 из 78) были отнесены к С4 кластеру, и, что самое интересное, 29% случаев (23 из 78) были отнесены к кластеру С3. Следовательно, рассматривая АКР с точки зрения иммунного микроокружения, можно утверждать, что АКР, действительно, является гетерогенной группой опухолей.

Все большее число исследований в последние годы подчеркивают значение TIL, а также других типов иммунных клеток в прогнозе пациентов с АКР [105]. Недавнее исследование с использованием иммунофлуоресценции для количественной оценки инфильтрирующих клеточных популяций в образцах АКР продемонстрировало, что >80% образцов были инфильтрированы лимфоцитами с преобладающим CD8+ типом клеток [121].

В настоящее время существует множество вычислительных алгоритмов для оценки состава инфильтрирующих опухоль иммунных клеток на основе данных секвенирования РНК (англ. RNA sequencing, RNA-seq), таких как CIBERSORT [186], CIBERSORTx [86], ConsensusTME [126], MCP-counter [95], TIMER [82], и другие [122]. Данные алгоритмы предоставляют возможность исследовать состав иммунных клеток в образцах опухолей, доступных в базах данных, таких как TCGA [5, 122]. Это особенно ценно для редких видов рака, включая АКР, поскольку собрать достаточно большую и репрезентативную когорту образцов от пациентов в одном медицинском учреждении может быть затруднительно. Использование таких алгоритмов позволяет более эффективно изучать иммунный ландшафт редких опухолей, опираясь на широкие базы данных.

В работе Huang R. et al. (2020) был выполнен анализ 92 образцов АКР из базы данных TCGA путем использования алгоритма CIBERSORT. Авторы пришли к выводу, что иммунные клетки потенциально могут быть использованы в качестве маркеров для прогнозирования метастазирования у пациентов с АКР [177]. Li X. et al. (2020) проанализировали образцы 79 пациентов с АКР, используя алгоритм ESTIMATE, который оценивает стромальные и иммунные показатели для прогнозирования уровня инфильтрации стромальных и иммунных клеток на основе специфических сигнатур экспрессии генов [112]. Согласно полученным данным, низкий показатель иммунной инфильтрации был тесно связан с худшей ОВ. В другом исследовании Tian X. et al. (2020) рассмотрели 79 случаев АКР из базы данных TCGA с использованием алгоритмов CIBERSORT и установили, что иммунный инфильтрат АКР в основном состоит из Т-клеток, естественных киллеров, тучных клеток и макрофагов, в то время как уровни инфильтрации по каждому подтипу показали сильную корреляцию с остальными подтипами [113]. При этом большее количество инфильтрирующих опухоль тучных клеток положительно коррелирует с исходом у пациентов с АКР. Повышенные уровни TIL были связаны с более низкой стадией pTNM и AJCC и, что особенно важно, метастатические очаги были относительно ослабленными по сравнению с первичными опухолями. Это говорит о том, что уклонение опухоли от иммунного ответа играет решающую роль в прогрессировании данного заболевания. Связь TIL и, в частности, CD8+ лимфоцитов с прогнозом также была продемонстрирована у детей с АКР. [207]. Впоследствии описанные результаты были также подтверждены данными Vaechle J.J. et al. [140].

Помимо уровня инфильтрации, существенную роль в оценки микроокружения потенциально может играть характер распределения инфильтрирующих лимфоцитов внутри опухоли. Диффузный паттерн CD8⁺ лимфоцитов, по-видимому, преобладает при АКР по сравнению с мультифокальным паттерном, который преобладает при доброкачественных аденомах [207].

1.2.7. Ингибиторы иммунных контрольных точек в терапии аденокарциномы простаты

Существующие данные показывают, что только небольшой процент случаев АКР экспрессирует PD-L1. Fay A.P. et al. провели иммуногистохимическое исследование 28 образцов АКР, включая 20 первичных опухолей и 8 метастазов, антителами против CD45 и PD-L1 [179]. Экспрессия PD-L1 была проанализирована как на опухолевых, так и на опухоль-инфильтрирующих иммунных клетках. Окрашивание PDL1 оценивали на мембране клеток с порогом положительности, равным 5% в опухолевых клетках и 1% в опухоль-инфильтрирующих иммунных клетках. В 3 из 28 случаях (10,7 %) наблюдалось положительное окрашивание опухолевых клетках на PD-L1, в то же время в 19 образцах (67,8 %) опухоли наблюдалось положительное окрашивание иммунных клеток как антителами PD-L1, так и CD45. Значительной корреляции между экспрессией PD-L1, стадией заболевания и выживаемостью выявлено не было.

Позднее Billon E. et al. провели ретроспективный анализ мРНК в 146 образцах АКР и выявили гетерогенную экспрессию PD-L1 [160]. Согласно результатам исследования высокий уровень PD-L1 был связан с наличием цитотоксического иммунного ответа и более длительной БРВ независимо от других прогностических факторов. Данное исследование демонстрирует положительное прогностическое значение PD-L1, несмотря на его иммуносупрессивную роль. Авторы утверждают, что учитывая предполагаемую связь между экспрессией PDL1 и реакцией опухоли на ингибиторы PDL1, терапевтическое воздействие на PDL1 при АКР может усиливать локальный иммунный ответ, тем самым обеспечивая противоопухолевый эффект.

Основываясь на молекулярных механизмах PD1/PDL1-сигнального пути, для лечения злокачественных опухолей изучались различные типы антител, однако, на сегодняшний день известно, что иммунотерапия приводит к успешным, устойчивым и продолжительным ответам лишь у части больных.

Пембролизумаб представляет собой гуманизированное рекомбинантное моноклональное антитело IgG4 к PD-1. Nabra M.A. et al. сообщили об исследовании включавшем 16 пациентов с АКР. По результатам монотерапии Пембролизумабом у 2 пациентов наблюдался частичный ответ, а у 7 пациентов отмечались признаки стабилизации заболевания [162]. В другом исследовании, включавшем 39 пациентов с распространенным АКР, частота объективных ответов составила 23% (95% CI 11-39), а частота достижения стабилизации заболевания – 52% (95% CI 33–69). Однако медиана БРВ составила всего 2,1 месяца, ОВ 24,9 месяца [93]. В двух вышеупомянутых исследованиях не было обнаружено корреляции с известными биомаркерами эффективности иммунотерапии, такими как статус MSI и PDL1.

Ниволумаб блокирует PD-1 и способствует противоопухолевому иммунитету, а также эффективен для лечения немелкоклеточного рака легкого, меланомы, почечно-клеточной карциномы, и некоторых других видов рака [64, 105, 145, 210]. В недавнем исследовании II фазы применением Ниволумаба для лечения пациентов с распространенным АКР продемонстрировало умеренную противоопухолевую активность [146]. В исследование было включено 10 пациентов с метастатическим АКР, у которых другие методы лечения оказались неэффективными. При терапии Ниволумабом среднее время до прогрессирования заболевания составляло 1,8 месяца. Медиана наблюдения составила 4,5 месяца (диапазон от 0,1 до 25,6 месяца). У двух пациентов отмечалась стабилизация заболевания в течение 48 и 11 недель. Были отмечены аналогичные побочные эффекты, отмеченные ранее в других клинических испытаниях.

Авелумаб — это гуманизированное моноклональное антитело класса IgG1, нацеленное на лиганд PD-L1 [116]. В когортное исследование фазы Ib было включено 50 пациентов с метастатическим АКР, которые ранее принимали терапию на основе платины, в рамках исследования данные пациенты получали Авелумаб каждые две недели с постепенным повышением дозы препарата, 5 из 50 пациентов параллельно принимали Митотан в качестве сопутствующей терапии. В исследовании был зафиксирован частичный ответ у 3 из 50 пациентов (6%), но более значимым был факт длительной стабилизации заболевания у 21 пациента (42,0%). Средняя продолжительность бессобытийной выживаемости составила 2,6 месяца, а средняя ОВ — 10,6 месяца [66].

Дурвалумаб и атезолизумаб – моноклональные антитела, нацеленные против PD-L1, в настоящее время, одобрены для терапии распространенной уротелиальной карциномы и метастатического немелкоклеточного рака легкого [116], однако, на сегодняшний день, клинических испытаний направленных на исследование эффективности данных препаратов для лечения пациентов с АКР не проводилось.

1.3. Заключение

Адренкортикальный рак представляет собой редкое злокачественное новообразование коры надпочечников, обычно характеризующееся неблагоприятным прогнозом. Из-за сложностей диагностики у большинства пациентов АКР обнаруживается на поздних стадиях с метастазами, что значительно ограничивает возможности хирургического лечения и ухудшает прогноз [27]. Митотан, препарат с адренолитическими свойствами, является основным препаратом для лечения АКР, но, к сожалению, он часто плохо переносится, в связи с чем его применение ограничено [29, 122]. Стратегия лечения АКР за последние годы не претерпела значительных изменений; современная цитотоксическая химиотерапия включает препараты с ограниченной эффективностью и высоким уровнем токсичности, подчеркивая необходимость в разработке новых мишеней для таргетной терапии АКР [27, 28, 122].

В последние годы АКР рассматривается как гетерогенная группа заболеваний с различными патоморфологическими и геномными особенностями, что обуславливает вариабельность клинической картины и прогноза для пациентов. Несмотря на высокую агрессивность АКР, в ряде случаев заболевание демонстрирует длительную безрецидивную и общую выживаемость пациентов. При этом несмотря на то, что на протяжении многих лет с целью выявления новых прогностических маркеров проводилось множество исследований, основанных на иммуногистохимии, большинство из них включали лишь небольшие ретроспективные выборки, в основном без валидации полученных результатов. Таким образом, необходимость определения прогностических параметров для выбора наиболее эффективной тактики ведения пациентов остается одной из главных и нерешенных проблем [33].

Состав микроокружения опухоли имеет решающее значение для разработки стратегий иммунотерапевтического лечения рака. Одним из компонентов микроокружения опухоли являются иммунные клетки, наличие которых нередко ассоциируется с лучшим прогнозом для пациентов [26]. Разнообразные субпопуляции иммунных клеток могут оказывать как стимулирующее, так и подавляющее влияние на рост опухоли, в зависимости от спектра цитокинов, которые они вырабатывают. Следовательно, прогностическая значимость иммунного инфильтрата в опухолях зависит не только от его интенсивности, но и от состава этих иммунных клеток [27].

И хотя ингибиторы контрольных точек иммунного ответа продемонстрировали впечатляющую клиническую эффективность при ряде злокачественных новообразований, у большинства пациентов по-прежнему обнаруживалась резистентность к иммунотерапии. Данные клинических испытаний демонстрируют, что экспрессия PD-L1 не всегда является надежным

предиктором ответа пациента на иммунотерапию [6, 7]. Таким образом, в настоящее время остается нерешенным вопрос поиска соответствующих биомаркеров при АКР для выбора пациентов, которые потенциально могут получать пользу от назначения иммунотерапевтических препаратов, а также от комбинированной терапии для преодоления резистентности. Устойчивость рака к ингибиторам иммунных контрольных точек может быть обусловлена как внутренними опухолевыми клетками (например, экспрессией PD-L1), так и внешними факторами (например, опухоль-инфильтрирующими иммунными клетками), которые способствуют уклонению от иммунного ответа [41].

Учитывая наличие сравнительно небольшого количества исследований касаясь иммунного микроокружения при АКР, нужно отметить, что в настоящее время детальный анализ состава опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток при АКР, особенно в различных гистологических подтипах опухоли, ранее не проводился. В то же время большинство опубликованных исследований с использованием результатов секвенирования РНК рассматривают весь набор данных TCGA без учета морфологических подтипов опухолей [28, 31, 40, 41], однако имеющиеся данные показывают, что различные подтипы опухоли могут различаться не только по характерным цитологическим особенностям опухолевых клеток, но и по количеству и субпопуляционному составу иммунного инфильтрата, что может играть существенную роль в определении прогностического значения иммунного микроокружения при АКР.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и дизайн исследования

В исследовании использованы образцы операционного материала от 73 пациента с верифицированным диагнозом аденокортикального рака, которым была выполнена адреналэктомия в период с 2005 по 2022 года в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. В исследование также был включен консультативный материал пациентов из других лечебных учреждений России, который был направлен для исследований в Референс-центра патоморфологических, иммуногистохимических и лучевых методов исследования на базе НМИЦ эндокринологии Минздрава России.

Основные критерии включения в исследование:

1. Возраст пациентов на момент хирургического лечения – старше 18 лет;
2. Морфологически верифицированный диагноз «аденокортикального рака»;
3. Получение письменного добровольного информированного согласия от пациентов на использование послеоперационного материала в научных исследованиях.

Основные критерии невключения в исследование:

1. Возраст пациентов на момент хирургического лечения – младше 18 лет.

Основные критерии исключения из исследования:

1. При пересмотре архивных гистологических препаратов диагноз «аденокортикальный рак» исключен.

Дизайн исследования утвержден локальным этическим комитетом Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (протокол №02-23 от 26.01.2023 г.). Используемый гистологический материал рака коры надпочечников был анонимизирован и деперсонифицирован.

В дизайн исследования было включено 5 этапов (Рисунок 2.1).

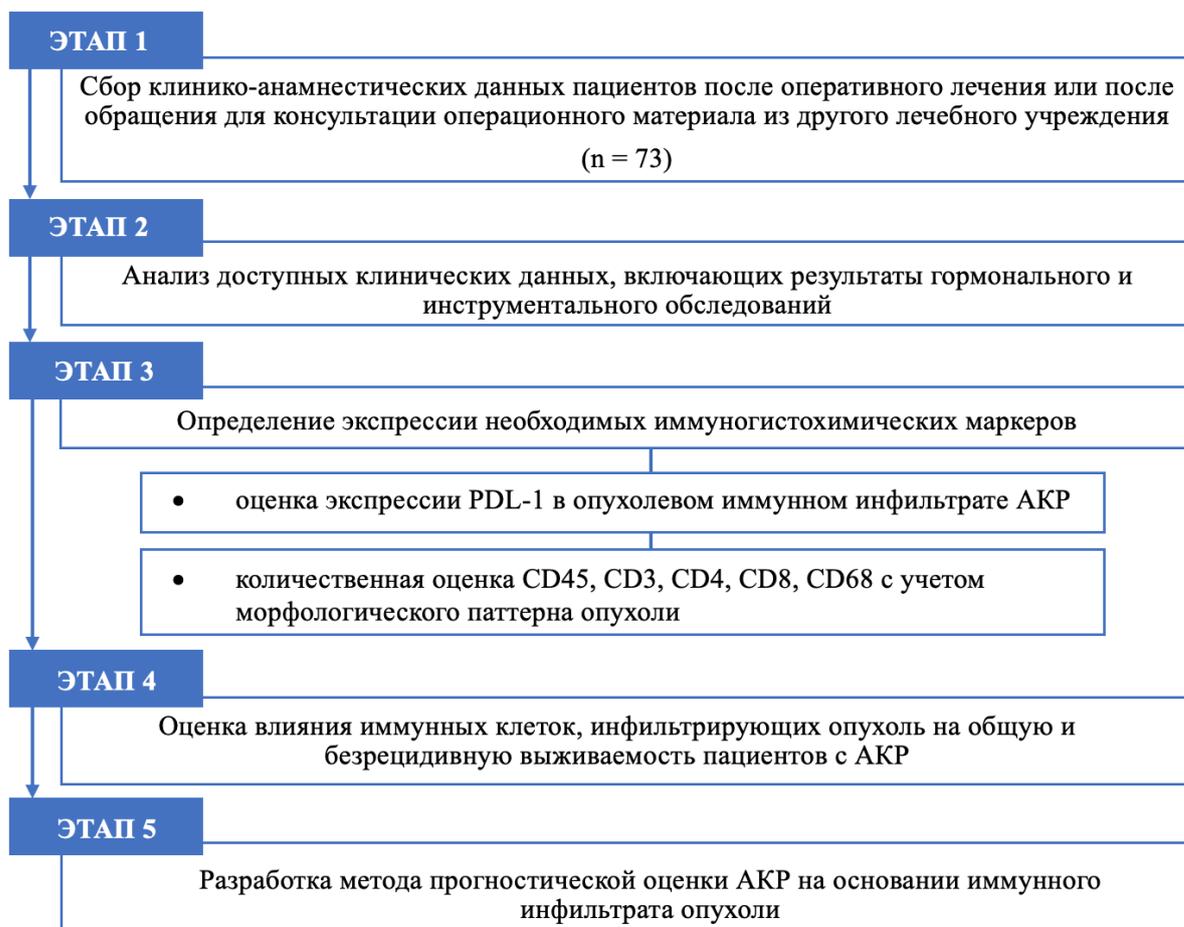


Рисунок 2.1 – Дизайн диссертационного исследования

На **первом этапе** был выполнен сбор и систематизирование клинических и лабораторных данных пациентов, включенных в исследование.

На **втором этапе** был выполнен анализ доступных клинических данных пациентов, в том числе результатов гормонального и инструментального обследований.

Далее, на **третьем этапе** каждому из 73 пациентов была выполнена серия иммуногистохимических исследований на маркеры основных субпопуляций опухоли инфильтрирующих иммунных клеток, а также оценена экспрессия опухолью ингибитора контрольных точек PD-L1.

На **четвертом этапе** производилась статистическая обработка данных с целью оценки влияния иммунных клеток на общую и безрецидивную выживаемость и прогноз пациентов с АКР.

На заключительном, **пятом этапе**, на основе полученных данных был разработан метод прогностической стратификации АКР.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Морфологические методы

Гистологический материал аденокортикальных опухолей, полученный в ходе хирургического лечения пациентов непосредственно в НМИЦ эндокринологии Минздрава РФ, фиксировали в 10% забуференном формалине, обрабатывали в аппарате гистологической проводки фирмы «Leica ASP6025 S» («Leica Biosystems», Германия) и заливали в парафин, а при проведении оперативного лечения в другом стационаре материалы получали в виде готовых парафиновых блоков. Суммарное время фиксации, проводки и заливки материала не превышало, как правило, 48 часов. Затем готовили серийные срезы (не менее 15) с помощью микротомы «Leica RM 2125 RTS» («Leica Biosystems», Германия) толщиной 3-4 мкм, которые помещали на полилизиновые стекла (Leica, Германия) и инкубировали в термостате при температуре 37°C в течении 12 часов. Далее срезы депарафинировали последовательно в ряде растворов, состоящим из 3-х ксилолов, 2-х абсолютных спиртов, 80% и 70% спирта и дистиллированной воды. Затем препараты окрашивали на аппарате «Leica ST5010 AXL» («Leica Biosystems», Германия) гематоксилином и эозином по стандартной методике [43].

Все образцы опухолевой ткани верифицировали в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей надпочечника (ВОЗ, 2022).

2.2.2. Иммуногистохимические методы

Для оценки иммунного микроокружения на образцах опухолевой ткани выполнялась постановка иммуногистохимических (ИГХ) реакций с антителами к маркерам основных субпопуляций опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток (CD45, CD3, CD4, CD8, CD68), а также к маркеру ингибитор контрольных точек PD-L1.

Постановку ИГХ реакций осуществляли на срезах толщиной 3 мкм, расположенных на стеклах с полилизиновым слоем («Leica Biosystems», Германия). Исследование осуществлялось на полностью автоматизированном иммуногистостейнере «Leica Bond III» («Leica Biosystems», Германия) по стандартным протоколам, рекомендованным фирмой-производителем [43].

При постановке ИГХ реакций проводился положительный контроль, который выбрался в соответствии со спецификациями от фирмы производителя [34].

Описание антител, включенных в ИГХ панель, представлено в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Описание иммуногистохимической панели антител

Наименование маркера	Клон	Производитель	Разведение	Положительный контроль
CD45	EP322Y	«Abcam», Великобритания	1:200	Миндалина
CD3	ab699	«Abcam», Великобритания	1:50	Тимус
CD4	ab133616	«Abcam», Великобритания	1:1000	Миндалина
CD8	ab4055	«Abcam», Великобритания	1:1000	Миндалина
CD68	514H12	«Novocastra», Германия	1:100	Миндалина
PD-L1	SP142	«Ventana», Великобритания	1:200	Плацента

2.2.3. Морфометрические методы

Для морфологического исследования препаратов использовали микроскоп «Leica DM2500» («Leica Microsystems», Германия). Также для морфометрического исследования выполняли сканирование гистологических препаратов с использованием сканеров системы Aperio AT2 производства «Leica Biosystems» (Германия) с объективом 20×/0.75 PlanApo. Для обеспечения объективного подсчета и анализа полученных результатов использовались программы «Aperio ImageScope» («Leica Microsystems», Германия) и «QuPath» v0.4.3 (University of Edinburgh, Великобритания).

Методики оценки экспрессии используемых маркеров приведены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Методология оценки иммуногистохимических реакций

Антитела	Характеристика экспрессии		Оценка полученного результата
CD45	Иммунные клетки	Мембрана/ Цитоплазма	Выполнен подсчет позитивно окрашенных клеток в пяти полях зрения препарата по 0,05 мм ² (суммарно 0,25 мм ²) отдельно в строме и паренхиме опухоли, далее количество суммировали
CD3	Иммунные клетки	Мембрана/ Цитоплазма	Выполнен подсчет позитивно окрашенных клеток в пяти полях зрения препарата по 0,05 мм ² (суммарно 0,25 мм ²) отдельно в строме и паренхиме опухоли, далее количество суммировали
CD4	Иммунные клетки	Мембрана/ Цитоплазма	Выполнен подсчет позитивно окрашенных клеток в пяти полях зрения препарата по 0,05 мм ² (суммарно 0,25 мм ²) отдельно в строме и паренхиме опухоли, далее количество суммировали
CD8	Иммунные клетки	Мембрана/ Цитоплазма	Выполнен подсчет позитивно окрашенных клеток в пяти полях зрения препарата по 0,05 мм ² (суммарно 0,25 мм ²) отдельно в строме и паренхиме опухоли, далее количество суммировали
CD68	Иммунные клетки	Мембрана/ Цитоплазма	Выполнен подсчет позитивно окрашенных клеток в пяти полях зрения препарата по 0,05 мм ² (суммарно 0,25 мм ²) отдельно в строме и паренхиме опухоли, далее количество суммировали
PD-L1	Опухолевые и иммунные клетки	Мембрана	Оценка выполнена с помощью показателя CPS (Combined Positive/positivity Score): 0 – полное отсутствие реакции, 1 - CPS ≤1, 2 - 1<CPS<10, 3 - CPS>10, 4 - CPS >50 [32].

Для подсчета иммунных клеток на цифровых изображениях было построено по 5 равных квадратов площадью 0,05 мм² (общая площадь составляла 0,25 мм²) отдельно в строме и

паренхиме опухоли [28, 31]. Для анализа были выбраны наиболее репрезентативные поля зрения, также для различных маркеров была выбрана точная локализация в опухолевой ткани. В каждом квадрате вручную были отмечены позитивно окрашенные иммунные клетки с помощью инструмента «Points» («точки») (Рисунки 2.2-2.4). С помощью программы было автоматически посчитано число отмеченных клеток в каждом квадрате, для статистического анализа количество клеток в 5 полях зрения суммировали.

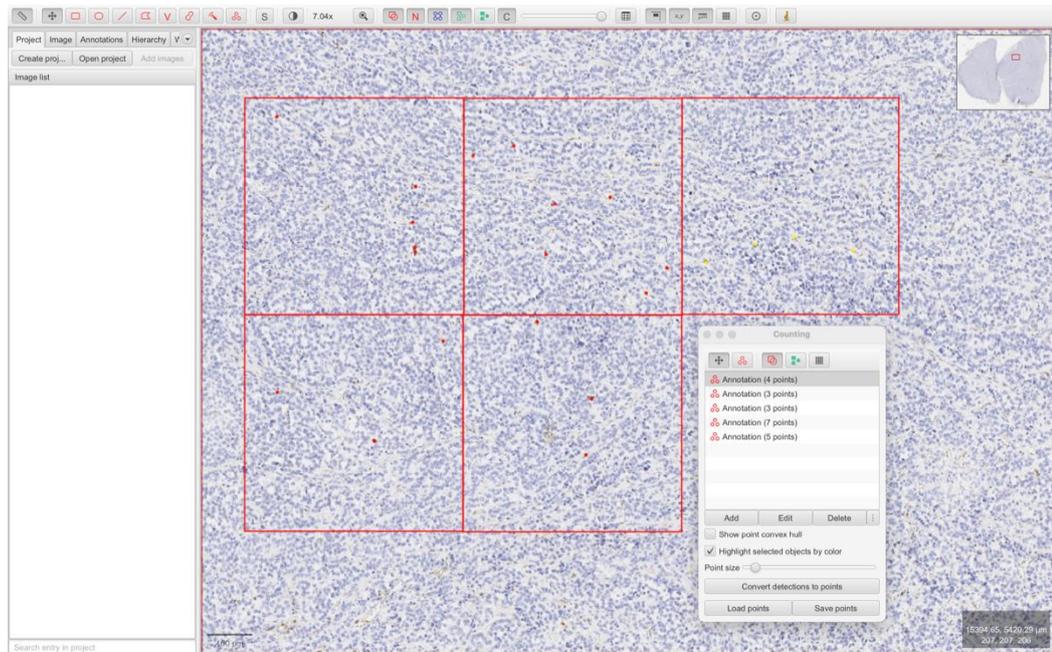


Рисунок 2.2 – Методика подсчета количества иммунных клеток в паренхиме опухоли. Классический подтип АКР. ИГХ реакция с антителом CD45

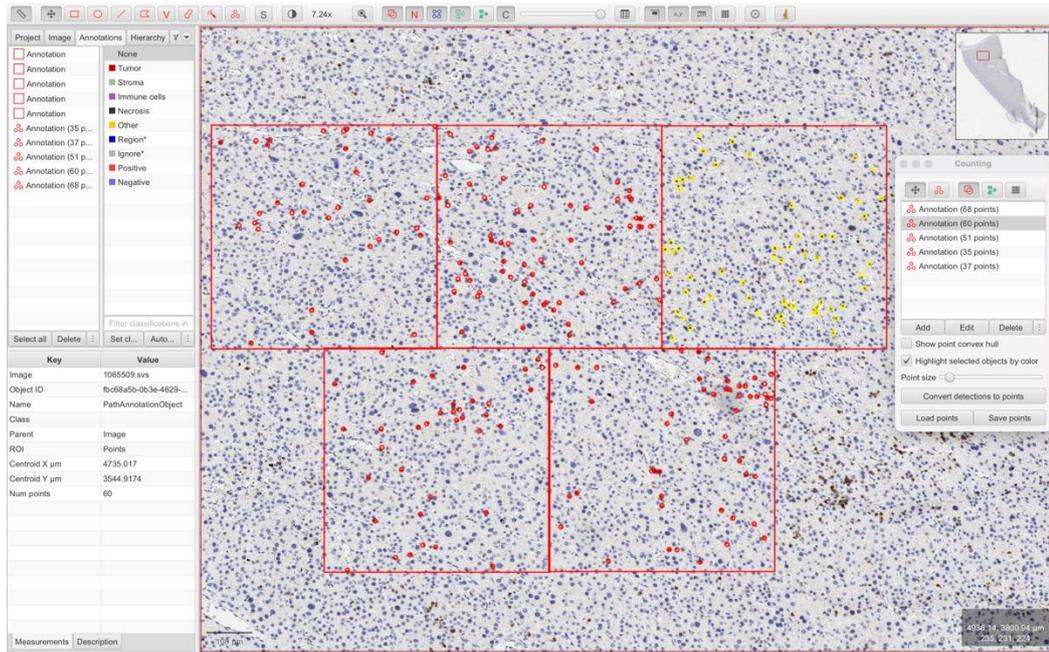


Рисунок 2.3 – Методика подсчета количества иммунных клеток в онкоцитарном подтипе аденокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом CD3

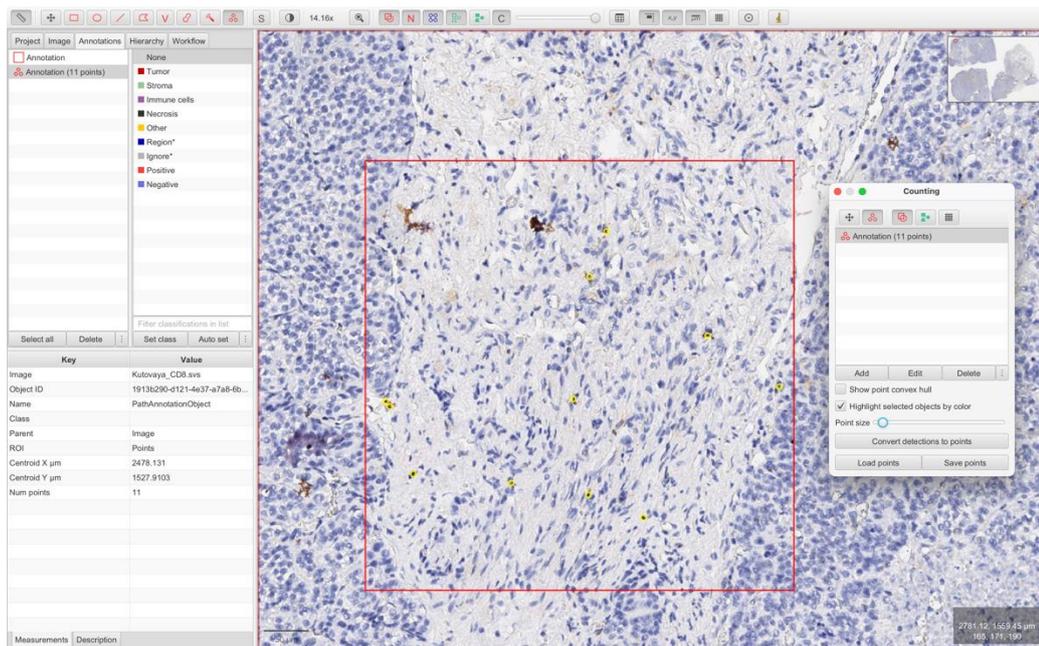


Рисунок 2.4 – Методика подсчета количества иммунных клеток в строме опухоли. Классический подтип АКР. ИГХ реакция с антителом CD8

Для оценки PD-L1 статуса использовался показатель CPS (Combined Positive/positivity Score – отношение количества клеток с экспрессией PD-L1 в опухоли, лимфоцитах, макрофагах к общему количеству опухолевых клеток, умноженное на 100). Критерием позитивного PD-L1 статуса опухоли явилось полное или частичное мембранное окрашивание не менее 1 опухолевой и иммунной клетки на 100 клеток, расположенных в толще опухоли или не далее 1 мм от границы

опухоли. Наличие гранулярного или зернистого окрашивания по ходу мембраны клетки также было допустимо [6].

2.3. Статистические методы анализа полученных данных

Статистический анализ выполнен на языке программирования Python 3.9 с использованием библиотек pandas, numpy, sklearn, scipy и lifelines.

Описательная статистика количественных признаков представлена в виде медиан и первых и третьих квартилей, качественных – в виде абсолютных и относительных частот. Сравнение двух независимых групп по количественному признаку выполнено с помощью критерия Манна-Уитни, сравнение трех и более независимых групп – с помощью критерия Краскелла-Уоллиса с дальнейшим post-hoc анализом. Корреляционный анализ был выполнен с помощью метода Спирмена.

Построение графиков и схем было выполнено в программе SPSS 26.

Анализ выживаемости был проведен с помощью анализа Каплана-Майера. Для сравнения выживаемости двух групп был использован логарифмический ранговый тест. Для построения прогностических моделей выживаемости использован регрессионный анализ Кокса. Для количественных признаков при построении прогностических моделей использовано шкалирование MinMax. При выборе лучшей модели ориентировались на результаты классификации тестовой выборки при применении разработанной модели.

Критический уровень статистической значимости был принят равным 0,05. При множественных сравнениях выполнялась поправка уровня статистической значимости с помощью поправки Бонферрони (P_0) путем деления 0,05 на количество сравнений. Значения между 0,05 и P_0 интерпретировались в качестве статистической тенденции.

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОГО РАКА

3.1. Характеристика изучаемой популяции

Рак коры надпочечников был диагностирован у 73 пациентов, 51 (69,9%) из которых были женского пола, 22 (30,1%) – мужского (Рисунок 3.1).

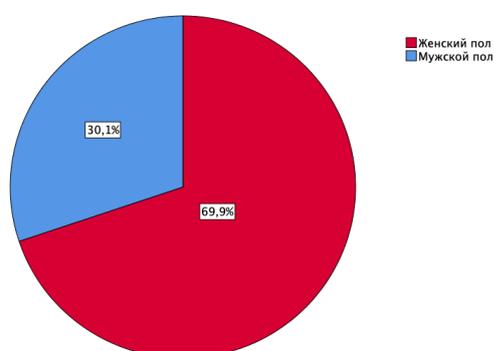


Рисунок 3.1 – Распределение пациентов по полу

Средний возраст пациентов ($n=73$), включенных в исследование, составил $46,8 \pm 1,7$ лет. Медиана возраста пациентов женского пола ($n=51$) составила 53 года, мужского пола ($n=22$) – 36 лет (Рисунок 3.2).

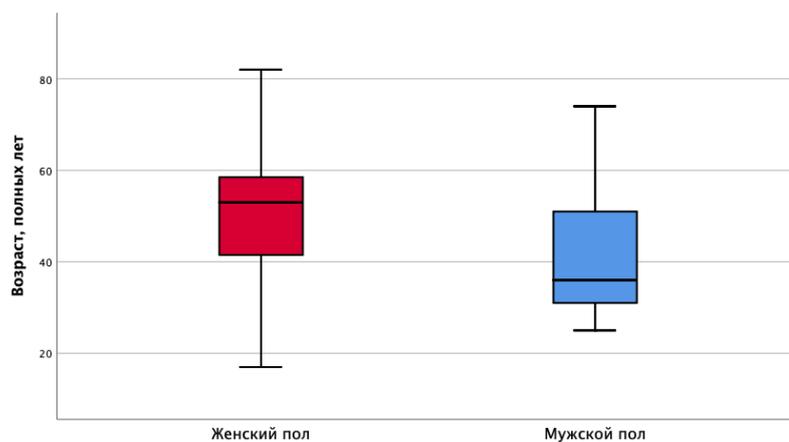


Рисунок 3.2 – Распределение пациентов по возрасту

Среди изученного гистологического материала классический морфологический подтип АКР был диагностирован в 52,1% случаев (n=38), онкоцитарный – в 24,7% случаев (n=18), миксоидный – в 12,3% (n=9) (Рисунок 3.3). В 11% случаев (n=8) был установлен смешанный подтип опухоли, 6 случаев из которого были представлены сочетанием классического и онкоцитарного подтипов и 2 случая – классического и миксоидного.

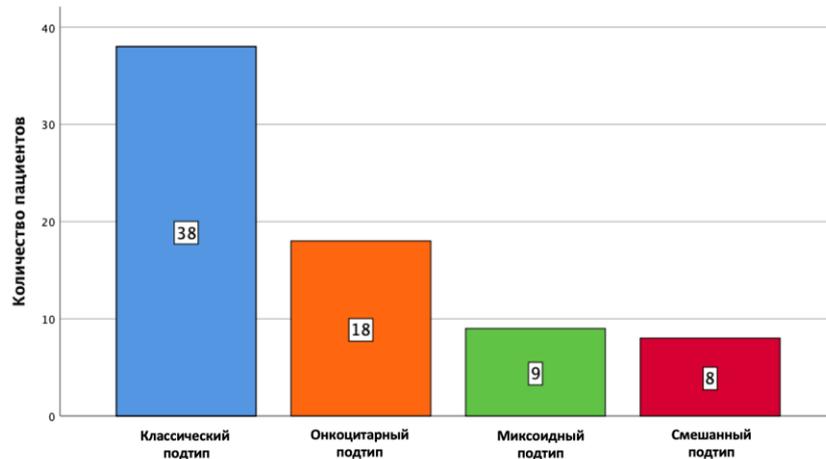


Рисунок 3.3 – Распределение пациентов по гистологическому подтипу АКР

Для 62 пациентов были доступны клинические данные, содержащие результаты гормонального исследования. В 25 случаях (40,3%) были диагностированы гормональные нарушения. Согласно данным функциональной активности опухоли, у 20 пациентов (32,3%) отмечался гиперкортицизм, у 3 пациентов (4,8%) – гиперкортицизм сочетался с гиперандрогенией, в 1 случаев (1,6%) наблюдалась гиперандрогения, в 1 случае (1,6%) – гиперальдостеронизм (Рисунок 3.4).

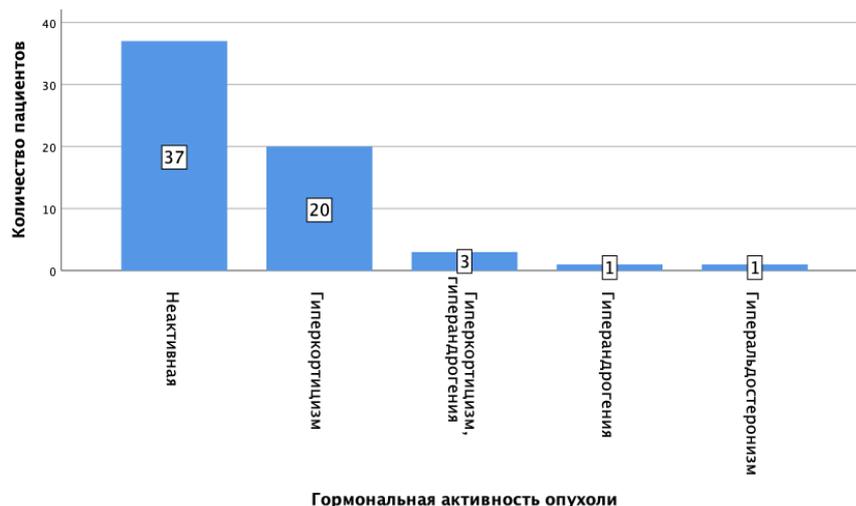


Рисунок 3.4 – Распределение пациентов по гормональной активности опухоли

По результатам проведенного патологоанатомического исследования послеоперационного материала была определена стадия по системе ENSAT. В 45,2% случаях (n=33) была установлена II стадия, в 32,9% случаях (n=24) – III, в 13,7% случаях (n=10) – I и в 8,2% случаях (n=6) – IV стадия (Рисунок 3.5).

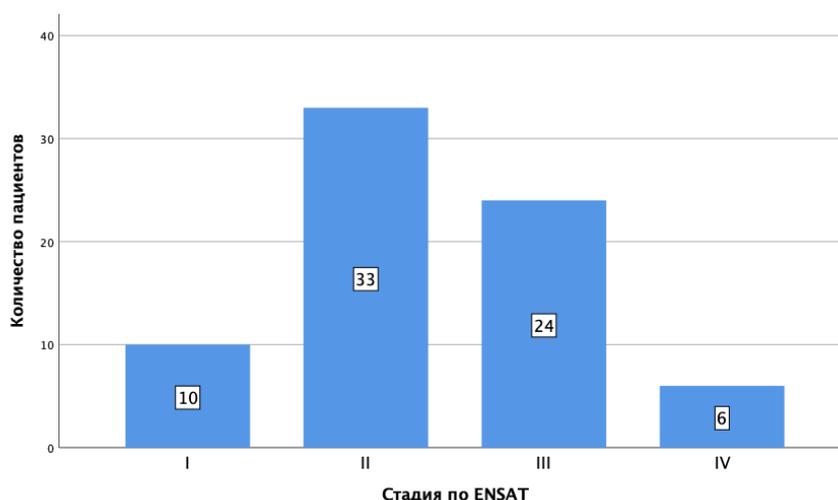


Рисунок 3.5 – Распределение пациентов по стадиям заболевания по системе ENSAT

3.2. Клинико-иммуногистохимическая характеристика иммунного микроокружения в различных морфологических подтипах аденокортикального рака

На данном этапе был выполнен анализ CD45+ пан-лейкоцитарной инфильтрации, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клеточной инфильтрации, а также CD68+ макрофагов.

3.2.1. Анализ экспрессии CD45-пан-лейкоцитарного маркера

Исследован 71 образец операционного материала рака коры надпочечников. Во всех наблюдениях выявлена положительная иммуногистохимическая реакция с CD45.

На Рисунках 3.6-3.11 представлены результаты ИГХ реакций с антителом к CD45 в паренхиме и строме исследованных опухолевых образцов.

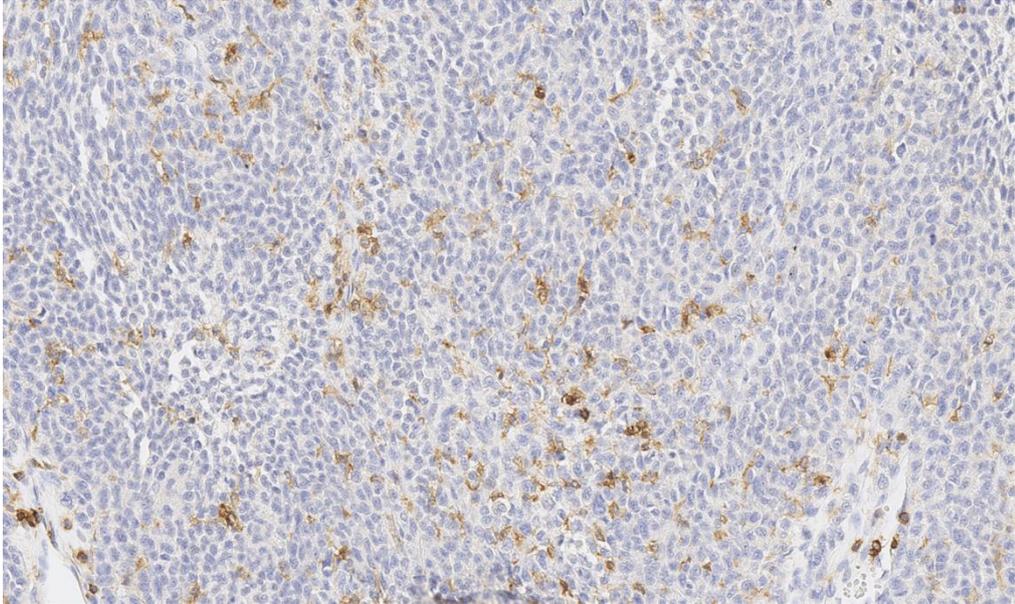


Рисунок 3.6 – Классический подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD45. Увеличение x100

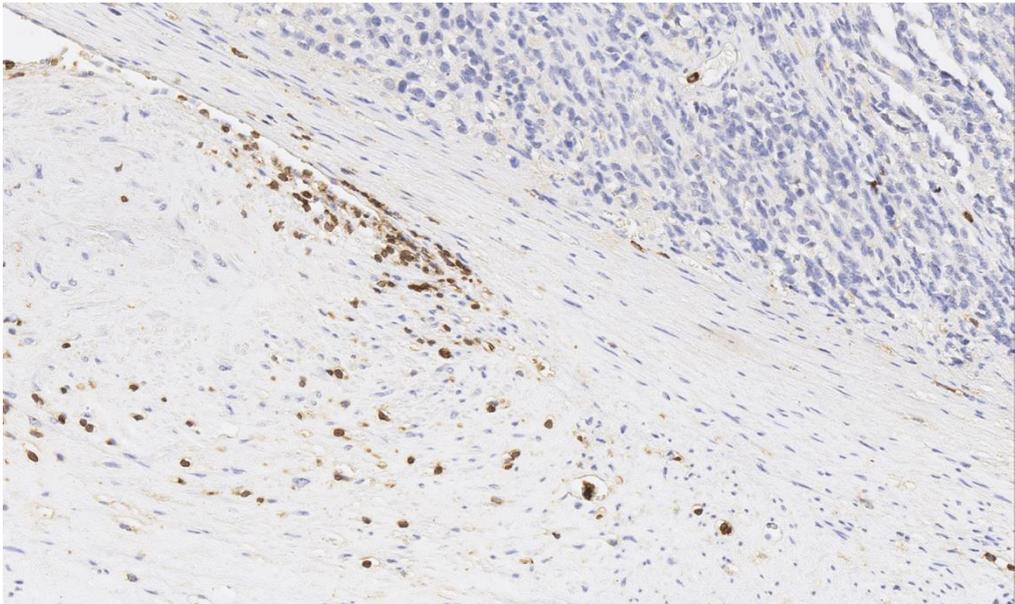


Рисунок 3.7 – Классический подтип адренокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD45. Увеличение x100

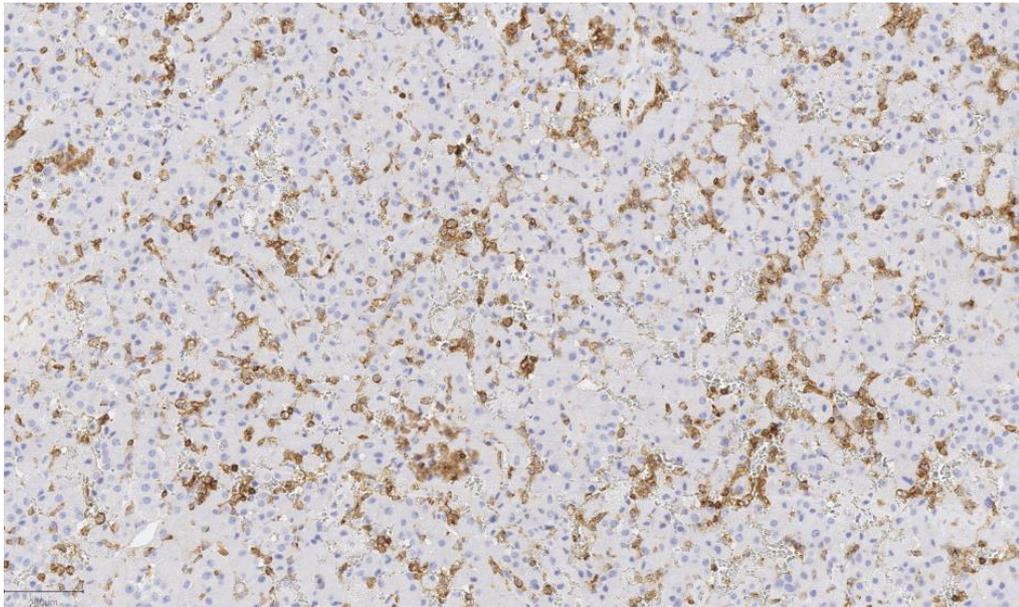


Рисунок 3.8 – Онкоцитарный подтип аденокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD45. Увеличение x100

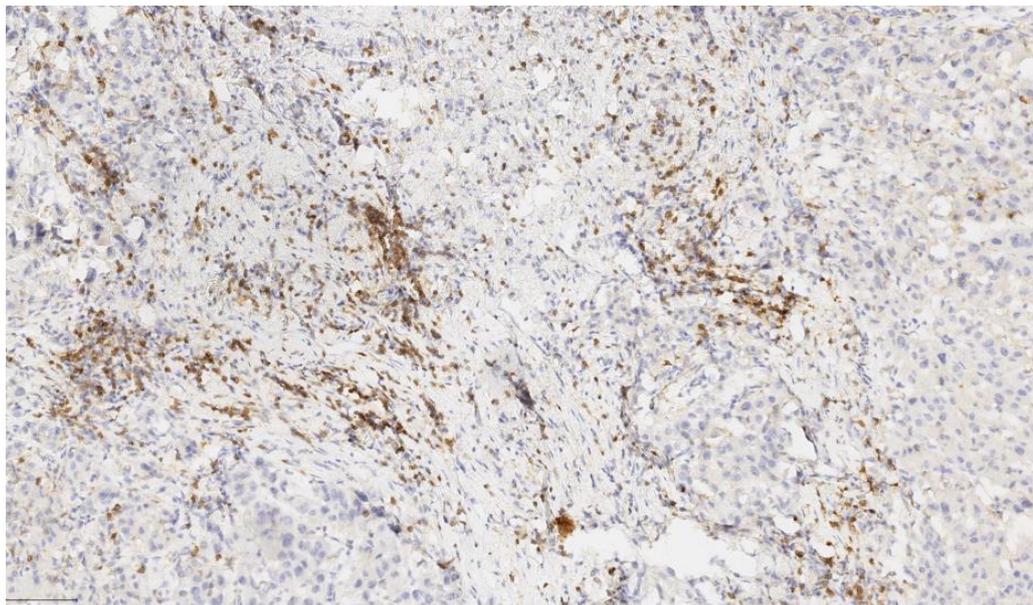


Рисунок 3.9 – Онкоцитарный подтип аденокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD45. Увеличение x100

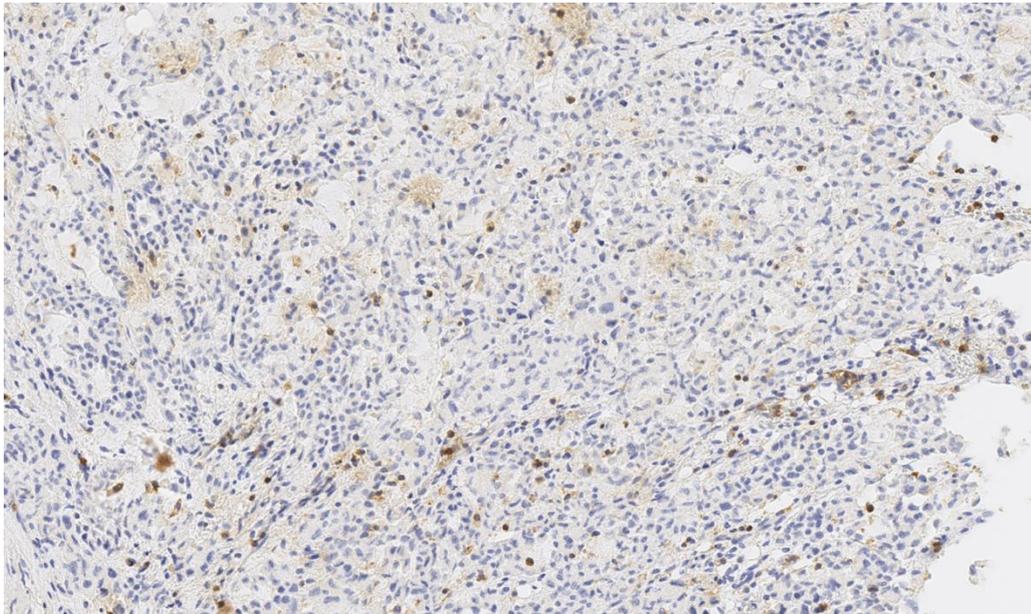


Рисунок 3.10 – Миксоидный подтип аденокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD45. Увеличение x100

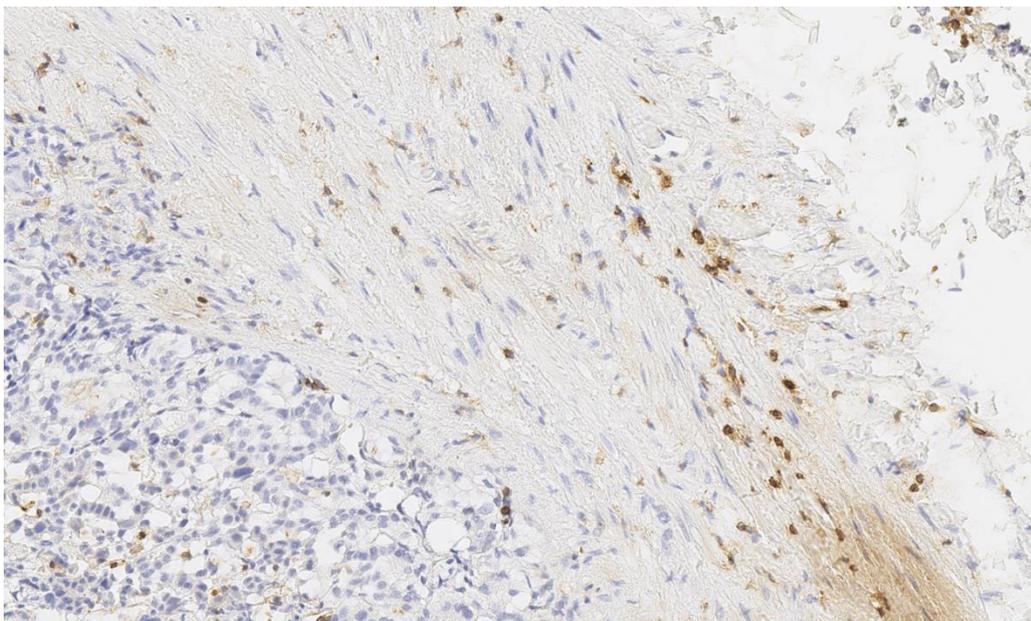


Рисунок 3.11 – Миксоидный подтип аденокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD45. Увеличение x100

Среднее количество иммунных клеток в паренхиме ($n=71$) и строме ($n=67$) в исследуемых образцах новообразования было относительно низким – 142 и 187 клеток/ мм^2 , соответственно. Медиана значений в паренхиме составила 66 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 :27-176), в строме 132 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 :57-253).

Медиана количества CD45+ клеток в паренхиме опухоли у женщин ($n=50$) составляет 71 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 27-198), а у мужчин ($n=21$) – 58 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 28-131). Медиана количества CD45+ клеток в строме опухоли у женщин ($n=48$) и мужчин ($n=19$) 127 клеток/ мм^2

(Q_1 - Q_3 : 57-269) и 136 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 57-215), соответственно. При статистическом анализе с помощью критерия Манна-Уитни значимых различий по полу в паренхиме и строме опухоли обнаружено не было ($p=0,377$ и $p=0,907$, соответственно).

Статистически значимых различий (метод Спирмена) по возрасту ни в паренхиме ($p=0,133$) ни в строме ($p=0,121$) опухоли не выявлено. При анализе влияния размера новообразования на изучаемые факторы, различия также были не достоверными ($p=0,66$ и $p=0,704$ в паренхиме и строме опухоли, соответственно). Далее в исследовании был выполнен анализ связи экспрессии CD45 с клинико-морфологическими параметрами.

На Рисунках 3.12 и 3.13 представлены диаграммы размаха распределения CD45 положительных иммуноцитов по гистологическим подтипам АКР. Количество CD45+ иммуноцитов в паренхиме ($n=36$) и строме ($n=33$) опухоли классического гистологического подтипа АКР составило 44 (Q_1 - Q_3 : 16-90) и 68 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 49-165), соответственно. В то же время, при подсчете количества CD45+ клеток в онкоцитарном подтипе значения в паренхиме ($n=18$) опухоли были значительно выше и составили 310 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 156-414), а в строме ($n=17$) опухоли 312 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 203-389). В группах с миксоидным и смешанным подтипом АКР CD45+ инфильтрация также была сравнительно ниже. В миксоидном подтипе медиана экспрессии CD45 в паренхиме ($n=9$) и строме ($n=9$) составила 32 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 28-127) и 121 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 50-225), соответственно. В группе со смешанными опухолями медиана в паренхиме ($n=8$) опухоли составила 72 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 31-124), в строме ($n=8$) – 116 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 78-181). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса было установлено наличие статистически значимых различий как в паренхиме ($p<0,001$) так и в строме ($p<0,001$) опухоли по гистологическим подтипам АКР. Апостериорные сравнения показали статистически значимую разницу между группами с классическим и онкоцитарным подтипом ($p<0,001$ в паренхиме и строме).

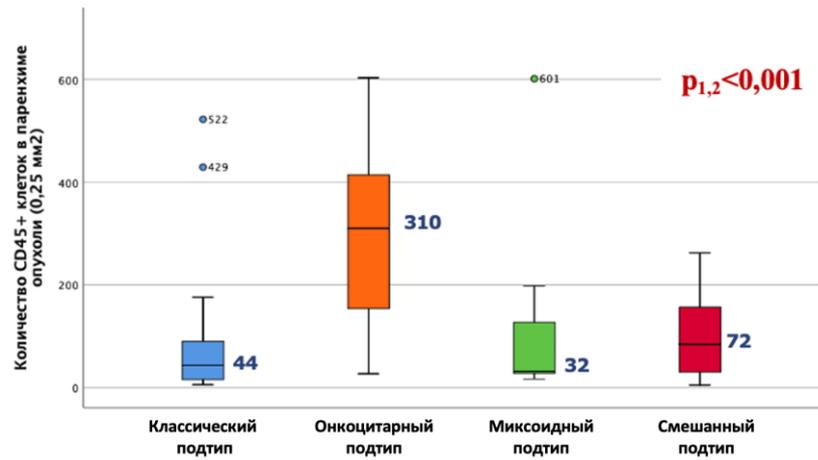


Рисунок 3.12 – Распределение CD45+ клеток в паренхиме опухоли в зависимости от гистологического подтипа АКР

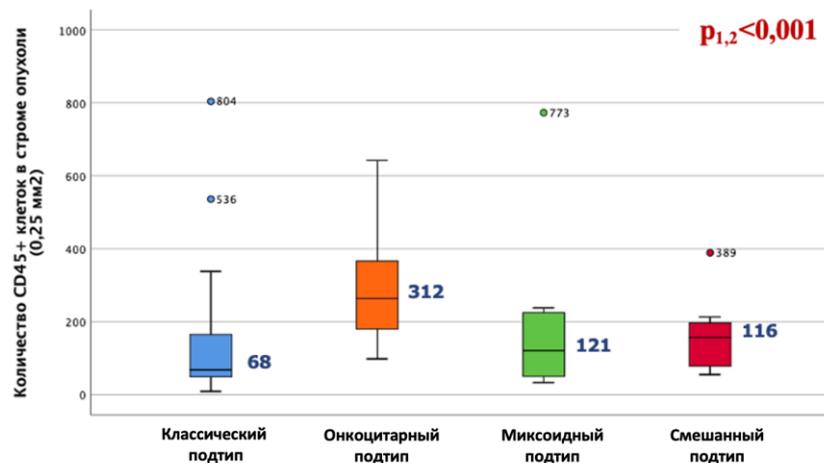


Рисунок 3.13 – Распределение CD45+ клеток в строме опухоли в зависимости от гистологического подтипа АКР

При анализе групп по распространенности опухоли (по классификации TNM) было выявлено, что АКР со стадией pT1 (n= 9) в паренхиме опухоли имели медиану экспрессии CD45 62 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 32-396), pT2 (n=32) – 85 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 24-165), pT3 (n=17) – 121 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 49-156), pT4 (n=11) – 30 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 15-176). Закономерность между распространением и экспрессией данного маркера выявлено не было, при статистическом анализе с помощью критерия Краскелла-Уоллиса значимых различий не установлено (p=0,426). Экспрессия CD45 в строме опухоли была следующая: при стадии pT1 (n=9) – 161 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 68-238), pT2 (n=29) – 121 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 58-225), pT3 (n=17) – 178 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 116-338), pT4 (n=10) – 61 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 51-181). Достоверных различий по распространению и CD45 положительными клетками в строме не выявлено (p=0,343).

Был проведен сравнительный анализ количества CD45+ иммунцитов по распространению опухоли в лимфатические узлы, установлено, что при стадии pN0 (n=67) в

паренхиме опухоли медиана экспрессии маркера CD45 составила 62 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 27-176), при стадии pN1 было обнаружено только два образца опухоли – 601 и 75 клеток/мм². Медиана экспрессии в строме опухоли в стадии pN0 (n=67) составила 121 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 57-253), pN1 образцы (n=2) демонстрировали 773 и 178 клеток/мм².

По наличию отдаленных метастазов выявлено, что новообразования со стадией pM0 (n=63) в паренхиме имели медиану экспрессии CD45 – 75 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 27-176), pM1 (n=6) – 57 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 33-114). При использовании критерия Манна-Уитни статистически значимых различий не выявлено (p=0,893). В строме опухоли медиана при pM0 (n=60) составила 127 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 57-232), pM1 (n=5) – 297 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 65-338). Статистических различий также не установлено (p=0,494).

При сравнении по стадиям клинической классификации ENSAT было выявлено, что опухоли со стадией I (n=9) имели медиану экспрессии маркера 62 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 32-396), II (n=31) – 84 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 20-176), III (n=23) – 75 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 28-176), IV (n=6) – 57 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 33-114). В строме опухоли данные показатели были следующие: при стадии I (n=9) – 161 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 68-238), II (n=28) – 118 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 58-219), III (n=23) – 170 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 55-253), IV (n=5) – 297 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 65-338). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса статистически значимые различия в данных группах не отмечались (p=0,904 и p=0,834, соответственно).

При анализе статуса гормональной активности опухоли и количества CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли медиана при гиперкортицизме (n=19) составила 38 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 17-110), при неактивной (n=36) опухоли – 91 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 30-169), при опухолях со смешанной гормональной активностью (гиперкортицизм сочетался с гиперандрогенией) (n=3) – 427, 429 и 354 клеток/мм². Согласно критерию Краскелла-Уоллиса количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли было выше в группе пациентов со смешанной гормональной активностью по сравнению с группой пациентов с гиперкортицизмом на уровне статистической тенденции (p=0,010). В строме опухоли медиана при гиперкортицизме (n=18) составила 80 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 38-213), при неактивной (n=33) опухоли 121 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 57-203), при опухолях со смешанной гормональной активностью (гиперкортицизм сочетался с гиперандрогенией) (n=3) – 529, 536 и 417 клеток/мм². Согласно критерию Краскелла-Уоллиса в данных группах в строме опухоли p=0,031, при этом количество CD45+ иммунных клеток также было выше в группе пациентов со смешанной гормональной активностью по сравнению с группой пациентов с гиперкортицизмом на уровне статистической тенденции (p=0,013). Также было отмечено, что в группе со смешанной гормональной активностью на уровне статистической тенденции наблюдался более высокий уровень CD45+ в строме по сравнению с группой с отсутствием гормональной активности (p=0,043).

Таким образом, в ходе данного этапа исследования был проведен иммуногистохимический анализ экспрессии маркера CD45 в иммунном инфильтрате 71 послеоперационного материала от пациентов с АКР. В паренхиме (n=71) и строме (n=67) опухолей было обнаружено относительно низкое среднее количество иммунных клеток (142 и 187 клеток/мм² соответственно). Статистически значимых различий в количестве CD45+ клеток в зависимости от пола, возраста и размера образования выявлено не было. Однако, при анализе экспрессии данного маркера в различных гистологических подтипах АКР были выявлены статистически значимые различия как в паренхиме (p<0,001) так и в строме опухолей (p<0,001), при попарном сравнении было установлено, что данные различия обусловлены более выраженной CD45+ иммунной инфильтрацией онкоцитарного подтипа АКР как в паренхиме (p<0,001), так и в строме (p<0,001) опухоли по сравнению с классическим гистологическим подтипом.

При анализе связи экспрессии CD45 с другими клинико-морфологическими параметрами, такими как распространенность опухоли по классификации TNM, наличие метастазов в регионарные лимфатические узлы, наличие отдаленных метастазов, стадия АКР по клинической классификации ENSAT статистически значимых различий как в паренхиме, так и строме опухоли выявлено не было. В то же время при оценке количества CD45+ иммунных клеток было установлено, что в группе пациентов со смешанной гормональной активностью по сравнению с группой пациентов с гиперкортицизмом на уровне статистической тенденции отмечается более выраженная иммунная инфильтрация как в паренхиме (p=0,010), так и в строме опухоли (p=0,013). В группе со смешанной гормональной активностью на уровне статистической тенденции также наблюдался более высокий уровень CD45+ в строме по сравнению с группой с отсутствием гормональной активности (p=0,043).

3.2.2. Анализ экспрессии CD3-пан-Т-клеточного маркера

Анализ экспрессии CD3-пан-Т-клеточного маркера был выполнен на 73 образцах опухолевой ткани рака коры надпочечников. Во всех наблюдениях была выявлена положительная иммуногистохимическая реакция с антителами к CD3. В паренхиме и строме опухолевой ткани было выбрано 5 полей зрения по 0,05 мм² (общая площадь – 0,25 мм²), в которых был выполнен подсчет позитивно окрашенных клеток, после чего количество клеток суммировали.

Рисунки 3.14-3.19 демонстрируют результаты ИГХ реакций с антителом к CD45 в паренхиме и строме опухоли.

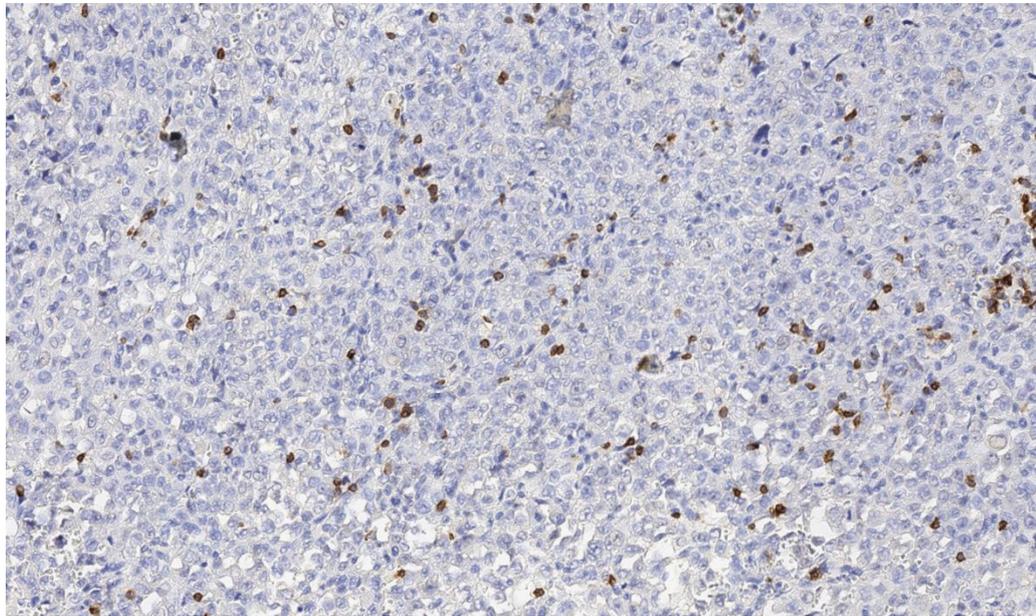


Рисунок 3.14 – Классический подтип аденокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD3. Увеличение x100

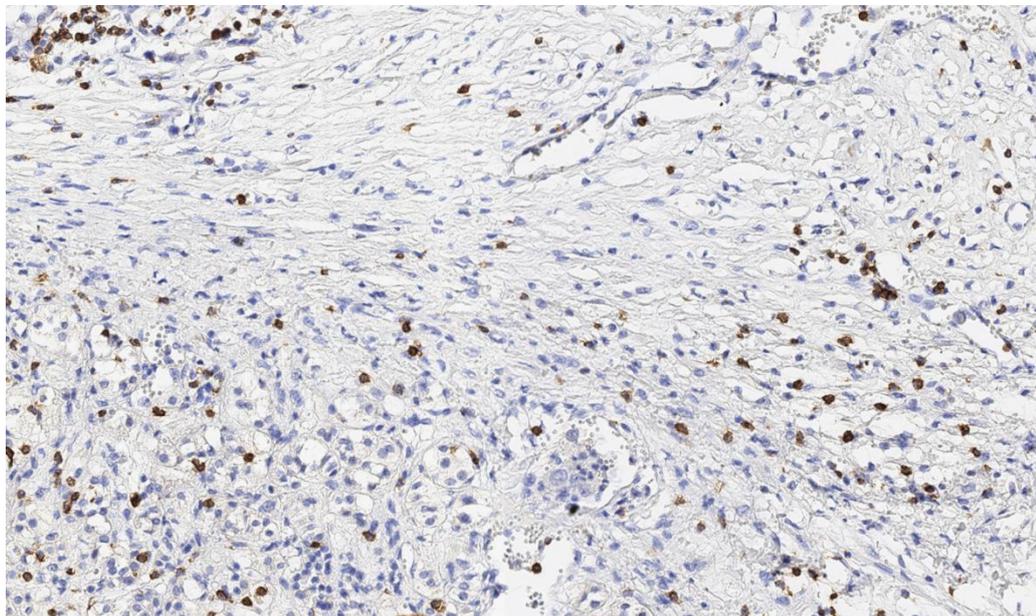


Рисунок 3.15 – Классический подтип аденокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD3. Увеличение x100

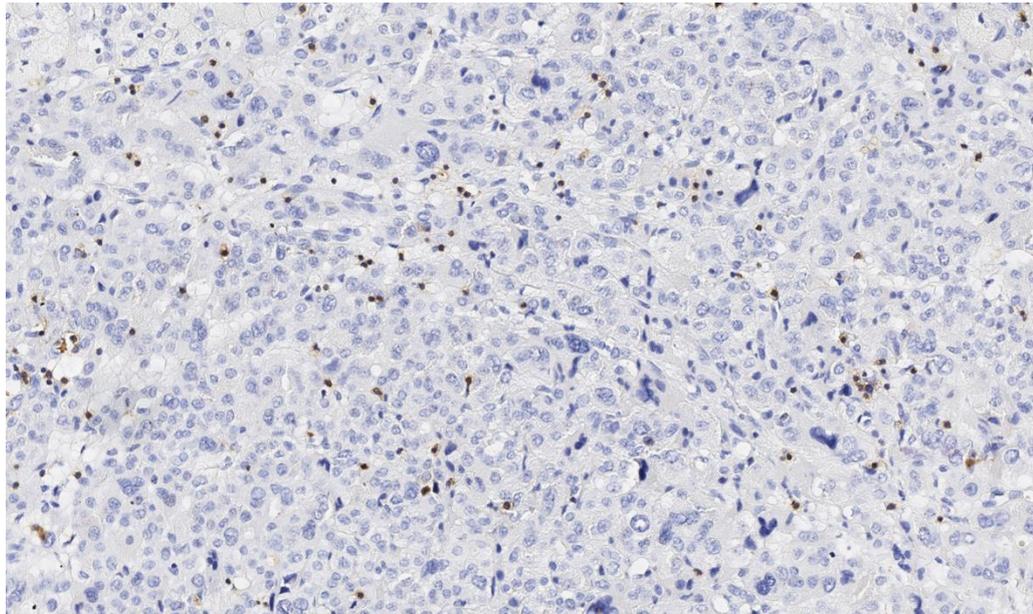


Рисунок 3.16 – Онкоцитарный подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD3. Увеличение x100

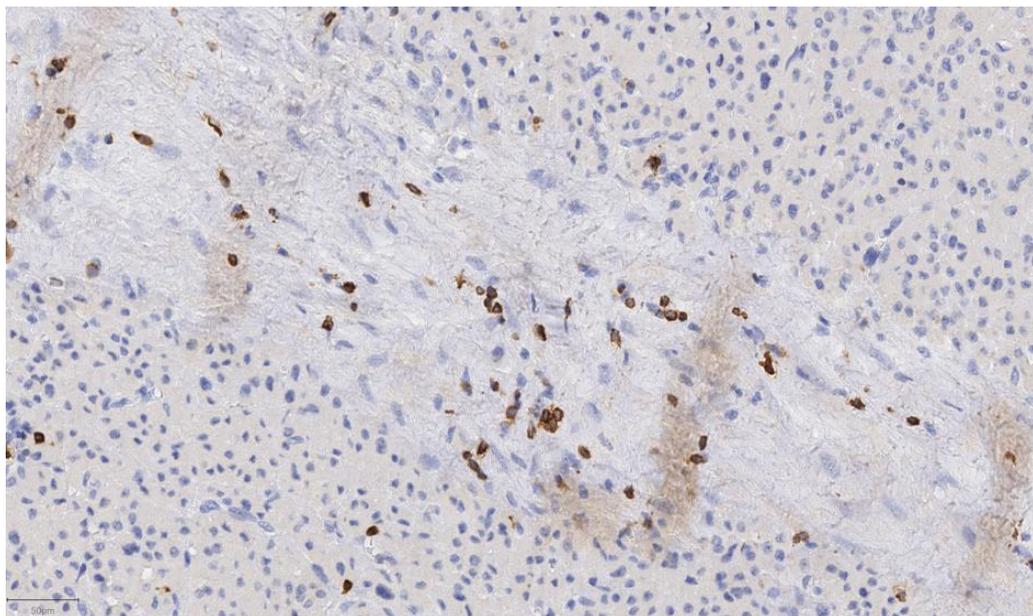


Рисунок 3.17 – Онкоцитарный подтип адренокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD3. Увеличение x100

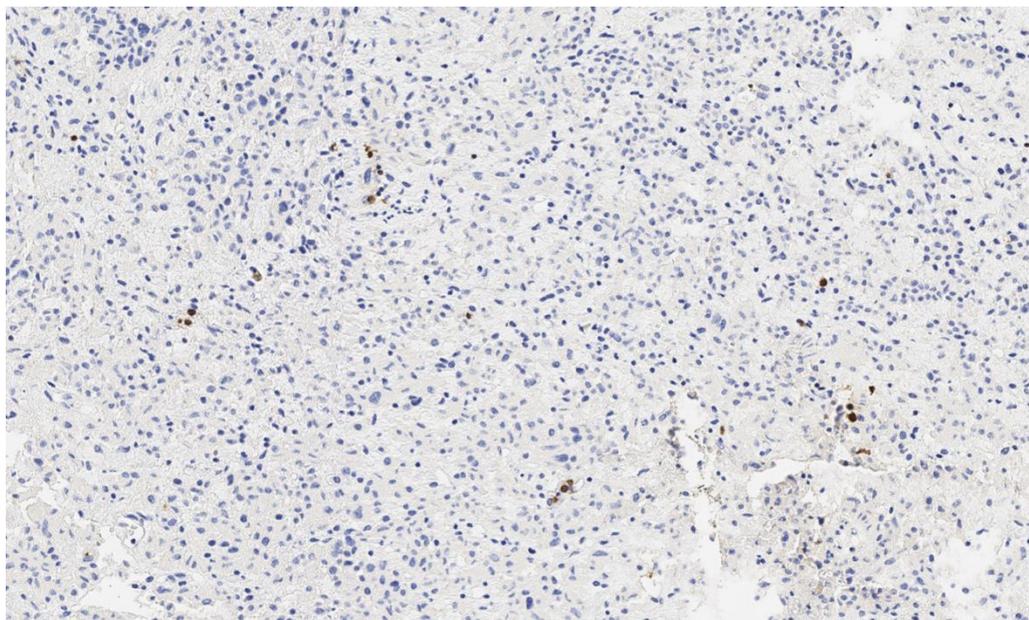


Рисунок 3.18 – Миксоидный подтип аденокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD3. Увеличение x100

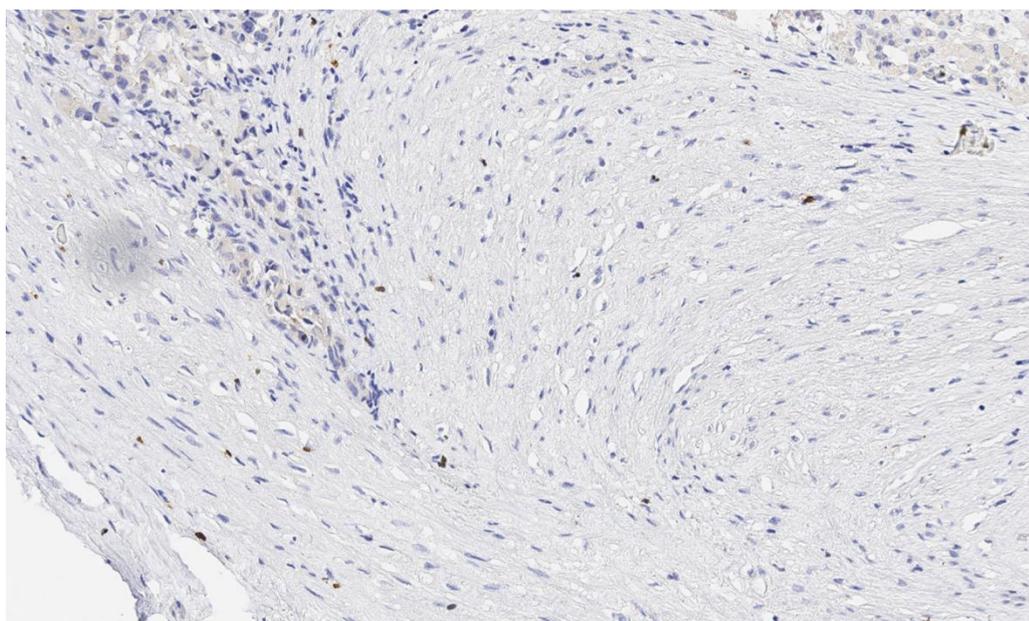


Рисунок 3.19 – Миксоидный подтип аденокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD3. Увеличение x100

Среднее количество CD3⁺ иммунных клеток в паренхиме (n=73) и строме (n=65) в исследуемых образцах АКР составило 52 и 94 клеток/мм², соответственно. Медиана значений в паренхиме составила 26 клеток/мм² (Q₁-Q₃:9-53), в строме 62 клеток/мм² (Q₁-Q₃:33-127).

При анализе распределения по полу пациентов было выявлено, что медиана количества CD3⁺ клеток в паренхиме опухоли у женщин (n=51) составляет 26 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 10-57), а у мужчин (n=22) – 27 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 8-50). Медиана количества CD3⁺ клеток в строме опухоли у женщин (n=45) и мужчин (n=20) составила 62 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 33-115) и 65

клеток/мм² (Q₁-Q₃: 35-128), соответственно. По критерию Манна-Уитни статистически значимых различий по полу как в паренхиме так и строме опухоли обнаружено не было (p=0,620 и p=0,994, соответственно).

При использовании метода Спирмена установлено, что статистически значимые различия по возрасту как в паренхиме (p=0,533) так и в строме (p=0,318) опухоли отсутствуют. При анализе влияния размера новообразования на изучаемые факторы, достоверных различий также не было выявлено (p=0,262 и p=0,254 в паренхиме и строме опухоли, соответственно). Далее был выполнен статистический анализ связи экспрессии маркера CD3 в опухоли с клинико-морфологическими параметрами.

На Рисунках 3.20 и 3.21 представлены диаграммы размаха распределения CD3+ иммунных клеток по гистологическим подтипам АКР. В паренхиме (n=38) опухоли классического подтипа АКР медиана клеток составила 17 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-38), в строме (n=32) опухоли – 45 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 20-99). Значения медиан количества CD3+ клеток в образцах опухолей из группы онкоцитарного подтипа было значительно выше. В паренхиме (n=18) медиана составила 63 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 33-162), в строме (n=16) – 121 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 42-196). В группах с миксоидным и смешанным подтипом АКР CD3+ инфильтрация также была сравнительно ниже, чем в онкоцитарных подтипах обсуждаемого новообразования. В миксоидном подтипе медиана экспрессии маркера CD3 в паренхиме (n=9) и строме (n=9) составила 25 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 8-51) и 71 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 57-73), соответственно. В группе со смешанными опухолями медиана в паренхиме (n=8) опухоли составила 12 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 7-28), в строме (n=8) – 61 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 36-109). Для оценки значимости полученных результатов был использован критерий Краскелла-Уоллиса, согласно которому статистически значимые различия были отмечены только в паренхиме опухоли (p<0,001), в то время как количество CD3+ иммунных клеток в строме опухоли значимых различий не демонстрировало (p=0,107). Апостериорные сравнения показали статистически значимую разницу между группами с классическим и онкоцитарным подтипом (p<0,001).

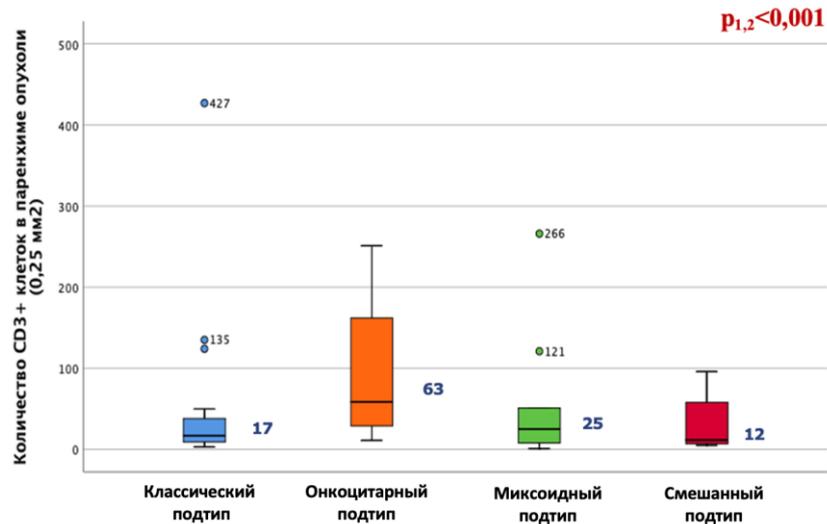


Рисунок 3.20 – Распределение CD3+ клеток в паренхиме опухоли в зависимости от гистологического подтипа АКР

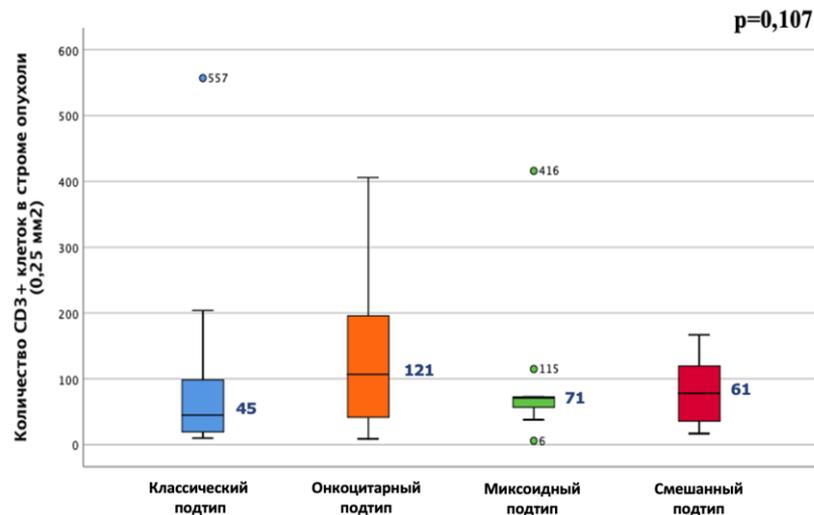


Рисунок 3.21 – Распределение CD3+ клеток в строме опухоли в зависимости от гистологического подтипа АКР

При анализе групп по распространенности опухоли было выявлено, что новообразования на стадией pT1 (n= 10) в паренхиме опухоли имели медиану экспрессии CD3 29 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-117), pT2 (n=32) – 28 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 11-50), pT3 (n=18) – 32 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 10-65), pT4 (n=11) – 11 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 5-20). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса статистически значимых различий установлено не было (p=0,192). Экспрессия маркера CD3 в строме опухоли была следующая: при стадии pT1 (n=8) – 86 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 41-112), pT2 (n=28) – 71 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 43-133), pT3 (n=17) – 72 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 31-131), pT4 (n=10) – 37 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 13-62). Значимых различий также не обнаружено (p=0,315).

Также был выполнен сравнительный анализ количества иммунных клеток по распространенности опухоли в лимфатические узлы, по результатам которого было выявлено,

что АКР со стадией pN0 (n=69) в паренхиме опухоли имели медиану экспрессии маркера CD3 26 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-50), на стадии pN1 было выявлено только два образца опухоли – 266 и 34 клеток/мм². В строме опухоли на стадии pN0 (n=61) медиана CD3+ клеток составила 57 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 33-115), на стадии pN1 (n=2) – 416 и 132 клеток/мм².

Новообразования со стадией pM0 (n=65) в паренхиме опухолевой ткани имели медиану экспрессии маркера CD3 на уровне 28 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-51), со стадией pM1 (n=6) – 26 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 13-48). В строме опухоли при стадии pM0 (n=58) медиана CD3+ клеток составила 57 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 33-127), при стадии pM1 (n=5) – 72 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 62-204). Для оценки статистической значимости полученных данных использовался критерия Манна-Уитни, согласно которому значимых различий как в паренхиме (p=0,755) так и строме (p=0,326) обнаружено не было.

При анализе групп по стадиям классификации ENSAT было выявлено, что опухоли со стадией I (n=10) имели медиану экспрессии маркера 29 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-117), II (n=31) – 28 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 10-50), III (n=24) – 24 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-60), IV (n=6) – 26 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 13-48). В строме опухоли экспрессия CD3 маркера на стадии I (n=8) составила 86 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 41-112), II (n=27) – 71 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 43-129), III (n=23) – 43 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 17-129), IV (n=5) – 72 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 62-204). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса статистически значимые различия в данных группах как в паренхиме так и строме опухоли не отмечались (p=0,964 и p=0,510, соответственно).

При анализе статуса гормональной активности опухоли и количества CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли медиана при гиперкортицизме (n=20) составила 14 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-33), при неактивной опухоли (n=37) – 29 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 10-55). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса статистически значимых различий в данных группах не выявлено (p=0,056). В строме опухоли медиана при гиперкортицизме (n=18) составила 50 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 19-76), при неактивной (n=34) опухоли 72 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 38-129). Для оценки статистической значимости полученных данных в строме опухоли использовался критерия Манна-Уитни, согласно которому значимых различий также обнаружено не было (p=0,177).

Таким образом, было исследовано 73 образца АКР, во всех наблюдениях была выявлена положительная иммуногистохимическая реакция с пан-Т-клеточным маркером CD3. Среднее количество CD3+ иммунных клеток в паренхиме (n=73) и строме (n=65) в исследуемых образцах АКР составило 52 и 94 клеток/мм², соответственно. Статистически значимых различий в количестве CD3+ клеток в зависимости от пола, возраста и размера образования выявлено не было. При анализе экспрессии данного маркера в различных гистологических подтипах АКР статистически значимые различия были отмечены только в паренхиме опухоли (p<0,001), в то время как в строме опухоли различий обнаружено не было (p=0,107), при попарном сравнении

было установлено, что данные различия обусловлены более выраженной CD3+ иммунной инфильтрацией онкоцитарного подтипа АКР по сравнению с классическим ($p < 0,001$).

При анализе связи экспрессии CD3 с другими клинико-морфологическими параметрами, такими как стадии опухолевого процесса по классификации TNM, стадия АКР по клинической классификации ENSAT, а также гормональная активность опухоли статистически значимых различий как в паренхиме, так и строме опухоли выявлено не было.

3.2.3. Анализ экспрессии маркера CD4

Анализ экспрессии маркера Т-хелперных клеток CD4 был выполнен на 71 образце операционного материала АКР. В паренхиме и строме опухолевой ткани было выбрано 5 полей зрения по 0,05 мм² (общая площадь – 0,25 мм²), в которых был выполнен подсчет позитивно окрашенных клеток, после чего полученное количество клеток суммировали.

Рисунки 3.22-3.27 демонстрируют результаты ИГХ реакций с антителом к CD4 в паренхиме и строме опухоли.

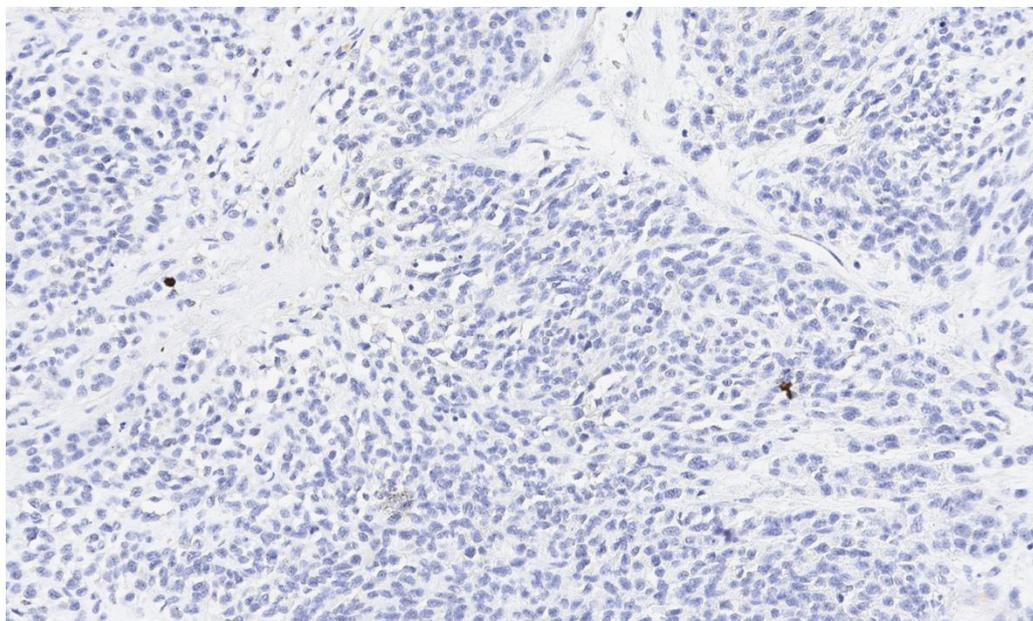


Рисунок 3.22 – Классический подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD4. Увеличение x100

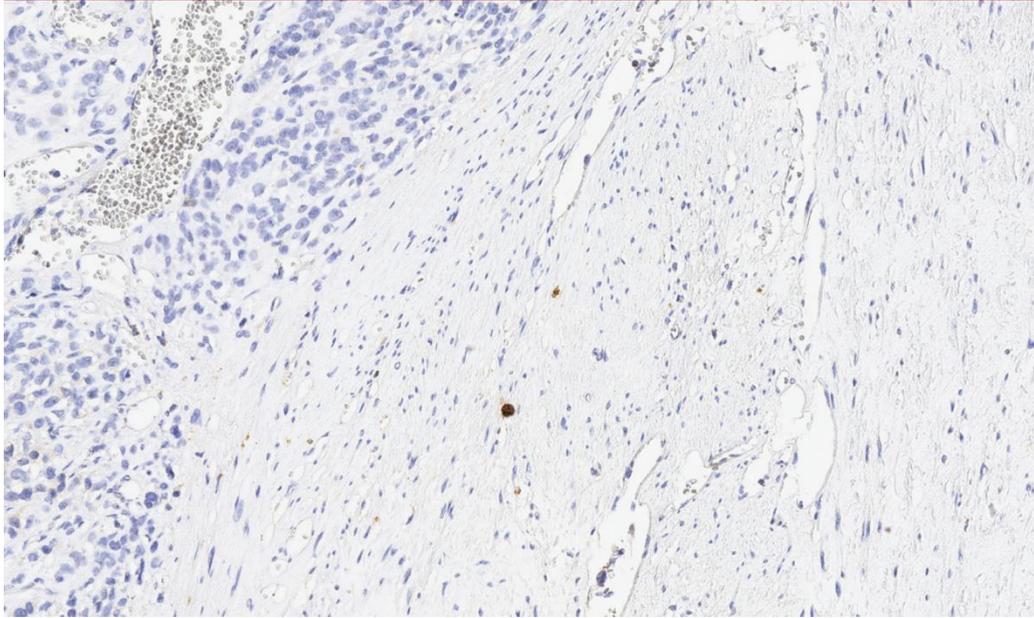


Рисунок 3.23 – Классический подтип адренокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD4. Увеличение x100

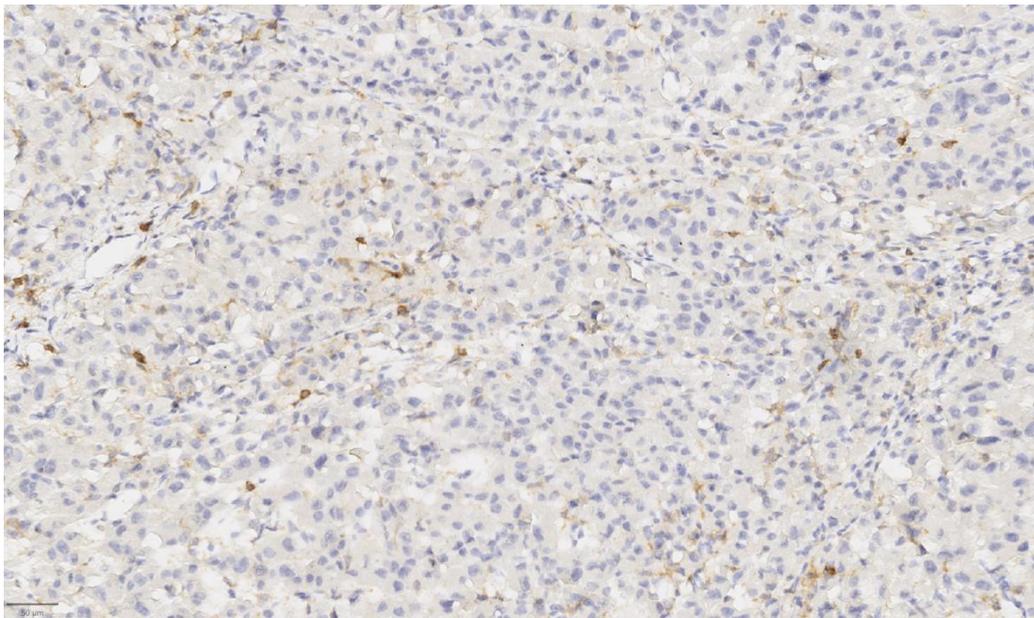


Рисунок 3.24 – Онкоцитарный подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD4. Увеличение x100

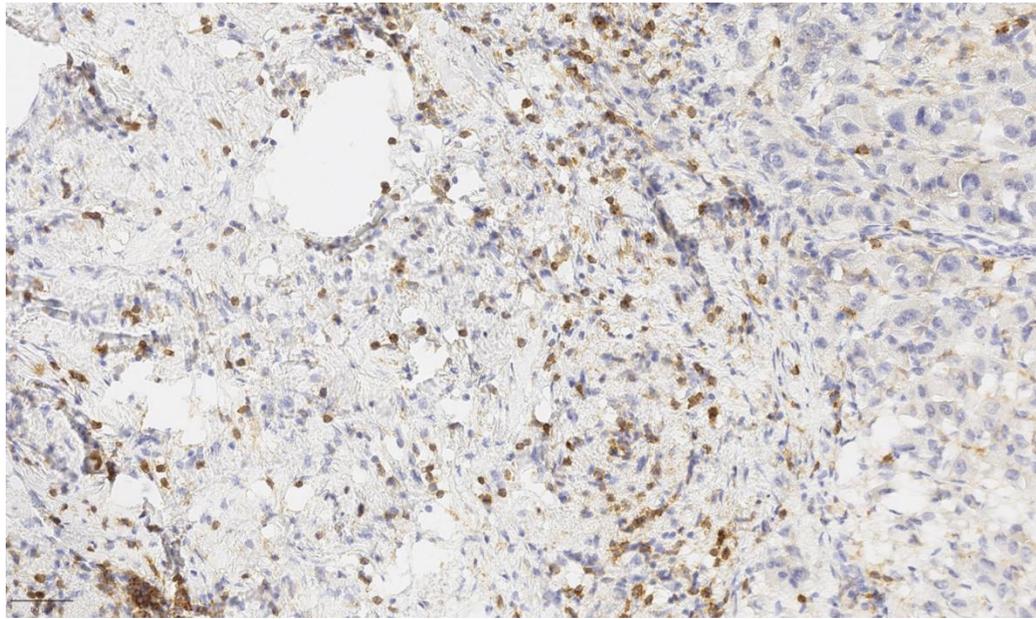


Рисунок 3.25 – Онкоцитарный подтип адренокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD4. Увеличение x100

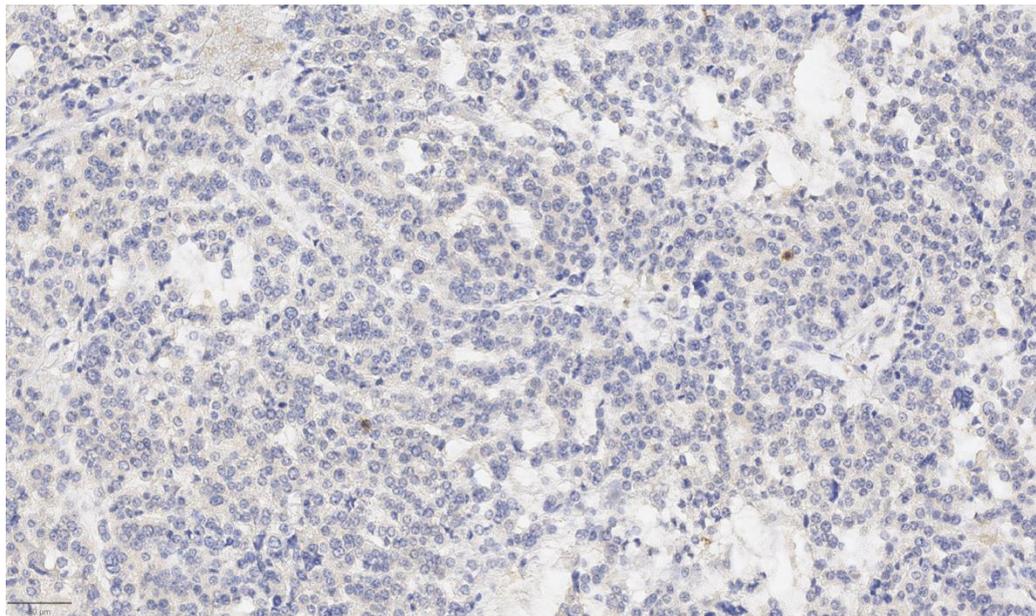


Рисунок 3.26 – Миксоидный подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD4. Увеличение x100

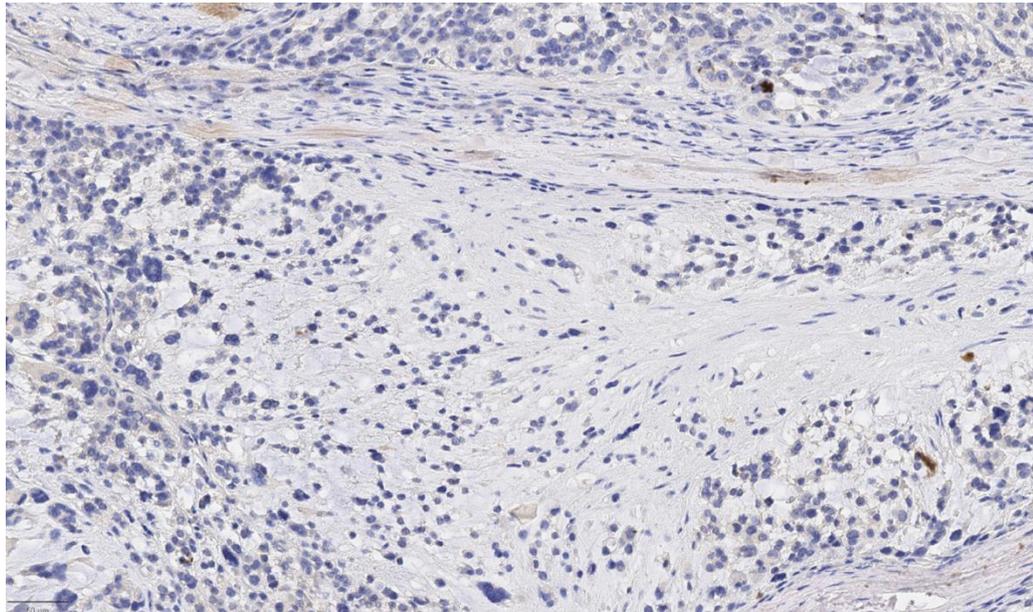


Рисунок 3.27 – Миксоидный подтип аденокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD4. Увеличение x100

Среднее количество CD4⁺ иммунных клеток в паренхиме (n=71) и строме (n=67) исследуемых образцов опухоли составило 7 и 18 клеток/мм², соответственно. Медиана значений в паренхиме составила 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃:1-7), в строме 7 клеток/мм² (Q₁-Q₃:3-20).

Медиана CD4⁺ клеток в паренхиме опухоли у больных женского пола (n=51) составляет 2 клетки/мм² (Q₁-Q₃: 1-9), а у мужского пола (n=22) – 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 0-4). Медиана CD4⁺ иммунных клеток в строме новообразования у женщин (n=48) и мужчин (n=20) 7 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 4-26) и 7 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 3-17), соответственно. Согласно критерию Манна-Уитни значимых различий по полу в паренхиме и строме АКР обнаружено не было (p=0,078 и p=0,598, соответственно).

Для оценки влияния возраста на количество CD4⁺ иммунных клеток был использован метод Спирмена, который не выявил значимых различий как в паренхиме так и в строме изучаемых опухолей (p=0,390 и p=0,319, соответственно). При анализе влияния размера новообразования на изучаемые факторы, достоверных различий не выявлено (p=0,195 и p=0,595 в паренхиме и строме опухоли, соответственно).

На Рисунках 3.28 и 3.29 представлены диаграммы размаха распределения CD4⁺ Т-клеток по гистологическим подтипам АКР. Численность CD4⁺ иммунных клеток в паренхиме (n=38) и в строме (n=35) АКР классического подтипа составило 2 (Q₁-Q₃: 1-3) и 5 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 2-15), соответственно. Интересно, при анализе количества CD4⁺ иммунных клеток в онкоцитарном подтипе значения в паренхиме (n=18) опухоли, как и при анализе клеток других субпопуляций, были выше и составили 9 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 3-20), а в строме (n=16) опухоли 19 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-58). В группах с миксоидным и смешанным подтипом АКР CD45⁺ инфильтрация также

была сравнительно ниже. В миксоидном подтипе медиана в паренхиме (n=9) и строме (n=9) составила 3 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 0-7) и 13 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-20), соответственно. В группе смешанного подтипа АКР медиана в паренхиме (n=8) опухоли составила 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-3), в строме (n=8) – 5 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 3-8). При использовании критерия Краскелла-Уоллиса было установлено наличие статистически значимых различий только в паренхиме опухоли (p=0,002). Апостериорные сравнения также показали статистически значимую разницу лишь между группами с классическим и онкоцитарным подтипами (p<0,001).

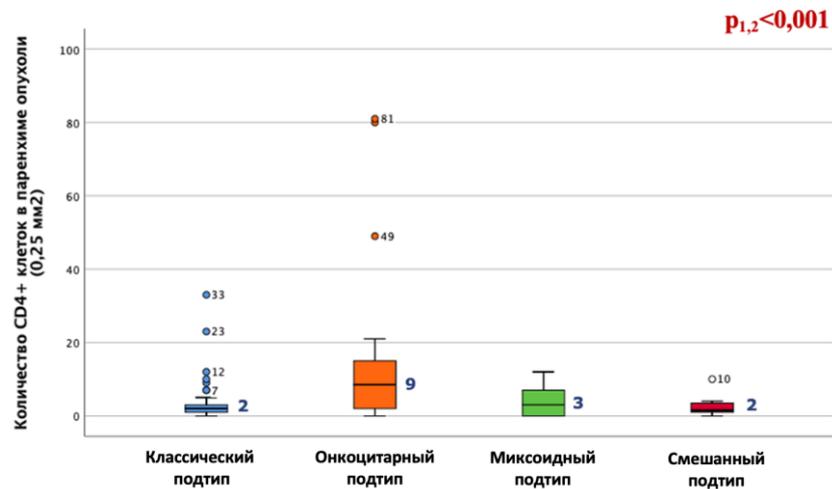


Рисунок 3.28 – Распределение CD4+ клеток в паренхиме опухоли в зависимости от гистологического подтипа АКР

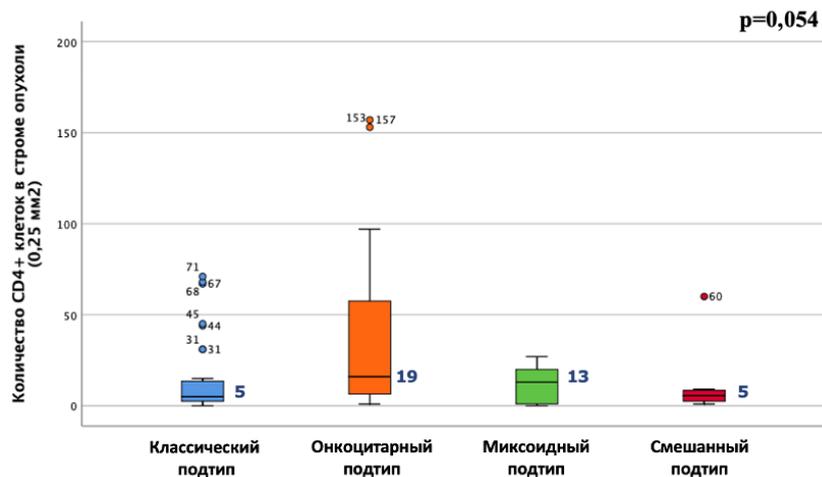


Рисунок 3.29 – Распределение CD4+ клеток в строме опухоли в зависимости от гистологического подтипа АКР

При анализе групп по распространенности опухоли было выявлено, что новообразования на стадии pT1 (n= 10) в паренхиме опухоли имели медиану экспрессии CD45 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 0-13), pT2 (n=32) – 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-10), pT3 (n=18) – 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-6), pT4

(n=11) – 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 0-5). При статистическом анализе с помощью критерия Краскелла-Уоллиса значимых различий не установлено (p=0,604). Экспрессия данного маркера в строме образцов АКР была следующая: при стадии pT1 (n=10) – 5 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-10), pT2 (n=29) – 12 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 4-33), pT3 (n=17) – 6 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 4-13), pT4 (n=10) – 5 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 2-9). Значимых различий также не обнаружено (p=0,243).

Также был проведен сравнительный анализ количества иммуноцитов относительно наличия признаков метастатического поражения регионарных лимфатических узлов. Опухоли на стадии pN0 (n=69) в паренхиме имели медиану экспрессии маркера CD4 на уровне 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-7), в то время как на стадии pN1 было обнаружено лишь два образца ткани – 12 и 2 клеток/мм². Медиана экспрессии в строме опухоли в стадии pN0 (n=64) составила 6 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 3-18), pN1 образцы (n=2) демонстрировали 13 и 31 клеток/мм².

По наличию отдаленных метастазов выявлено, что новообразования со стадией pM0 (n=65) в паренхиме имели медиану экспрессии CD4 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-7), pM1 (n=6) – 7 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 5-9). При использовании критерия Манна-Уитни статистически значимых различий не было выявлено (p=0,679). В строме опухоли медиана при pM0 (n=61) составила 6 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 3-19), pM1 (n=5) – 13 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 4-15). Статистических различий также не установлено (p=0,621).

При сравнении по стадиям клинической классификации ENSAT было выявлено, что опухоли со стадией I (n=10) имели медиану экспрессии маркера 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 0-13), II (n=31) – 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-10), III (n=24) – 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-3), IV (n=6) – 7 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 5-9). В строме опухоли данные показатели были следующие: при стадии I (n=10) – 5 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-10), II (n=28) – 11 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 4-39), III (n=23) – 5 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 3-9), IV (n=5) – 13 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 4-15). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса статистически значимые различия в данных группах не отмечались (p=0,758 и p=0,285, соответственно).

При анализе статуса гормональной активности опухоли и количества CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли медиана при гиперкортицизме (n=20) 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 0-4), при неактивной (n=37) опухоли 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-6), при опухолях со смешанной гормональной активностью (гиперкортицизм сочетался с гиперандрогенией) (n=3) – 8, 9 и 33 клеток/мм².

При оценке зависимости статуса гормональной активности опухоли и количества CD4+ иммунных клеток в паренхиме новообразования медиана при гиперкортицизме (n=20) составила 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 0-4), при неактивной (n=37) опухоли 2 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 1-6), при опухолях со смешанной гормональной активностью – 8, 9 и 33 клетки/мм². Согласно критерию Краскелла-Уоллиса количество CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли было выше в группе пациентов со смешанной гормональной активностью по сравнению с группой пациентов с

гиперкортицизмом на уровне статистической тенденции ($p=0,049$). В строме опухоли медиана при гиперкортицизме ($n=18$) составила 4 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 2-13), при неактивной ($n=35$) опухоли 8 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 4-20), при опухолях со смешанной гормональной активностью (гиперкортицизм сочетался с гиперандрогенией) ($n=3$) – 17, 67 и 157 клеток/ мм^2 . Согласно критерию Краскелла-Уоллиса в данных группах в паренхиме и строме опухоли $p=0,042$ и $p=0,031$, соответственно. При апостериорных сравнениях было установлено, что уровни CD4+ иммунной инфильтрации в паренхиме и строме опухоли были выше в группе пациентов со смешанной гормональной активностью по сравнению с группой пациентов с гиперкортицизмом на уровне статистической тенденции ($p=0,049$ и $p=0,028$ в паренхиме и строме, соответственно).

Таким образом, было исследовано 73 образца АКР, среднее количество CD4+ иммунных клеток в паренхиме ($n=71$) и строме ($n=67$) исследуемых образцов опухоли составило 7 и 18 клеток/ мм^2 соответственно.

Значимого влияния возраста, пола и размера новообразования на количество CD4+ иммунных клеток как в паренхиме, так и строме опухоли не отмечалось.

При анализе экспрессии CD4+ клеток в различных гистологических подтипах АКР были выявлены статистически значимые различия только в паренхиме опухоли ($p=0,002$). При попарном сравнении было установлено, что данные различия обусловлены более выраженной CD4+ иммунной инфильтрацией в онкоцитарном подтипе АКР по сравнению с классическим ($p<0.001$).

Связь экспрессии CD4 с другими клинико-морфологическими параметрами, такими как стадии опухолевого процесса по классификации TNM, стадия АКР по клинической классификации ENSAT. В то же время при оценке количества CD4+ иммунных клеток было установлено, что в группе пациентов со смешанной гормональной активностью по сравнению с группой пациентов с гиперкортицизмом на уровне статистической тенденции отмечается более выраженная иммунная инфильтрация как в паренхиме ($p=0,049$), так и в строме опухоли ($p=0,028$).

3.2.4. Анализ экспрессии маркера CD8

Анализ экспрессии маркера CD8 цитотоксических Т-лимфоцитов был выполнен на 72 образцах операционного материала АКР. В паренхиме и строме опухолевой ткани для подсчета

окрашенных клеток было выбрано 5 полей зрения по 0,05 мм² (общая площадь – 0,25 мм²), после чего полученное количество клеток суммировали.

Рисунки 3.30-3.35 демонстрируют результаты ИГХ реакций с антителом к CD8 в паренхиме и строме исследованных образцов опухоли.

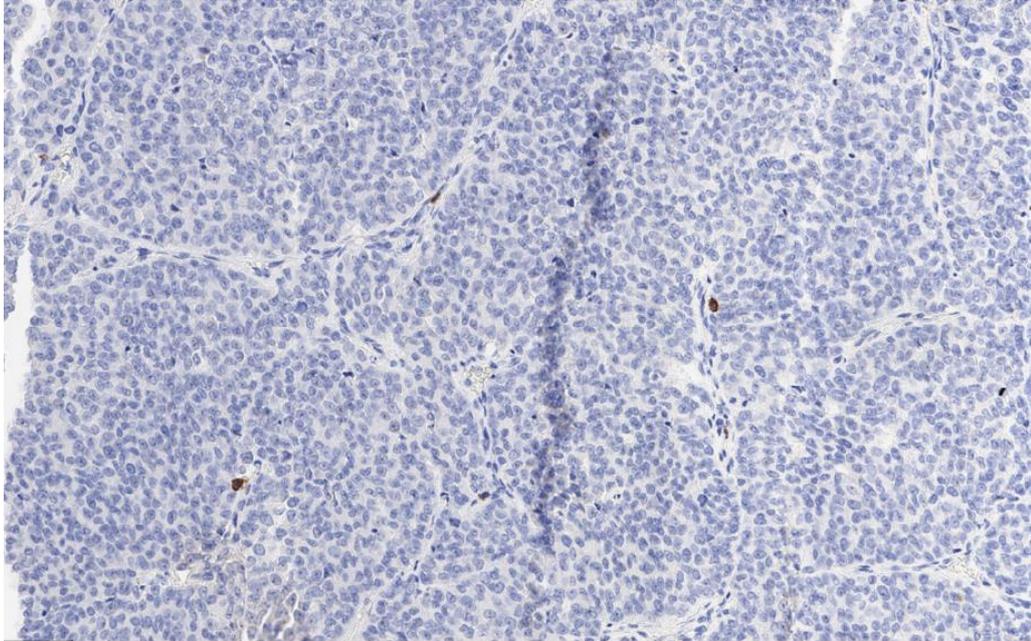


Рисунок 3.30 – Классический подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD8. Увеличение x100

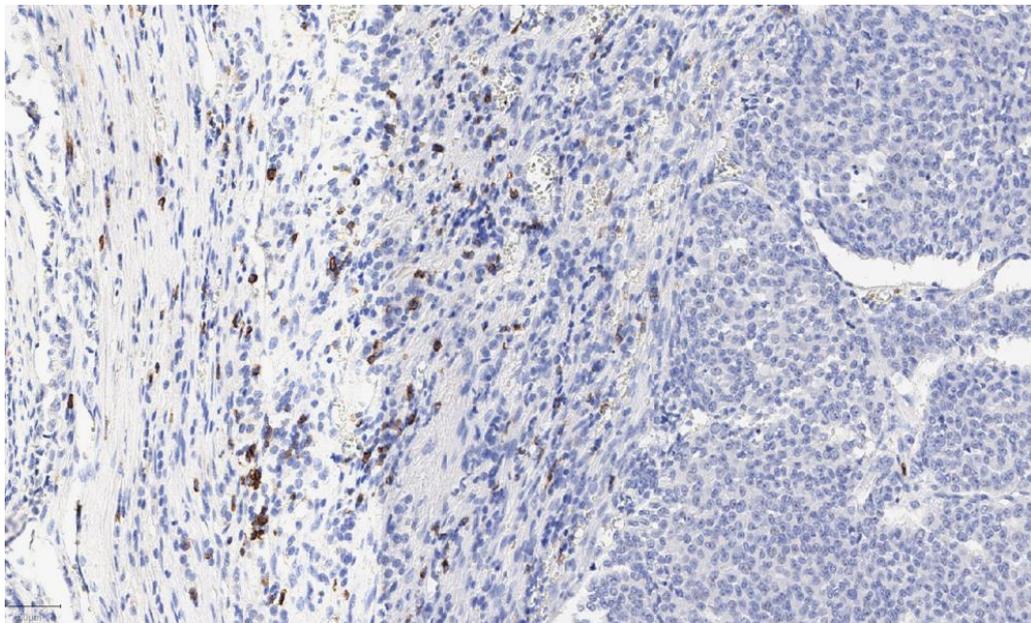


Рисунок 3.31 – Классический подтип адренокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD8. Увеличение x100

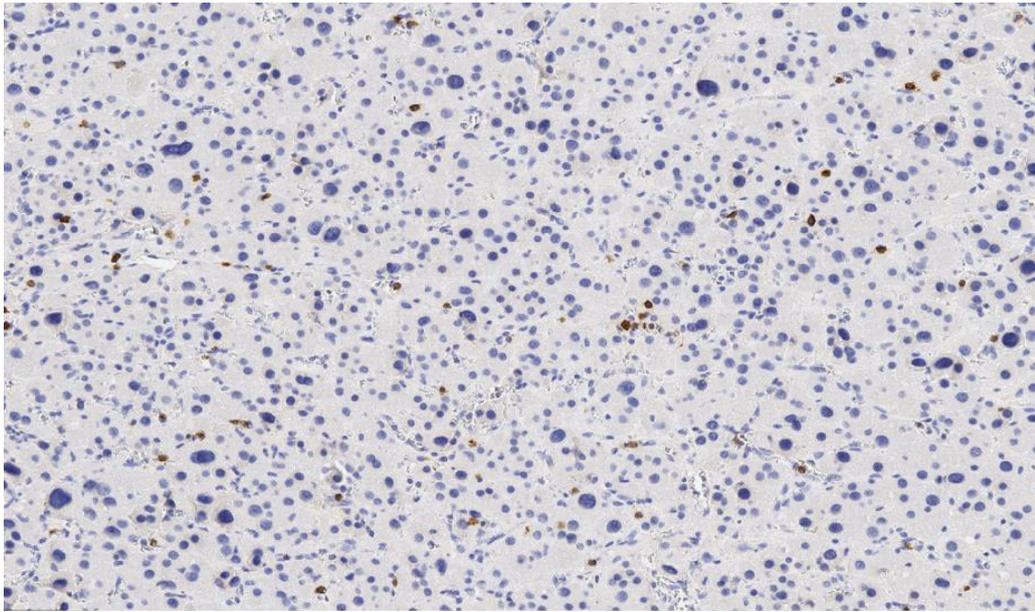


Рисунок 3.32 – Онкоцитарный подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD8. Увеличение x100

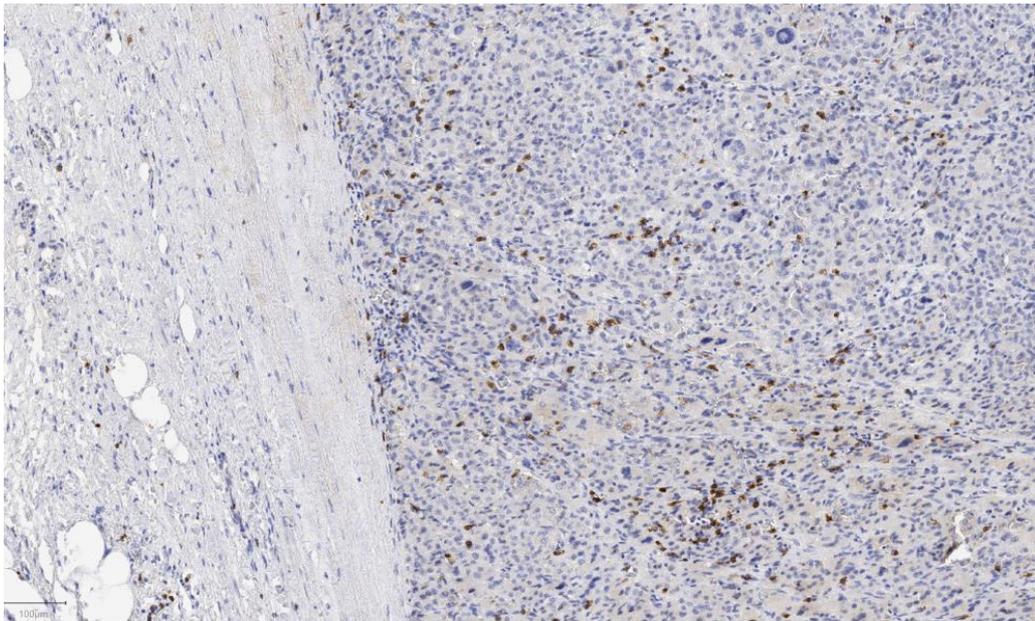


Рисунок 3.33 – Онкоцитарный подтип адренокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD8. Увеличение x100

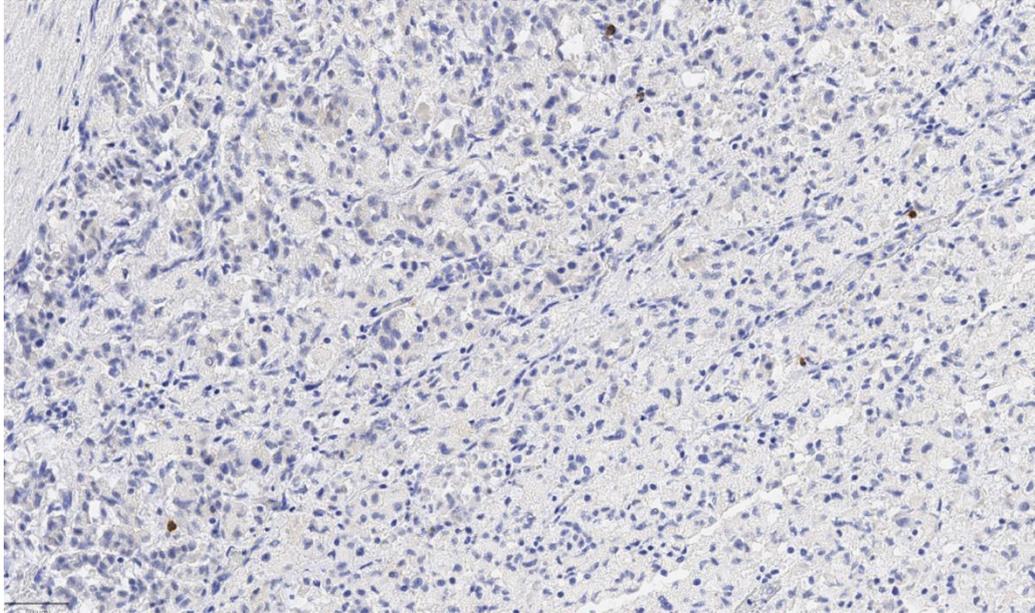


Рисунок 3.34 – Миксоидный подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD8. Увеличение x100

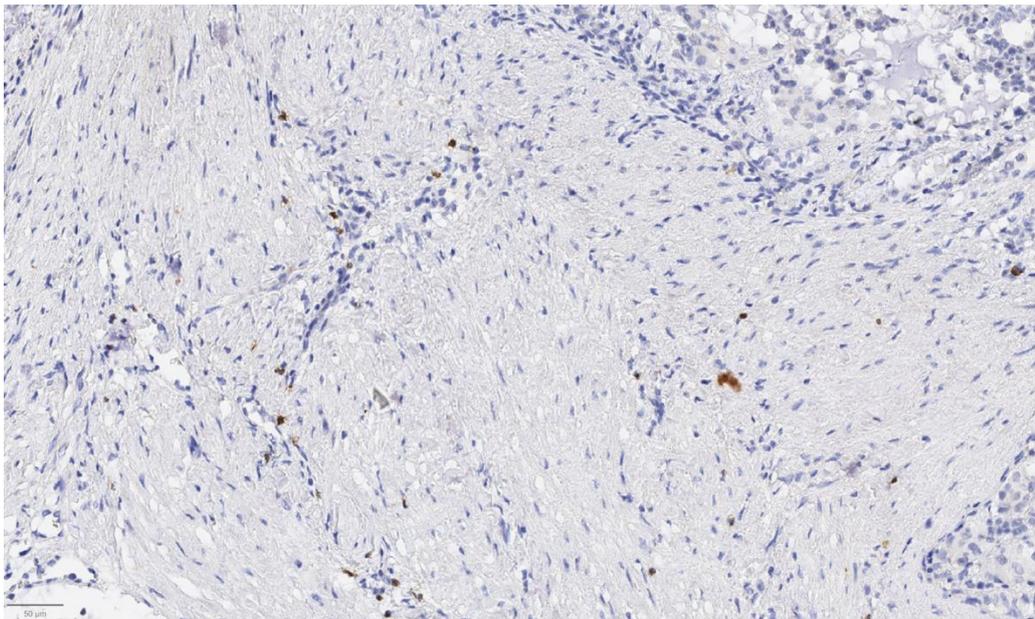


Рисунок 3.35 – Миксоидный подтип адренокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD8. Увеличение x100

Среднее количество CD8⁺ иммунных клеток в паренхиме (n=72) и строме (n=67) в исследуемых образцах обсуждаемого заболевания составило 34 и 53 клеток/мм², соответственно. Медиана значений в паренхиме составила 9 клеток/мм² (Q₁-Q₃:5-26), в строме 29 клеток/мм² (Q₁-Q₃:15-62).

При анализе распределения по полу пациентов было выявлено, что медиана количества CD3⁺ клеток в паренхиме опухоли у женщин (n=50) составляет 9 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 5-26), а у мужчин (n=22) – 10 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 3-25). Медиана количества CD3⁺ клеток в строме опухоли

у женщин ($n=47$) и мужчин ($n=20$) составила 28 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 13-64) и 42 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 24-61), соответственно. По критерию Манна-Уитни статистически значимых различий по полу как в паренхиме, так и в строме опухоли обнаружено не было ($p=0,640$ и $p=0,255$, соответственно).

При использовании метода Спирмена установлено, что статистически значимые корреляции по возрасту как в паренхиме ($p=0,331$), так и в строме ($p=0,273$) опухоли отсутствуют. Далее был выполнен статистический анализ связи экспрессии маркера CD8 в опухоли с доступными клиническими и морфологическими характеристиками пациентов.

Размер новообразования также не имел статистически значимого влияния на уровень CD8+ иммунной инфильтрации как в паренхиме ($p=0,273$), так и в строме ($p=0,994$) новообразования.

На Рисунках 3.36 и 3.37 представлены диаграммы размаха распределения CD8+ иммунных клеток по гистологическим подтипам АКР. В паренхиме ($n=37$) опухоли классического подтипа АКР медиана клеток составила 6 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 9-21), в строме ($n=34$) опухоли – 24 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 13-60). Значения медиан количества клеток в образцах опухоли и группы онкоцитарного подтипа было значительно выше. В паренхиме ($n=18$) медиана составила 28 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 15-89), в строме ($n=16$) – 47 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 27-95). В группах с миксоидным и смешанным подтипом АКР CD3+ инфильтрация также была сравнительно ниже, чем в классических и онкоцитарных подтипах обсуждаемого заболевания. В миксоидном подтипе медиана экспрессии маркера CD8 в паренхиме ($n=9$) и строме ($n=8$) составила 8 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 2-22) и 45 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 9-61), соответственно. В группе со смешанными опухолями медиана в паренхиме ($n=8$) опухоли составила 7 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 5-11), в строме ($n=8$) – 32 клеток/ мм^2 (Q_1 - Q_3 : 24-53). Для оценки значимости полученных результатов был использован критерий Краскелла-Уоллиса, согласно которому статистически значимые различия были отмечены только в паренхиме опухоли ($p=0,004$), в то время как количество CD8+ иммунных клеток в строме опухоли значимых различий не демонстрировало ($p=0,271$). Апостериорные сравнения показали статистически значимую разницу только между группами с классическим и онкоцитарным подтипом АКР ($p=0,003$).

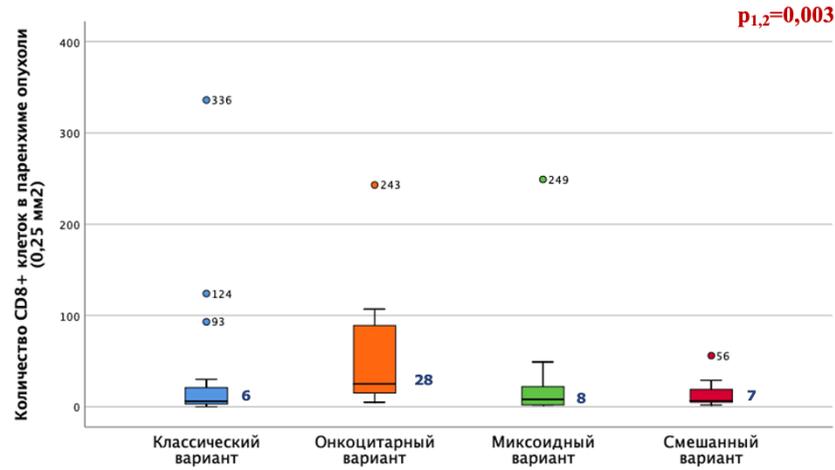


Рисунок 3.36 – Распределение CD8+ клеток в паренхиме опухоли в зависимости от гистологического подтипа АКР

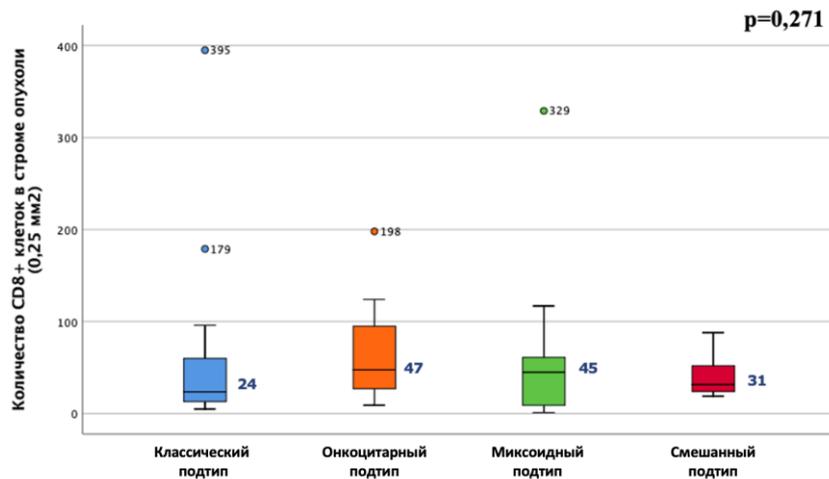


Рисунок 3.37 – Распределение CD8+ клеток в строме опухоли в зависимости от гистологического подтипа АКР

При анализе групп по распространенности опухоли было выявлено, что новообразования на стадиях pT1 (n= 10) в паренхиме опухоли имели медиану экспрессии CD8 12 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 8-54), pT2 (n=32) – 9 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 4-25), pT3 (n=18) – 17 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 7-29), pT4 (n=10) – 4 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 2-7). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса группы статистически значимо не различались (p=0,076). Экспрессия маркера CD8 в строме опухоли была следующая: при стадии pT1 (n=9) – 25 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-42), pT2 (n=29) – 41 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 23-62), pT3 (n=17) – 42 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 23-76), pT4 (n=10) – 19 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 10-33). Значимых различий также не обнаружено (p=0,150).

При анализе количества иммунцитов по наличию признаков метастатического поражения лимфатических узлов было выявлено, что АКР со стадией pN0 (n=68) в паренхиме опухоли имели медиану экспрессии маркера CD8 9 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 5-26), на стадии pN1 было выявлено только два образца опухоли – 249 и 14 клеток/мм². В строме опухоли на стадии pN0

(n=63) медиана количества CD8+ иммунных клеток составила 29 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 14-62), на стадии pN1 (n=2) – 329 и 42 клеток/мм².

Новообразования со стадией pM0 (n=65) в паренхиме имели медиану экспрессии маркера CD8 на уровне 9 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 5-26), со стадией pM1 (n=5) – 14 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 6-26). В строме опухоли при стадии pM0 (n=60) медиана количества CD8+ иммунных клеток составила 29 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 15-61), при стадии pM1 (n=5) – 65 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 18-79). Для оценки статистической значимости полученных данных использовался критерий Манна-Уитни, согласно которому значимых различий как в паренхиме (p=0,450) так и строме (p=0,251) обнаружено не было.

При анализе групп по стадиям классификации ENSAT было выявлено, что опухоли со стадией I (n=10) имели медиану экспрессии маркера 12 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 8-54), II (n=31) – 9 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 3-24), III (n=24) – 11 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 3-26), IV (n=5) – 14 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 6-26). В строме опухоли экспрессия CD8 маркера на стадии I (n=9) составила 25 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-42), II (n=28) – 36 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 19-62), III (n=23) – 28 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 16-54), IV (n=5) – 65 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 18-179). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса статистически значимые различия в данных группах как в паренхиме так и строме опухоли не отмечались (p=0,635 и p=0,465, соответственно).

При анализе статуса гормональной активности опухоли и количества CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли медиана при гиперкортицизме (n=19) составила 8 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 5-25), при неактивной (n=37) опухоли 9 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 2-26). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса статистически значимых различий в данных группах не выявлено (p=0,373). В строме опухоли медиана при гиперкортицизме (n=18) составила 24 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 14-41), при неактивной (n=34) опухоли 35 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 13-60). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса статистически значимых различий в данных группах также не выявлено (p=0,092).

Таким образом, было исследовано 72 образца опухоли, среднее количество CD8+ иммунных клеток в паренхиме (n=72) и строме (n=67) исследуемых образцов АКР составило 34 и 53 клеток/мм², соответственно.

При анализе распределения по полу, возрасту и размеру образования статистически значимых различий как в паренхиме, так и строме опухоли выявлено не было.

При анализе экспрессии CD8 в различных гистологических подтипах АКР статистически значимые различия были отмечены только в паренхиме опухоли (p=0,004), в то время как в строме опухоли различия были не достоверными (p=0,271), при попарном анализе было установлено, что данные различия также обусловлены более выраженной CD8+ иммунной инфильтрацией в паренхиме онкоцитарного гистологического подтипа АКР в сравнении с классическим подтипом (p=0,003).

При оценке связи экспрессии CD8 с другими клинико-морфологическими параметрами, такими как стадии заболевания по классификации TNM, стадия АКР по классификации ENSAT, а также гормональная активность опухоли, статистически значимых различий как в паренхиме, так и строме опухоли выявлено не было.

3.2.5. Анализ экспрессии маркера CD68

Анализ экспрессии маркера CD68 был выполнен на 60 образцах операционного материала рака коры надпочечников. Во всех наблюдениях была выявлена положительная иммуногистохимическая реакция. Отдельно в паренхиме и отдельно в строме опухолевой ткани было выбрано по 5 полей зрения размерами по 0,05 мм² (общая площадь – 0,25 мм²). В каждом поле зрения проводился подсчет позитивно окрашенных клеток, после чего полученные числа суммировали.

Рисунки 3.38-3.43 демонстрируют результаты ИГХ реакций с антителом к CD68 в паренхиме и строме опухоли.

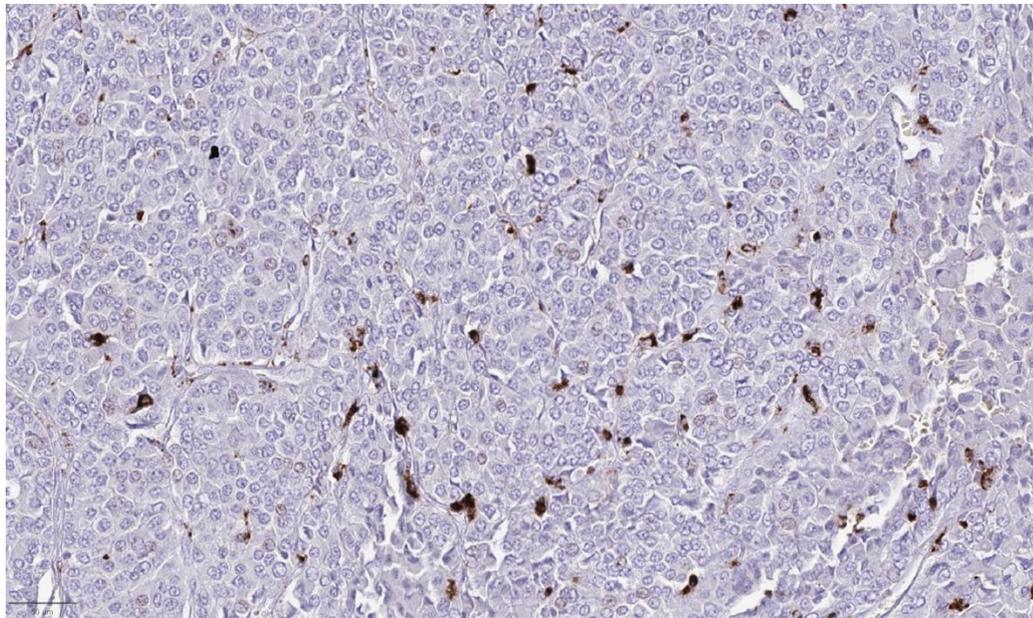


Рисунок 3.38 – Классический подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD68. Увеличение x100

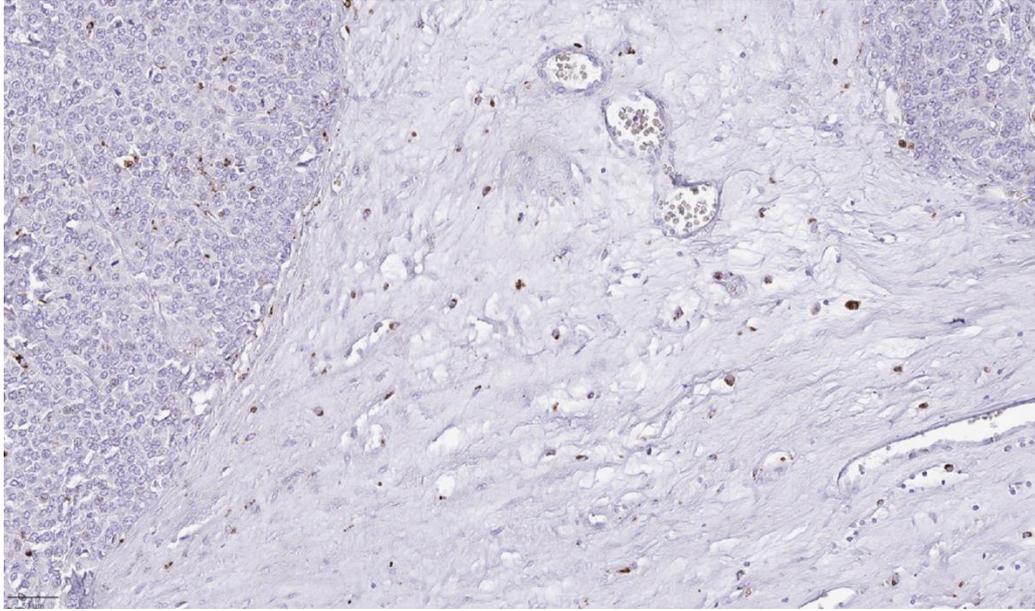


Рисунок 3.39 – Классический подтип адренокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD68. Увеличение x100

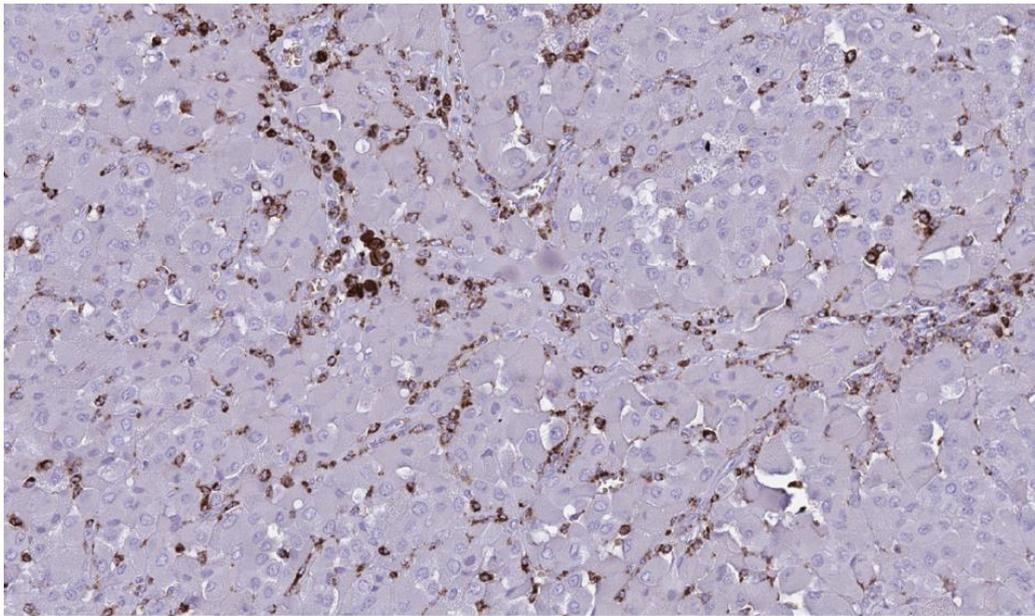


Рисунок 3.40 – Онкоцитарный подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD68. Увеличение x100

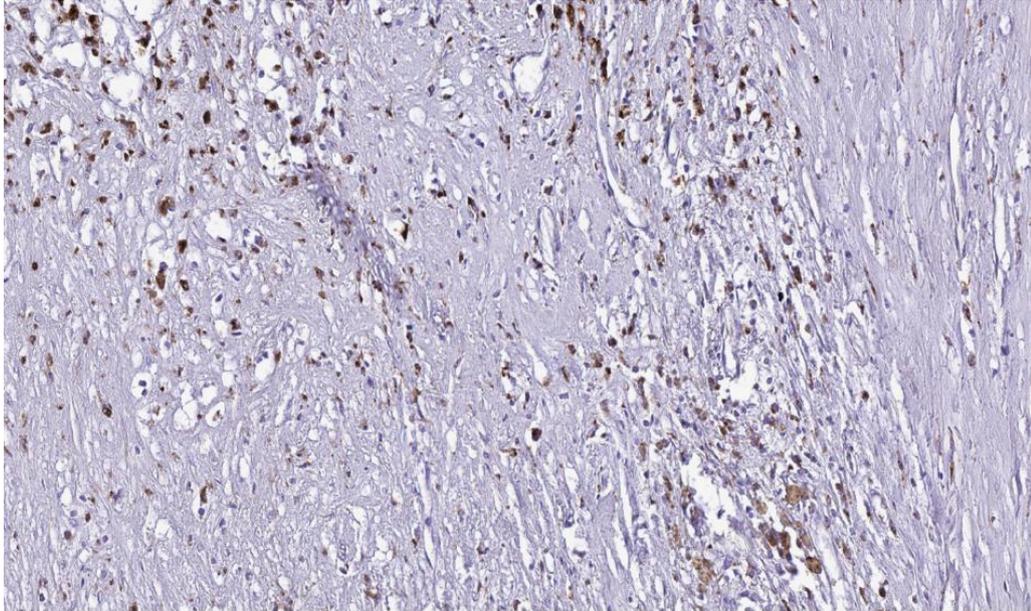


Рисунок 3.41 – Онкоцитарный подтип адренокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD68. Увеличение x100

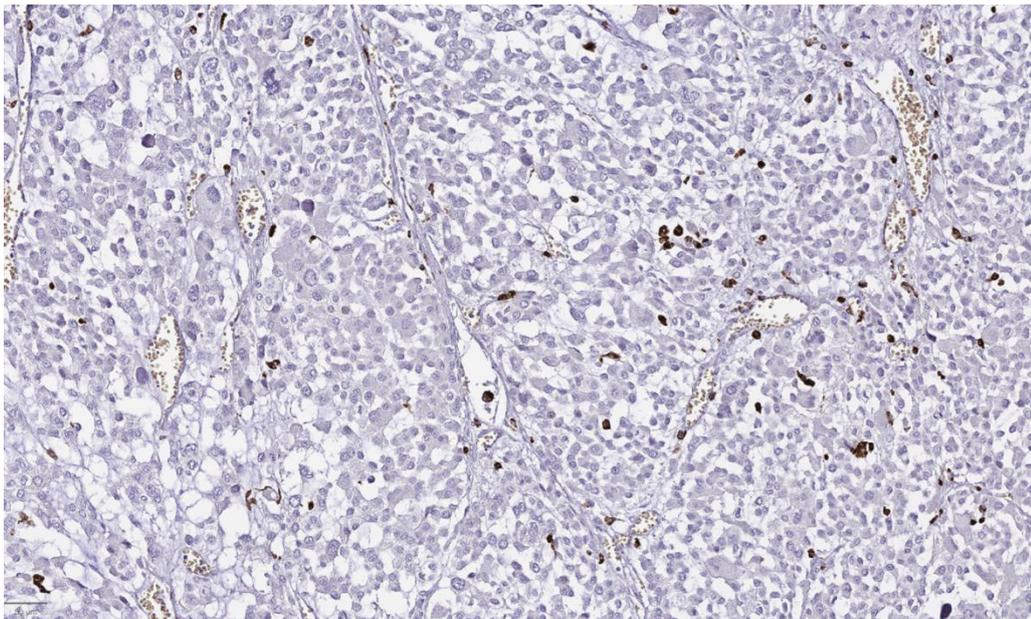


Рисунок 3.42 – Миксоидный подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD68. Увеличение x100

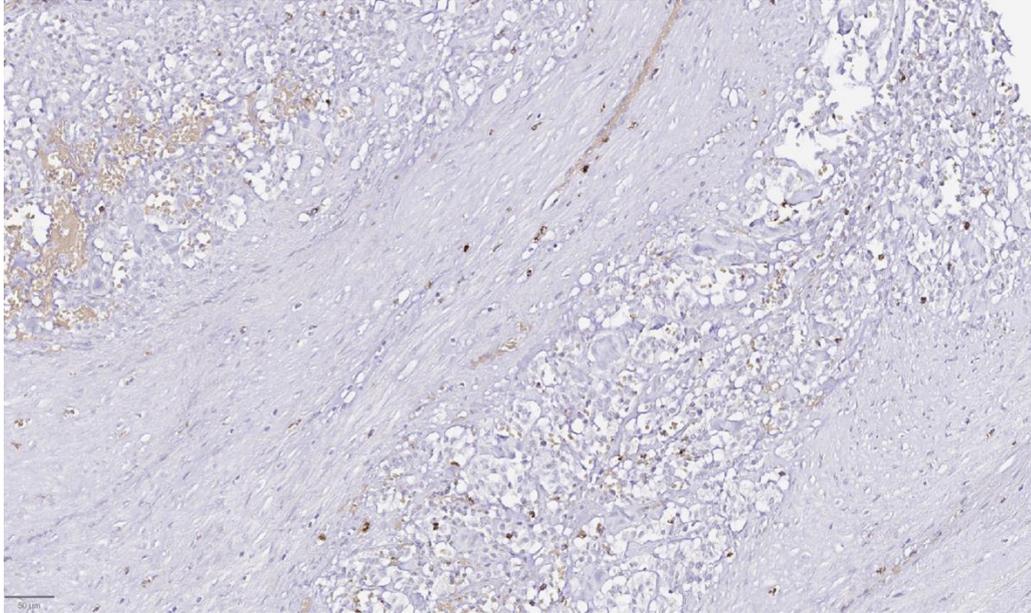


Рисунок 3.43 – Миксоидный подтип аденокортикального рака. Строма опухоли. ИГХ реакция с антителом к CD68. Увеличение x80

Среднее количество CD68+ иммунных клеток в паренхиме (n=60) и строме (n=45) в исследуемых образцах АКР составило 109 и 114 клеток/мм², соответственно. Медиана значений в паренхиме составила 54 клеток/мм² (Q₁-Q₃:12-182), в строме – 68 клеток/мм² (Q₁-Q₃:10-179).

При анализе распределения по полу пациентов было выявлено, что медиана количества CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли у женщин (n=42) составляет 36 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 6-186), а у мужчин (n=18) – 99 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 35-178). Медиана количества CD68+ иммунных клеток в строме опухоли у женщин (n=33) и мужчин (n=12) составила 77 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-165) и 59 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 11-242), соответственно. По критерию Манна-Уитни статистически значимых различий по полу как в паренхиме так и строме опухоли обнаружено не было (p=0,238 и p=0,97, соответственно).

При использовании метода Спирмена установлено, что статистически значимые различия по возрасту как в паренхиме (p=0,648) так и в строме (p=0,708) опухоли отсутствуют.

Размер новообразования также не имел статистически значимого влияния на уровень CD68+ иммунной инфильтрации как в паренхиме (p=0,424) так и строме (p=0,987) новообразования.

На Рисунках 3.44 и 3.45 представлены диаграммы размаха распределения CD68+ иммунных клеток по гистологическим подтипам АКР. В паренхиме (n=31) опухоли классического подтипа АКР медиана CD68+ иммунных клеток составила 35 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 16-104), в строме (n=22) опухоли – 79 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 14-168). Медиана количества клеток в паренхиме опухоли онкоцитарного подтипа в сравнении с группой образцов классического подтипа АКР была выше и составила 132 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 35-244), в то же время, в строме

(n=11) опухоли данной группы значения были сравнительно ниже – 129 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 17-288). В миксоидном подтипе медиана экспрессии маркера CD68 в паренхиме (n=9) и строме (n=8) составила 111 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 79-191) и 87 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 27-147), соответственно. В группе со смешанными опухолями медиана в паренхиме (n=7) опухоли составила 4 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 2-250), количество клеток в строме было подсчитано лишь в четырех образцах опухолей – 2, 5, 8, 16 клеток/мм². Для оценки значимости полученных результатов был использован критерий Краскелла-Уоллиса, согласно которому статистически значимые различия не были установлены ни в паренхиме (p=0,205) ни в строме опухолей (p=0,157).

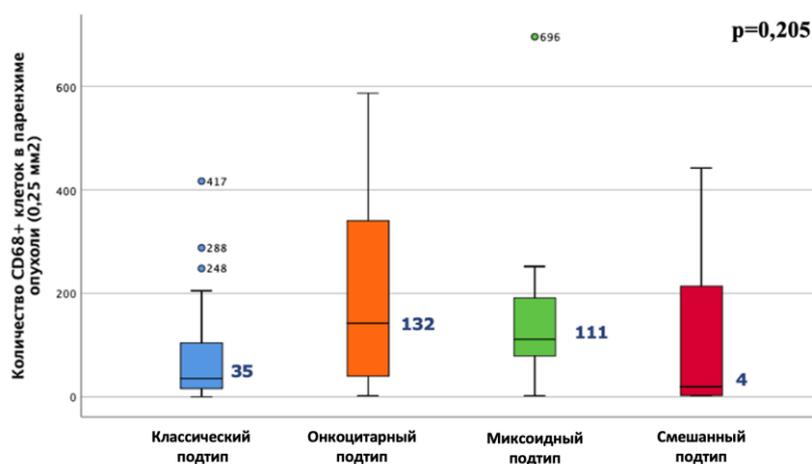


Рисунок 3.44 – Распределение CD68+ клеток в паренхиме опухоли в зависимости от гистологического подтипа АКР

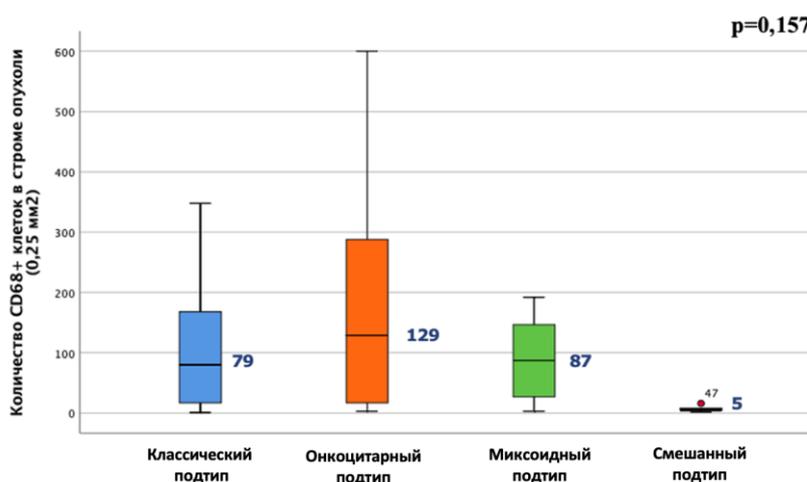


Рисунок 3.45 – Распределение CD68+ клеток в строме опухоли в зависимости от гистологического подтипа АКР

При анализе групп по распространенности опухоли было выявлено, что новообразования на стадией pT1 (n= 9) в паренхиме опухоли имели медиану экспрессии CD68 104 клеток/мм² (Q₁-

Q₃: 4-186), pT₂ (n=25) – 37 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 6-106), pT₃ (n=14) – 36 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 16-244), pT₄ (n=10) – 67 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 6-178). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса статистически значимых различий установлено не было (p=0,865). Экспрессия маркера CD68 в строме опухоли была следующая: при стадии pT₁ (n=8) – 104 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 11-192), pT₂ (n=18) – 74 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 8-162), pT₃ (n=10) – 31 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 6-288), pT₄ (n=7) – 68 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 16-108). Значимых различий также не обнаружено (p=0,969).

Также был выполнен анализ групп по наличию признаков метастатического поражения регионарных лимфатических узлов, по результатам данного анализа было выявлено, что АКР со стадией pN₀ (n=56) в паренхиме опухоли имели медиану экспрессии маркера CD68 54 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 12-182), на стадии pN₁ было выявлено только два образца опухоли – 2 и 5 клеток/мм². В строме опухоли на стадии pN₀ (n=41) медиана CD68+ клеток составила 72 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-168), на стадии pN₁ (n=2) – 12 и 6 клеток/мм².

Новообразования со стадией pM₀ (n=52), то есть без признаков отдаленного метастазирования, в паренхиме имели медиану экспрессии маркера CD68 на уровне 72 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 12-189), со стадией pM₁ (n=6) – 16 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 2-18) (Рисунок 3.46). В строме опухоли при стадии pM₀ (n=38) медиана CD68+ клеток составила 75 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 9-191), при стадии pM₁ (n=5) – 12 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 2-17). Для оценки статистической значимости полученных данных использовался критерия Манна-Уитни, согласно которому в группе с отсутствием отдаленных метастазов наблюдался более высокий уровень CD68+ иммунной инфильтрации в паренхиме опухоли на уровне статистической значимости (p=0,009). Однако в строме опухоли значимых корреляций обнаружено не было (p=0,085).

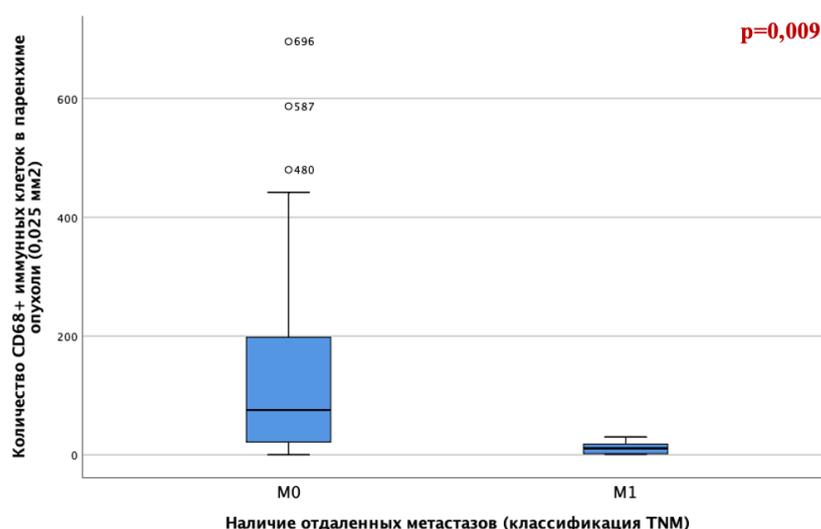


Рисунок 3.46 – Распределение CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли в зависимости от наличия отдаленных метастазов по классификации TNM

При анализе групп по стадиям классификации ENSAT было выявлено, что опухоли со стадией I (n=9) имели медиану экспрессии маркера CD68 104 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 4-186), II (n=24) – 39 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 5-119), III (n=19) – 111 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 35-250), IV (n=6) – 16 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 2-18). В строме опухоли экспрессия CD68 на стадии I (n=8) составила 104 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 11-192), II (n=17) – 67 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 8-147), III (n=19) – 111 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 35-250), IV (n=6) – 12 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 2-17). Согласно критерию Краскелла-Уоллиса статистически значимые различия в данных группах как в паренхиме так и строме опухоли не отмечались (p=0,033 и p=0,214, соответственно).

При анализе статуса гормональной активности опухоли и количества CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли медиана при гиперкортицизме (n=17) составила 32 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 3-106), при неактивной (n=32) опухоли 76 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 29-164). Для оценки статистической значимости полученных данных в строме опухоли использовался критерия Манна-Уитни, согласно которому различия были не достоверными (p=0,302). В строме опухоли медиана при гиперкортицизме (n=14) составила 70 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 3-162), при неактивной опухоли (n=21) – 67 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 14-131). Согласно критерию Манна-Уитни статистически значимых различий в данных группах также не выявлено (p=0,844).

Таким образом, было исследовано 60 образцов опухоли, положительная иммуногистохимическая реакция с маркером CD68 наблюдалась во всех случаях. Среднее количество CD68+ клеток в паренхиме и строме опухоли составило 109 и 114 клеток/мм², соответственно.

При анализе распределения CD68+ клеток по полу достоверные различия отсутствовали. Также возраст и размер новообразования не оказали значимого влияния на уровень CD68+ иммунной инфильтрации. Несмотря на некоторые колебания в значениях медианы экспрессии маркера CD68 между разными гистологическими подтипом, статистически значимых различий как в паренхиме (p=0,205), так и в строме (p=0,157) опухоли также установлено не было.

При изучении связи экспрессии CD68 с распространенностью опухоли и наличием региональных метастазов в лимфатические узлы (по классификации TNM), стадией АКР по классификации ENSAT, а также гормональной активностью опухоли, значимых различий также не выявлено. При этом, при анализе опухолей по наличию отдаленных метастазов было выявлено, что в образцах опухолевой ткани, полученных от пациентов с отсутствием отдаленных метастазов наблюдается более высокий уровень CD68+ иммунной инфильтрации в паренхиме опухоли на уровне статистической значимости (p=0,009), однако в строме опухоли значимых корреляций обнаружено не было (p=0,085).

3.3. Анализ экспрессии PD-L1 в аденокортикальном раке

На данном этапе исследования был проведен анализ 73 образцов АКР. В 5 образцах (6,8%) отмечалась экспрессия маркера PD-L1, в то время как в остальных 68 образцах (93,2%) образцы опухолевой ткани имели негативный PD-L1-статус. При этом важно отметить, что позитивное окрашивание на маркер PD-L1 было выявлено как в опухоль-инфильтрирующих иммунных клетках, так и на самих опухолевых клетках (Рисунок 3.47).

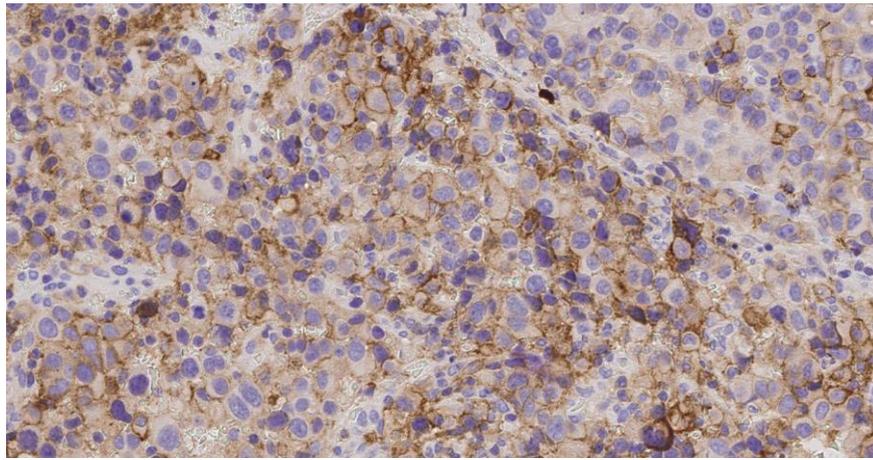


Рисунок 3.47 – Классический подтип аденокортикального рака. ИГХ реакция с антителом к PD-L1. Увеличение x100

На Рисунке 3.48 представлена диаграмма распределения экспрессии PD-L1 в зависимости от обсуждаемых гистологических подтипов АКР. Среди позитивных образцов к классическому гистологическому подтипу были отнесены 40% случаев (n=2), к миксоидному – 20,0% (n=1) и к смешанному гистологическому подтипу АКР – 40% образцах (n=2) АКР. В онкоцитарном гистологическом подтипе PD-L1+ образцов отмечено не было. Таким образом, позитивный PD-L1-статус имели 5,5% проанализированных образцов (2 из 38) классического подтипа АКР, 5,3%, 11,1% (1 из 9) – миксоидного и 25,0% образцов (2 из 9) смешанного подтипа АКР.

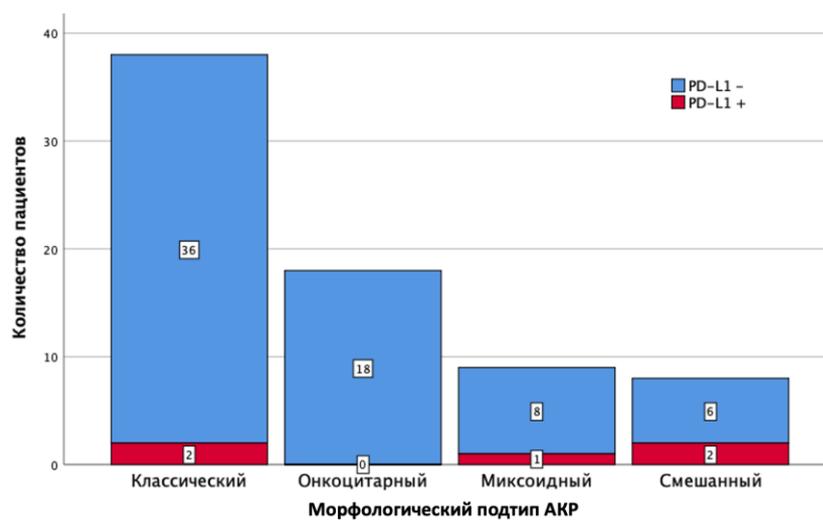


Рисунок 3.48 – Распределение PD-L1-статуса в зависимости от гистологического подтипа АКР

Также был выполнен статистический анализ оценивали связи экспрессии PD-L1 с клинико-морфологическими параметрами опухоли, результаты анализа приведены в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Анализ клинико-морфологических характеристик пациентов в зависимости от экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани

Клинико-морфологические характеристики	PD-L1+		PD-L1-		p
	Абс.	%	Абс.	%	
CD45+ иммунный инфильтрат в паренхиме опухоли	5	93,0	66	7,0	0,125
выше медианы (>66 клеток/мм ²)	2	5,7	33	94,3	
ниже медианы (≤66 клеток/мм ²)	3	91,7	33	8,3	
CD45+ иммунный инфильтрат в строме опухоли	4	6,2	61	93,8	0,355
выше медианы (>132 клеток/мм ²)	3	9,4	29	90,6	
ниже медианы (≤132 клеток/мм ²)	1	3,0	32	97,0	
CD3+ иммунный инфильтрат в паренхиме опухоли	5	6,8	68	93,2	0,666
выше медианы (>26 клеток/мм ²)	2	5,3	36	94,7	
ниже медианы (≤26 клеток/мм ²)	3	8,6	32	91,4	
CD3+ иммунный инфильтрат в строме опухоли	4	6,2	61	93,8	0,165
выше медианы (>62 клеток/мм ²)	2	6,1	31	93,9	
ниже медианы (≤62 клеток/мм ²)	2	6,3	30	93,8	
CD4+ иммунный инфильтрат в паренхиме опухоли	5	7,0	66	93,0	0,656
выше медианы (>2 клеток/мм ²)	3	6,3	45	93,8	
ниже медианы (≤2 клеток/мм ²)	2	8,7	21	91,3	
CD4+ иммунный инфильтрат в строме опухоли	4	5,9	64	94,1	0,614
выше медианы (>7 клеток/мм ²)	1	2,9	33	97,1	
ниже медианы (≤7 клеток/мм ²)	3	8,8	31	91,2	
CD8+ иммунный инфильтрат в паренхиме опухоли	4	5,6	68	94,4	0,178
выше медианы (>9 клеток/мм ²)	2	5,3	36	94,7	
ниже медианы (≤9 клеток/мм ²)	2	5,9	32	94,1	
CD8+ иммунный инфильтрат в строме опухоли	4	6,0	63	94,0	0,615
выше медианы (>29 клеток/мм ²)	3	8,6	32	91,4	
ниже медианы (≤29 клеток/мм ²)	1	3,1	31	96,9	
CD68+ иммунный инфильтрат в паренхиме опухоли	5	8,5	54	91,5	0,049*
выше медианы (>54 клеток/мм ²)	0	0	30	100,0	
ниже медианы (≤68 клеток/мм ²)	5	17,2	24	82,8	
CD68+ иммунный инфильтрат в строме опухоли	3	6,8	41	93,2	0,1
выше медианы (>70 клеток/мм ²)	0	0	23	100,0	
ниже медианы (≤70 клеток/мм ²)	3	14,3	18	85,7	
Метастазы в регионарные лимфоузлы (N):	5	7,0	66	93,0	0,137
N0	4	5,8	65	94,2	
N1	1	50,0	1	50,0	
Отдаленные метастазы (M):	5	7,0	66	93,0	0,051
M0	3	4,6	62	95,4	
M1	2	33,3	4	66,7	

Примечание: * - различия показателей статистически значимы (p<0,05)

Для сравнения PD-L1-позитивных и PD-L1-негативных образцов опухолевой ткани по количеству CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли использовался критерия Манна-

Уитни, согласно которому были установлены статистически значимые различия ($p=0,008$). Медиана CD68+ иммунных клеток в образцах опухоли с положительной экспрессией PD-L составила 3 клеток/мм² (Q₁-Q₃: 2-6), в то время как в PD-L-негативных образцах – 72 клетки/мм² (Q₁-Q₃: 23-189). Согласно точному критерию Фишера при анализе PD-L1-положительных и PD-L1-негативных образцов АКР по количеству CD68+ иммунных клеток в паренхиме выше/ниже медианного значения также были установлены статистически значимые различия ($p=0,049$). Между сопоставляемыми признаками отмечалась относительно сильная связь ($V=0,409$).

Таким образом, в ходе данного этапа исследования было установлено, что 6,8% образцах аденокарциномы желудка отмечается положительная экспрессия PD-L1, в данных образцах также была отмечена менее выраженная CD68+ инфильтрация по сравнению с образцами опухоли, в которых экспрессия маркера PD-L1 не была обнаружена ($p=0,008$).

ГЛАВА 4. ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИММУННОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОМ РАКЕ

4.1. Влияние иммунного микроокружения на общую выживаемость пациентов с аденокортикальным раком

4.1.1. Общая выживаемость пациентов с аденокортикальным раком в зависимости от различных морфологических подтипов

Выполнен анализ общей выживаемости (ОВ) 73 пациентов с различными морфологическими подтипами АКР. Для анализа был использован метод Каплана-Мейера, для сравнения выживаемости двух групп – логарифмический ранговый тест.

Медиана времени наблюдения за пациентами составила 34 мес (от 4 до 205 мес).

Среди исследуемой популяции классический подтип АКР был установлен в 52,1% случаев (n=38), онкоцитарный – в 24,7% (n=18), миксоидный – 12,3% (n=9). В 11% случаев (n=8) был диагностирован смешанный подтип опухоли, 6 случаев из которого были представлены сочетанием классического и онкоцитарного подтипов и 2 случая – сочетанием классического и миксоидного.

Для оценки ОВ пациентов с различными морфологическими подтипами АКР на различных сроках наблюдения от начала лечения была построена Таблица 4.1.

Таблица 4.1 – ОВ пациентов с учетом различных морфологических подтипов АКР

Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск смерти, %		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
Классический подтип АКР (n=38)				
12	33	3	8,2	91,8
24	24	9	25,7	74,3
36	15	10	52,0	48,0
48	6	10	52,0	48,0
60	5	10	52,0	48,0
Онкоцитарный подтип АКР (n=18)				
12	15	0	0	100,0
24	13	0	0	100,0
36	11	0	0	100,0
48	7	0	0	100,0
60	5	0	0	100,0
Миксоидный подтип АКР (n=9)				
12	8	0	0	100,0
24	6	0	0	100,0
36	4	0	0	100,0
48	3	1	25,0	75,0
60	2	0	25,0	75,0
Смешанный подтип АКР (n=8)				
12	8	0	0	100,0
24	5	1	14,3	85,7
36	4	1	14,3	85,7
48	2	1	14,3	85,7
60	1	1	14,3	85,7

С помощью кривых Каплана-Мейера на Рисунке 4.1 были проанализированы значения ОВ с учетом различных гистологических подтипов АКР.

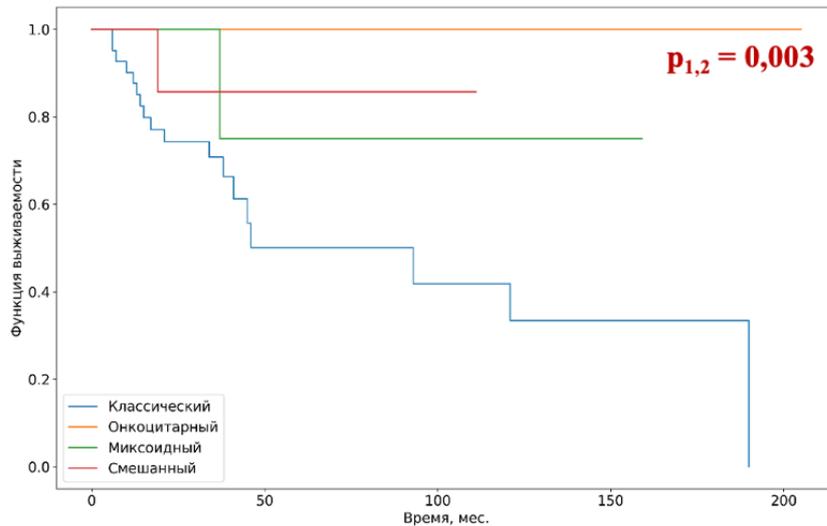


Рисунок 4.1 – Кривые Каплана-Мейера, характеризующие ОВ пациентов с АКР в зависимости от гистологического подтипа

При анализе пятилетней выживаемости было установлено, что пациенты с онкоцитарным подтипом АКР в сравнении с другими группами имели максимальное значение ОВ равное 100%, которое сохранялось на данном уровне в течение всего периода наблюдения, а именно 17,5 лет. У больных с классическим подтипом АКР пятилетняя ОВ была значительно ниже и составляла 45,3%, у больных с миксоидным подтипом – 75,0%, а со смешанным – 84,6%. При оценке влияния гистологического подтипа на ОВ пациентов с АКР с помощью лог-рангового критерия Мантеля-Кокса отмечалось статистически значимое различие ($p=0,008$). При парном сравнении групп были установлены статистически значимые различия ОВ между классическими и онкоцитарными подтипами ($p=0,003$), а также между миксоидным и смешанными подтипами АКР ($p<0,001$).

4.1.2. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от количества CD45+ иммунных клеток

На данном этапе было выявлено, что 5-летняя ОВ пациентов в группе с CD45+ иммунными клетками в паренхиме опухоли выше медианы составляет 87,0%, в то время как выживаемость пациентов с количеством CD45+ иммунных клеток ниже медианы – 46,0% (Таблица 4.2). При статистическом анализе с использованием логарифмического рангового критерия были выявлены значимые различия ($p=0,005$). Следовательно, ОВ пациентов с CD45 положительной инфильтрацией в паренхиме опухоли выше медианного значения (66 клеток/мм²)

было выше, в сравнении с больными при значении данного показателя ниже медианного (Рисунок 4.2А).

Таблица 4.2 – Общая выживаемость пациентов в группах с количеством CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше и ниже медианного значения

Общая выживаемость пациентов с количеством CD45+ клеток в паренхиме опухоли выше медианы (n=35)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск смерти, %		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
12	31	0	6,8	93,2
24	26	2	6,8	93,2
36	19	2	13,0	87,0
48	10	3	13,0	87,0
60	7	3	13,0	87,0
Общая выживаемость пациентов с количеством CD45+ клеток в паренхиме опухоли ниже медианы (n=36)				
12	31	3	25,0	75,0
24	20	8	29,4	70,6
36	13	9	54,0	46,0
48	6	13	54,0	46,0
60	4	13	54,0	46,0

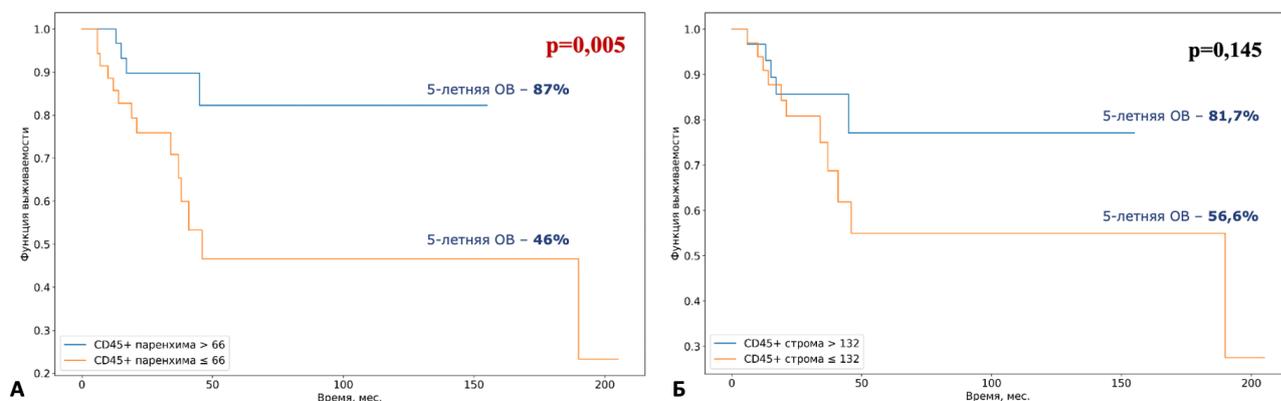


Рисунок 4.2 – Анализ ОВ Каплана-Майера в зависимости от: А – количества CD45+ клеток в паренхиме опухоли; Б – количества CD45+ клеток в строме опухоли

Далее с помощью метода регрессии Кокса было установлено, что при раке коры надпочечников количество положительно окрашенных клеток на CD45 в паренхиме опухолевой ткани является независимым прогностическим признаком (HR=0,2; 95% CI: 0,05-0,69; $p=0,011$) (Таблица 4.3), т.е. при увеличении значения CD45 позитивных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 отмечается снижение риска летального исхода в 5 раз.

Таблица 4.3 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для показателей ОВ и количества CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли	0,2 [0,05-0,69]	0,011

Общая пятилетняя выживаемость больных в группе с CD45+ иммунными клетками в строме опухоли выше медианы составила 81,7%, в то время как выживаемость пациентов с количеством CD45+ иммунных клеток ниже медианы – 56,6% (Таблица 4.4). При статистическом анализе ОВ больных с использованием логарифмического рангового критерия значимых различий не установлено ($p=0,145$) (Рисунок 4.2Б).

Таблица 4.4 – Общая выживаемость пациентов в группах с количеством CD45+ иммунных клеток в строме опухоли выше и ниже медианного значения

Общая выживаемость пациентов с количеством CD45+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (n=35)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск смерти, %		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
12	28	0	11,5	88,5
24	21	3	11,5	88,5
36	17	3	18,3	81,7
48	8	4	18,3	81,7
60	5	4	18,3	81,7
Общая выживаемость пациентов с количеством CD45+ иммунных клеток в строме опухоли ниже медианы (n=36)				
12	30	1	17,3	82,7
24	21	5	22,1	77,9
36	12	6	43,4	56,6
48	7	9	43,4	56,6
60	5	9	43,4	56,6

С помощью метода регрессии Кокса было установлено, что количество CD45+ клеток в строме опухоли не является значимым прогностическим признаком для ОВ пациентов с АКР (HR=1,0; 95% CI: 0,99-1,1; $p=0,157$) (Таблица 4.5).

Таблица 4.5 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для показателей ОВ и количества CD45+ иммунных клеток в строме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD45+ иммунных клеток в строме опухоли	1,0 [0,99-1,01]	0,157

4.1.3. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от количества CD3+ иммунных клеток

Пятилетняя ОВ больных в группе с количеством CD3+ иммунными клетками в паренхиме опухоли выше медианы составила 85,4%, в то время как у пациентов с CD3+ иммунными клетками ниже медианы выживаемость – 49,6% (Таблица 4.6). Проведенный анализ с использованием логарифмического рангового критерия выявил значимые различия, $p=0,013$. Таким образом, ОВ пациентов в группе с CD3+ иммунной инфильтрацией в паренхиме опухолей, превышающей 26 клеток/мм², оказалась значительно выше, чем у пациентов с CD3+ иммунной инфильтрацией в паренхиме опухолей, не превышающей 26 клеток/мм² (Рисунок 4.3А).

Таблица 4.6 – Общая выживаемость пациентов в группах с количеством CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше и ниже медианного значения

Общая выживаемость пациентов с количеством CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше медианы (n=36)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск смерти, %		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
12	33	1	9,0	91,0
24	28	3	9,0	91,0
36	19	3	14,6	85,4
48	12	4	14,6	85,4
60	9	4	14,6	85,4
Общая выживаемость пациентов с количеством CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли ниже медианы (n=37)				
12	31	2	22,8	77,2
24	20	7	22,8	72,9
36	15	8	50,4	49,6
48	6	12	50,4	49,6
60	4	12	50,4	49,6

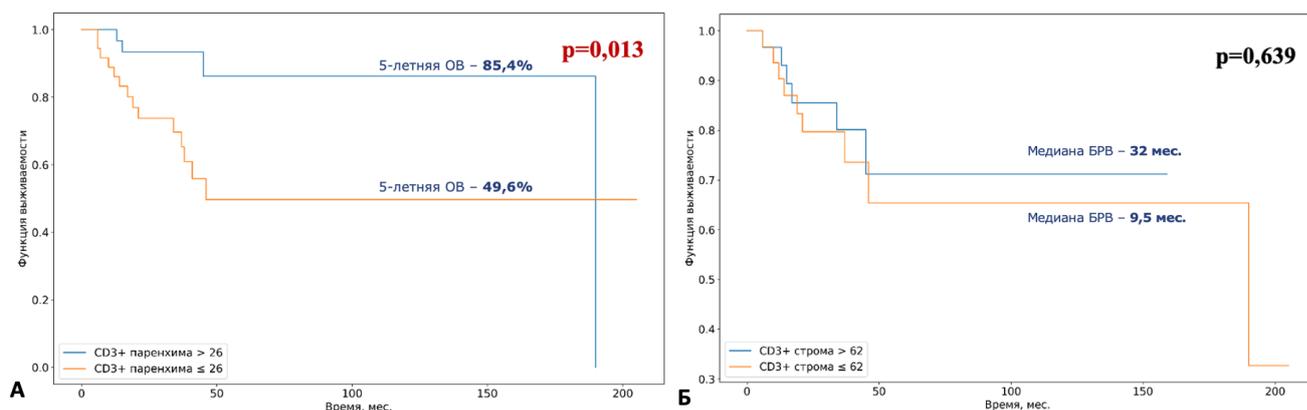


Рисунок 4.3 – Анализ ОВ Каплана-Майера в зависимости от: А – уровня CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли; Б – уровня CD3+ иммунных клеток в строме опухоли

При однофакторном анализе ОВ было установлено, что количество CD3+ клеток в паренхиме опухоли является значимым независимым прогностическим признаком (HR=0,5; 95% CI: 0,34-0,9; p=0,05) (Таблица 4.7), следовательно, увеличение значения CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 соответствовало снижению риска летального исхода в 2 раза.

Таблица 4.7 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для показателей ОВ и количества CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли	0,5 [0,34-0,9]	0,05

5-летняя ОВ больных в группе с CD3+ иммунными клетками в строме опухоли выше медианы составила 71,1%, в то время как у пациентов с количеством CD3+ иммунных клеток ниже медианы выживаемость – 69,5% (Таблица 4.8). Однако при использовании логарифмического рангового критерия не было условлено значимых различий в группах пациентов со значением данного показателя выше и ниже медианы (p=0,639) (Рисунок 4.3Б).

Таблица 4.8 – ОВ больных в группах с количеством CD3+ иммунных клеток в строме опухоли выше и ниже медианного значения

Общая выживаемость пациентов с количеством CD3+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (n=32)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск смерти, %		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
12	28	2	17,2	82,8
24	21	5	21,8	78,2
36	17	6	28,9	71,1
48	7	7	28,9	71,1
60	5	7	28,9	71,1
Общая выживаемость пациентов с количеством CD3+ иммунных клеток в строме опухоли ниже медианы (n=33)				
12	29	0	15,1	84,9
24	20	4	15,1	84,9
36	13	4	30,5	69,5
48	7	6	30,5	69,5
60	5	6	30,5	69,5

Также на данном этапе исследования при использовании метода регрессии Кокса было продемонстрировано, что значение показателя CD3+ клеток в строме опухоли при АКР не является значимым прогностическим признаком общей выживаемости больных (HR=1,2; 95% CI: 0,4-3,6; p=0,747) (Таблица 4.9).

Таблица 4.9 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для показателей общей выживаемости и количества CD3+ иммунных клеток в строме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD3+ иммунных клеток в строме опухоли	1,2 [0,4-3,6]	0,747

4.1.4. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от количества CD4+ иммунных клеток

5-летняя ОВ больных с CD4+ иммунными клетками в паренхиме опухоли выше медианы составила 70,1%, в то время как выживаемость пациентов с количеством CD4+ иммунных клеток ниже медианы – 62,3% (Таблица 4.10). Статистический анализ продемонстрировал, что в данных группах отмечаются значимые различия по ОВ больных (p=0,033) (Рисунок 4.4А).

Таблица 4.10 – ОВ больных при количестве CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше и ниже медианного значения

Общая выживаемость пациентов с количеством CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше медианы (n=35)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск смерти, %		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
12	42	1	14,6	85,4
24	32	6	17,5	82,5
36	25	7	29,9	70,1
48	12	10	29,9	70,1
60	8	13	29,9	70,1
Общая выживаемость пациентов с количеством CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли ниже медианы (n=36)				
12	20	2	18,5	81,5
24	16	4	18,5	81,5
36	9	4	37,7	62,3
48	6	6	37,7	62,3
60	5	6	37,7	62,3

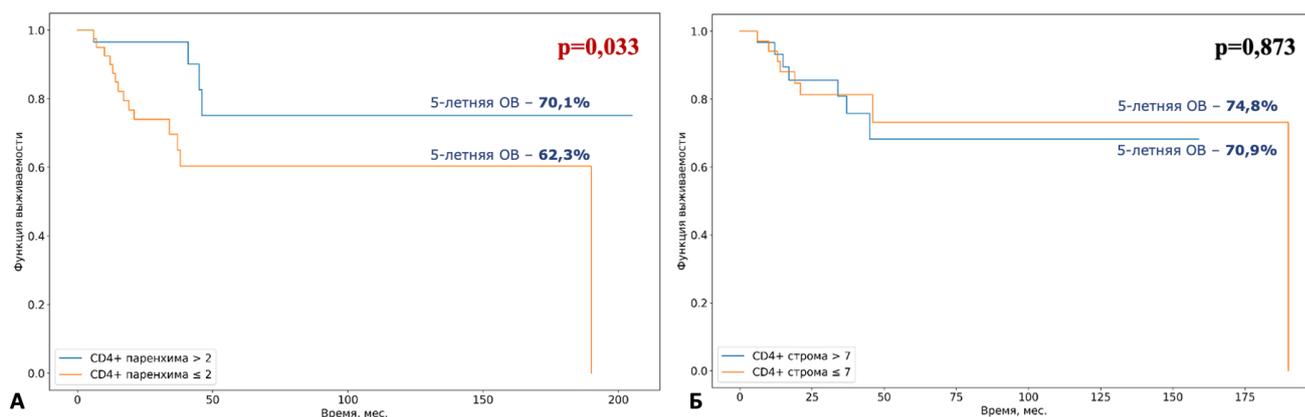


Рисунок 4.4 – Анализ общей выживаемости Каплана-Майера в зависимости от: А – уровня CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли; Б – уровня CD4+ иммунных клеток в строме опухоли

При использовании метода регрессии Кокса для оценки ОВ больных АКР в зависимости от количества CD4+ клеток в паренхиме опухолевой ткани было продемонстрировано, что значение данного показателя является достоверным независимым прогностическим признаком (HR=0,8; 95% CI: 0,68-0,97; $p=0,049$) (Таблица 4.11), то есть увеличение количества CD4+ клеток в паренхиме опухоли на 1,0 соответствует снижению риска летального исхода в 1,25 раза.

Таблица 4.11 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для значений ОВ и количества CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли	0,8 [0,68-0,97]	0,049

5-летняя ОВ больных в группе с CD4+ иммунными клетками в строме опухоли выше медианы составила 70,1%, в то время как выживаемость пациентов с количеством CD4+ иммунных клеток ниже медианы – 74,8% (Таблица 4.12). Анализ ОВ пациентов статистически значимых различий не выявил ($p=0,873$) (Рисунок 4.4Б).

Таблица 4.12 – ОВ пациентов в группах с количеством CD4+ иммунных клеток в строме опухоли выше и ниже медианного значения

Общая выживаемость пациентов с количеством CD4+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (n=33)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск смерти, %		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
12	29	1	13,7	86,3
24	23	4	17,8	82,2
36	18	5	29,1	70,9
48	9	7	29,1	70,9
60	6	7	29,1	70,9
Общая выживаемость пациентов с количеством CD4+ иммунных клеток в строме опухоли ниже медианы (n=34)				
12	31	1	16,9	83,1
24	21	5	16,9	83,1
36	12	5	25,2	74,8
48	7	6	25,2	74,8
60	5	6	25,2	74,8

При использовании метода регрессии Кокса (Таблица 4.13) было установлено, что количество CD4+ Т-лимфоцитов в строме опухоли при аденокортикальном раке не является значимым прогностическим признаком ОВ больных ($HR=1,1$; 95% CI: 0,4-3,4; $p=0,81$).

Таблица 4.13 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для показателей ОВ и количества CD4+ иммунных клеток в строме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD4+ иммунных клеток в строме опухоли	1,1 [0,4-3,4]	0,81

4.1.5. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от количества CD8+ иммунных клеток

5-летняя ОВ больных в группе с CD8+ иммунными клетками в паренхиме опухоли выше медианы составила 82,1%, выживаемость пациентов с количеством CD8+ иммунных клеток ниже медианы – 54,8% (Таблица 4.14). На данном этапе исследования для статистического анализа был использован логарифмический ранговый критерий с помощью которого было установлено, что значение ОВ больных АКР с количеством CD8+ Т-лимфоцитов в паренхиме опухолевой ткани выше медианного значения было значимо выше в сравнении с больными у которых в опухоли было обнаружено количество CD8+ Т-лимфоцитов ниже медианного значения ($p=0,015$) (Рисунок 4.5А).

Таблица 4.14 – ОВ больных в группах с CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше и ниже медианного значения

Общая выживаемость пациентов с количеством CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше медианы (n=36)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск смерти, %		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
12	34	0	6,2	93,8
24	29	2	6,2	93,8
36	19	2	17,9	82,1
48	11	4	17,9	82,1
60	8	4	17,9	82,1
Общая выживаемость пациентов с количеством CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли ниже медианы (n=36)				
12	30	2	23,5	76,5
24	19	7	27,9	72,1
36	15	8	45,2	54,8
48	7	11	45,2	54,8
60	5	11	45,2	54,8

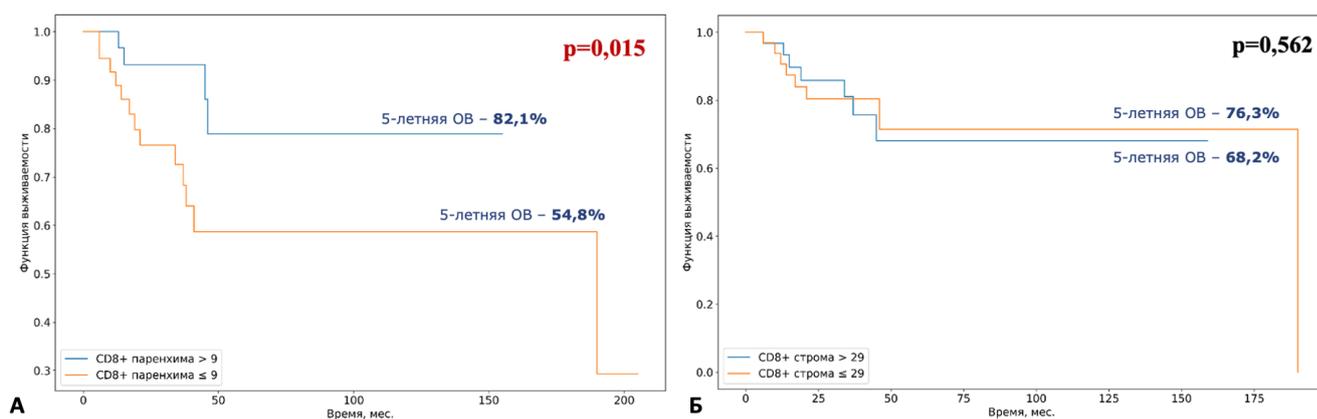


Рисунок 4.5 – Анализ общей выживаемости Каплана-Майера в зависимости от: А – уровня CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли; Б – уровня CD8+ иммунных клеток в строме опухоли

Далее при использовании метода регрессии Кокса (Таблица 4.15) было выявлено, что при увеличении значения CD8+ Т-лимфоцитов в паренхиме опухолевой ткани на 1,0 у пациентов с АКР отмечается снижение риска летального исхода примерно в 3,33 раз (HR=0,3; 95% CI: 0,09-0,89; p=0,023).

Таблица 4.15 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для ОБ и количества CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли	0,3 [0,09-0,89]	0,023

5-летняя ОБ больных с CD8+ иммунными клетками в строме опухоли выше медианного значения составила 68,2%, в то время как выживаемость пациентов с количеством CD8+ иммунных клеток ниже медианы – 76,3% (Таблица 4.16). При анализе полученных данных с использованием логарифмического рангового критерия не было отмечено значимых различий по ОБ пациентов с АКР в зависимости от количества CD8+ Т-лимфоцитов (p=0,562) (Рисунок 4.5Б).

Таблица 4.16 – Значения ОБ пациентов с АКР в группах с количеством CD8+ иммунных клеток в строме опухоли выше и ниже медианного значения

Общая выживаемость пациентов с количеством CD8+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (n=33)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск смерти, %		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
12	31	1	16,4	83,6
24	23	5	20,4	79,6
36	17	6	31,8	68,2
48	9	8	31,8	68,2
60	7	8	31,8	68,2
Общая выживаемость пациентов с количеством CD8+ иммунных клеток в строме опухоли ниже медианы (n=34)				
12	28	1	14,7	85,3
24	20	4	14,7	85,3
36	12	4	23,7	76,3
48	6	5	23,7	76,3
60	3	5	23,7	76,3

Для более детального статистического анализа влияния количества CD8+ Т-лимфоцитов в строме опухоли на значение ОБ пациентов с АКР был использован метод регрессии Кокса. Однако по результатам данного анализа значимых различий также не было выявлено (HR=1,4; 95% CI: 0,5-4,3; p=0,564) (Таблица 4.17).

Таблица 4.17 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для показателей ОБ и количества CD8+ иммунных клеток в строме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD8+ иммунных клеток в строме опухоли	1,4 [0,5-4,3]	0,564

4.1.6. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от количества CD68+ иммунных клеток

5-летняя ОБ больных с АКР в группе с CD68+ иммунными клетками в паренхиме опухоли выше медианы составила 78,8%, в то время как выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток ниже медианы – 53,2% (Таблица 4.18). При применении логарифмического

рангового критерия значимых различий по ОВ в данных группах не выявлено ($p=0,068$) (Рисунок 4.6А).

Таблица 4.18 – ОВ пациентов в группах с количеством CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше и ниже медианного значения

Общая выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше медианы (n=30)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск смерти, %		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
12	27	0	8,3	91,7
24	19	2	13,7	86,3
36	14	3	21,2	78,8
48	8	4	21,2	78,8
60	6	4	21,2	78,8
Общая выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли ниже медианы (n=30)				
12	25	3	21,7	78,3
24	20	6	21,7	78,3
36	15	6	46,8	53,2
48	6	10	46,8	53,2
60	4	10	46,8	53,2

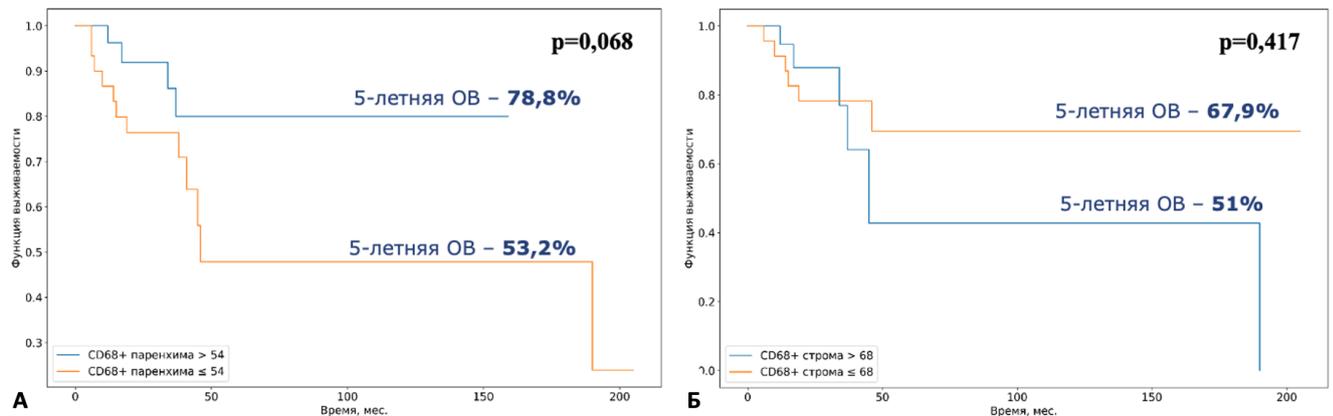


Рисунок 4.6 – Анализ общей выживаемости Каплана-Майера в зависимости от: А – уровня CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли; Б – уровня CD68+ иммунных клеток в строме опухоли

В таблице 4.19 представлены результаты анализа влияния CD68+ клеток в строме опухолевой ткани на показатель ОВ пациентов с АКР с использованием метода регрессии Кокса (HR=0,4; 95% CI: 0,1-1,2; $p=0,104$). По результатам данного анализа также продемонстрировано отсутствие значимых различий.

Таблица 4.19 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для показателей ОВ и количества CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли	0,4 [0,1-1,2]	0,104

5-летняя ОВ больных в группе с CD68+ иммунными клетками в строме опухоли выше медианы составила 51,0%, в то время как выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток ниже медианы – 67,9% (Таблица 4.20). Однако при использовании логарифмического рангового критерия различий между данными показателями не установлено ($p=0,417$) (Рисунок 4.6Б).

Таблица 4.20 – ОВ пациентов в группах с количеством CD68+ иммунных клеток в строме опухоли выше и ниже медианного значения

Общая выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (n=22)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск смерти, %		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
12	20	0	11,4	88,6
24	13	2	19,9	80,1
36	7	3	49,0	51,0
48	2	5	49,0	51,0
60	2	0	49,0	51,0
Общая выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток в строме опухоли ниже медианы (n=23)				
12	19	2	24,6	75,4
24	14	5	24,6	75,4
36	12	5	32,1	67,9
48	7	6	32,1	67,9
60	4	6	32,1	67,9

Для подтверждения выводов был применен анализ Кокса в ходе которого было также выявлено, что количество CD68+ клеток в строме АКР не является независимым прогностическим признаком общей выживаемости больных (HR=1,3; 95% CI: 0,4-4,1; $p=0,66$) (Таблица 4.21).

Таблица 4.21 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для показателей ОВ и количества CD68+ иммунных клеток в строме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD68+ иммунных клеток в строме опухоли	1,3 [0,4-4,1]	0,66

4.1.7. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от PD-L1 статуса опухоли

На данном этапе диссертационного исследования было проанализировано влияние экспрессии иммуногистохимического маркера PD-L1 в опухоли на значение ОВ пациентов с раком коры надпочечников. В результате анализа при использовании логарифмического рангового теста было установлено, что пациенты в опухоли которых была выявлена позитивная экспрессия PD-L1 имели значимо более худшую ОВ в сравнении с пациентами в опухолях которых экспрессии PD-L1 обнаружено не было ($p < 0,001$) (Рисунок 4.7).

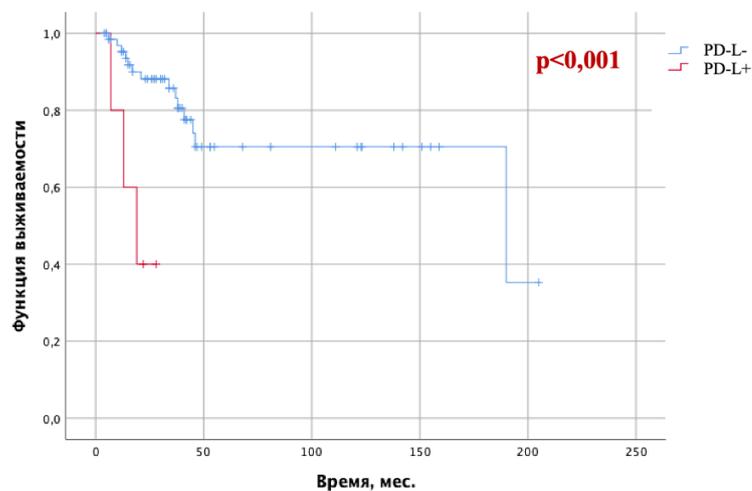


Рисунок 4.7 – Кривые ОВ Каплана-Майера в зависимости от наличия экспрессии PD-L1 в АКР

Далее был применен анализ Кокса, результаты которого подтвердили, что наличие экспрессии PD-L1 в опухоли при АКР является независимым прогностическим признаком (HR=6,9; 95% CI: 1,8-26,6; $p=0,005$) (Таблица 4.22), то есть при установлении в опухоли позитивной экспрессии PD-L1 риск летального исхода для пациентов с АКР повышается в 6,9 раз.

Таблица 4.22 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для показателей ОВ и PD-L1 статуса опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
PD-L1 статус опухоли	6,9 [1,8-26,6]	0,005

Таким образом, в ходе исследования было выявлено, что факторами влияющими на ОВ пациентов с АКР являются: морфологический подтип АКР ($p=0,008$) – классический подтип характеризовался худшей ОВ в сравнении с онкоцитарным подтипом ($p=0,003$); уровень CD45+

иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,2; 95% CI: 0,05-0,69; p=0,011) – при увеличении значения CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 отмечается снижение риска летального исхода в 5 раз; уровень CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,5; 95% CI: 0,34-0,9; p=0,05) – увеличение значения CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 соответствовало снижению риска летального исхода в 2 раза; уровень CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,8; 95% CI: 0,68-0,97; p=0,049) – увеличение значения CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 соответствовало снижению риска летального исхода в 1,25 раза; уровень CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,3; 95% CI: 0,09-0,89; p=0,023) – при увеличении значения CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 отмечается снижение риска летального исхода примерно в 3,33 раз; а также PD-L1 статус опухоли (HR=6,9; 95% CI: 1,8-26,6; p=0,005) – позитивный PD-L1 статус опухоли в 6,9 раз повышает риск смерти для больных АКР.

4.2. Влияние иммунного микроокружения на безрецидивную выживаемость пациентов с аденокортикальным раком

4.2.1. Безрецидивная выживаемость пациентов в зависимости от различных морфологических подтипов

Медиана безрецидивной выживаемости (БРВ) пациентов с классическим подтипом АКР составила 15 (4; 33) мес., онкоцитарным подтипом – 27 (7; 53) мес., с миксоидным и смешанным подтипами – 13 (3; 38) мес. и 16,5 (3; 35,5) мес., соответственно (Таблица 4.23).

Таблица 4.23 – БРВ больных с различными морфологическими подтипами АКР

Морфологический подтип АКР	Me (Q1-Q3)
Классический подтип	15 (4; 33)
Онкоцитарный подтип	27 (7; 53)
Миксоидный подтип	13 (3; 38)
Смешанный подтип	16,5 (3; 35,5)

Для оценки БРВ пациентов с различными морфологическими подтипами АКР на различных сроках наблюдения от начала лечения была построена Таблица 4.24.

Таблица 4.24 – Значения БРВ пациентов с различными морфологическими подтипами АКР

Классический подтип АКР (n=38)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск рецидива, %		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	27	10	27,1	72,9
12	22	14	38,1	62,0
18	17	18	49,5	50,5
24	17	18	49,5	50,5
36	9	22	64,1	35,9
60	4	22	73,1	26,9
Онкоцитарный подтип АКР (n=18)				
6	14	3	16,9	83,1
12	12	4	23,2	76,8
18	9	5	30,2	69,8
24	9	5	30,2	69,8
36	9	5	30,2	69,8
60	4	6	38,0	62,0
Миксоидный подтип АКР (n=9)				
6	5	4	44,4	55,6
12	5	4	44,4	55,6
18	3	5	55,6	44,4
24	3	5	55,6	44,4
36	3	5	55,6	44,4
60	1	6	70,4	29,6
Смешанный подтип АКР (n=8)				
6	4	4	50,0	50,0
12	4	4	50,0	50,0
18	4	4	50,0	50,0
24	4	4	50,0	50,0
36	2	5	62,5	37,5

Значения БРВ в зависимости гистологического подтипа АКР были также сопоставлены с помощью кривых Каплана-Мейера на Рисунке 4.8.

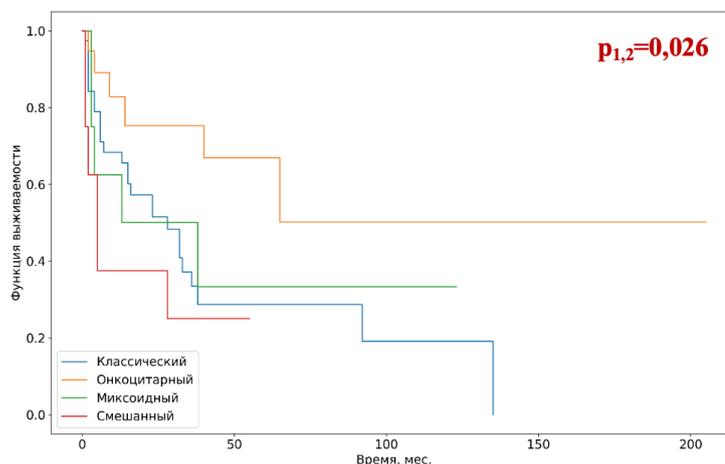


Рисунок 4.8 – Кривые Каплана-Мейера, характеризующие БРВ пациентов с АКР в зависимости от гистологического подтипа

Согласно полученным данным однолетняя БРВ пациентов с классическим подтипом АКР составила 62,0%, у больных с онкоцитарным – 76,8%, с миксоидным – 55,6%, со смешанным – 50,0%. Пятилетняя БРВ также была максимальной у пациентов с онкоцитарным подтипом АКР и составляла 62,0%, в случаях с классическим подтипом – 26,9%, при миксоидном и смешанном подтипах – 29,6% и 37,5%, соответственно. Зависимость риска развития рецидива от гистологического подтипа АКР, оцененная с помощью лог-ранк критерия Мантеля-Кокса, была статистически значимой ($p=0,03$), при попарном сравнении было установлено, что данные различия обусловлены лучшей БРВ пациентов с онкоцитарным подтипом АКР в сравнении с пациентами с классическим подтипом опухоли ($p=0,026$).

4.2.2. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества CD45+ иммунных клеток

Однолетняя БРВ пациентов при численности CD45+ клеток в паренхиме АКР выше медианы составила 67,0%, при количестве ниже медианы – 38,4% (Таблица 4.25). Данные различия были статистически достоверными ($p=0,013$). Таким образом, БРВ пациентов в группе с CD45+ иммунной инфильтрацией в паренхиме опухолей, превышающей 66 клеток/мм², оказалась значительно выше, чем у пациентов с CD45+ иммунной инфильтрацией в паренхиме опухолей, не превышающей 66 клеток/мм² (Рисунок 4.9А).

Таблица 4.25 – Безрецидивная выживаемость пациентов в группах со значением CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше и ниже медианы

Безрецидивная выживаемость пациентов с численностью CD45+ клеток в паренхиме опухоли выше медианы (n=35)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск рецидива, %		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	27	7	26,3	73,7
12	24	9	32,9	67,1
18	19	11	32,9	67,1
24	19	11	36,5	63,5
36	13	14	49,3	50,7
60	5	15	59,4	40,6
Безрецидивная выживаемость пациентов с численностью CD45+ клеток в паренхиме опухоли ниже медианы (n=36)				
6	21	14	48,8	51,2
12	17	17	61,2	38,8
18	12	21	61,2	38,8
24	12	21	61,2	38,8
36	9	22	77,3	22,7
60	3	25	77,3	22,7

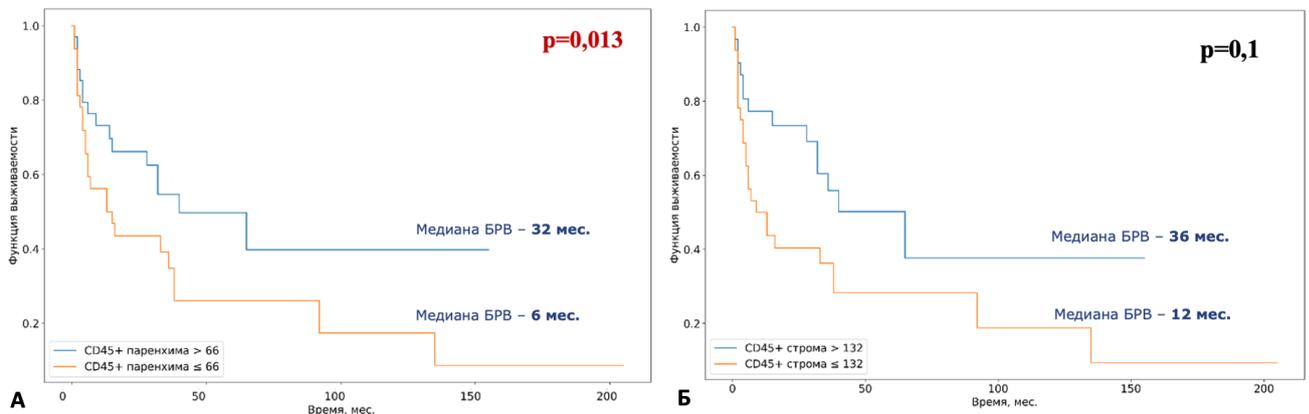


Рисунок 4.9 – Анализ безрецидивной выживаемости Каплана-Майера в зависимости от: А – уровня CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли; Б – уровня CD45+ иммунных клеток в строме опухоли

При использовании анализа Кокса было обнаружено, что количество CD45+ клеток в паренхиме опухолевой ткани является независимым прогностическим признаком БРВ пациентов с АКР (HR=0,5; 95% CI: 0,3-0,9; p=0,018) (Таблица 4.26), таким образом увеличение значения CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 соответствовало снижению риска развития рецидива в 2 раза.

Таблица 4.26 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для значений БРВ пациентов и численности CD45+ клеток в паренхиме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли	0,5 [0,3-0,9]	0,018

Однолетняя БРВ пациентов при количестве CD45+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы составила 67,3%, при количестве ниже медианы – 42,2% (Таблица 4.27). При сравнительном анализе продолжительности БРВ у пациентов с численностью CD45+ клеток в строме опухоли выше и ниже медианы (132 клеток/мм²) значимых различий обнаружено не было (p=0,1) (Рисунок 4.9Б).

Таблица 4.27 – Продолжительность БРВ пациентов с АКР с численностью CD45+ клеток в строме опухоли выше и ниже медианного значения

Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD45+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (n=35)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск рецидива, %		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	23	8	28,7	71,3
12	21	9	32,4	67,6
18	17	10	32,4	67,6
24	17	10	36,5	63,5
36	12	13	50,4	49,6
60	4	14	62,8	37,2
Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD45+ иммунных клеток в строме опухоли ниже медианы (n=36)				
6	21	11	47,2	52,8
12	16	15	57,4	42,6
18	12	18	57,4	42,6
24	12	18	57,4	42,6
36	9	19	70,5	29,5
60	4	21	70,5	29,5

Применение анализа Кокса также показало, что численность CD45+ клеток в строме опухоли АКР не является значимым прогностическим признаком (HR=0,6; 95% CI: 0,3-1,1; p=0,112) (Таблица 4.28).

Таблица 4.28 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для БРВ и количества CD45+ иммунных клеток в строме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD45+ иммунных клеток в строме опухоли	0,6 [0,3-1,1]	0,112

4.2.3. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества CD3+ иммунных клеток

Однолетняя БРВ пациентов с количеством CD3+ Т-лимфоцитов в паренхиме опухоли, превышающей медианное значение, составляет 63,4%. В то время как для пациентов с количеством данных клеток ниже медианного уровня, показатель составил всего 42,6% (Таблица 4.29). При анализе БРВ было установлено, что пациенты с количеством CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли более 26 клеток/мм² демонстрируют лучшую БРВ в сравнении с пациентами, у которых CD3+ иммунная инфильтрация в паренхиме ниже 26 клеток/мм² (p=0,031) (Рисунок 4.10А).

Таблица 4.29 – Безрецидивная выживаемость пациентов в группах с количеством CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше и ниже медианного значения

Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше медианы (n=36)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск рецидива, %		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	28	9	29,5	70,5
12	25	11	35,5	64,5
18	20	13	35,5	64,5
24	20	13	35,5	64,5
36	14	15	51,7	48,3
60	7	17	58,6	41,4
Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли ниже медианы (n=37)				
6	22	12	44,3	55,7
12	18	15	57,0	43,0
18	13	19	57,0	43,0
24	13	19	63,9	36,1
36	9	22	75,6	24,4
60	2	24	75,6	24,4

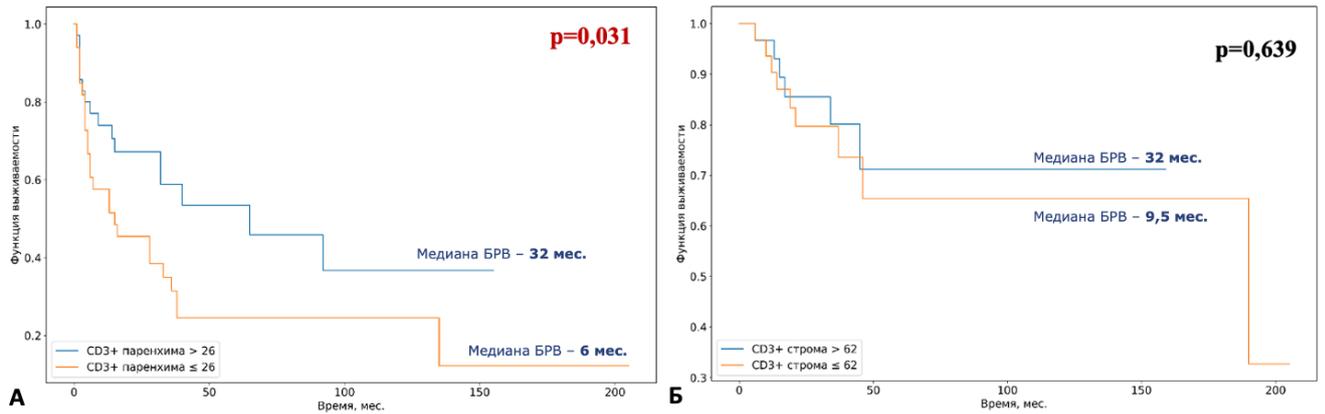


Рисунок 4.10 – Анализ безрецидивной выживаемости Каплана-Майера в зависимости от: А – уровня CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли; Б – уровня CD3+ иммунных клеток в строме опухоли

Для более подробного анализа был применен метод Кокса, который также показал, что количество CD3+ клеток в паренхиме опухоли АКР является значимым прогностическим признаком (HR=0,6; 95% CI: 0,3-0,9; p=0,049) (Таблица 4.30), а именно увеличение значения CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 соответствует снижению риска развития рецидива примерно в 1,7 раз.

Таблица 4.30 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для продолжительности БРВ и количества CD3+ клеток в паренхиме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли	0,6 [0,3-0,9]	0,049

При анализе CD3+ иммунных клеток в строме опухоли, выживаемость пациентов с показателем выше медианы составила 65,6%, в то время как при показателе ниже медианы – 47,3% (Таблица 4.31). При сравнительном анализе продолжительности БРВ пациентов в данных группах значимых различий не выявлено (p=0,639) (Рисунок 4.10Б).

Таблица 4.31 – Продолжительность БРВ пациентов с количеством CD3+ иммунных клеток в строме опухоли выше и ниже медианного значения

Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD3+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (n=32)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск рецидива, %		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	24	8	34,2	65,8
12	20	11	34,2	65,8
18	16	11	34,2	65,8
24	16	11	38,3	61,7
36	11	14	58,3	41,7
60	3	16	72,2	27,8
Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD3+ иммунных клеток в строме опухоли ниже медианы (n=33)				
6	19	12	45,3	54,7
12	16	14	52,2	47,8
18	14	16	52,2	47,8
24	14	16	52,2	47,8
36	10	17	65,1	34,9
60	5	19	65,1	34,9

Результаты применения метода регрессии Кокса представлены в Таблице 4.32.

Таблица 4.32 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для продолжительности БРВ и количества CD3+ иммунных клеток в строме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD3+ иммунных клеток в строме опухоли	0,8 [0,4-1,4]	0,399

4.2.4. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества CD4+ иммунных клеток

При изучении однолетней БРВ пациентов было выявлено, что в группе больных с CD4+ иммунными клетками в паренхиме опухоли выше медианного уровня, процент выживаемости составил 60,2% (Таблица 4.33). Пациенты, имеющие количество CD4+ иммунных клеток ниже медианы, напротив, демонстрировали выживаемость на уровне 46,2%. Сравнительный анализ БРВ между этими группами показал, что пациенты со значением CD4+ иммунной инфильтрации выше 2 клеток/мм² демонстрируют лучшую БРВ в сравнении с пациентами с уровнем CD4+

иммунной инфильтрации ниже 2 клеток/мм² на уровне статистической значимости ($p=0,002$) (Рисунок 4.11А).

Таблица 4.33 – Безрецидивная выживаемость пациентов в группах с количеством CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше и ниже медианного значения

Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше медианы (n=35)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск рецидива, %		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	34	12	32,5	67,5
12	30	15	39,7	60,3
18	23	18	39,7	60,3
24	23	18	42,3	57,7
36	18	21	57,4	42,6
60	6	24	64,7	35,3
Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли ниже медианы (n=36)				
6	16	7	39,4	60,6
12	13	9	53,4	46,6
18	10	12	53,4	46,6
24	10	12	58,6	41,4
36	5	14	72,0	28,0
60	3	15	72,0	28,0

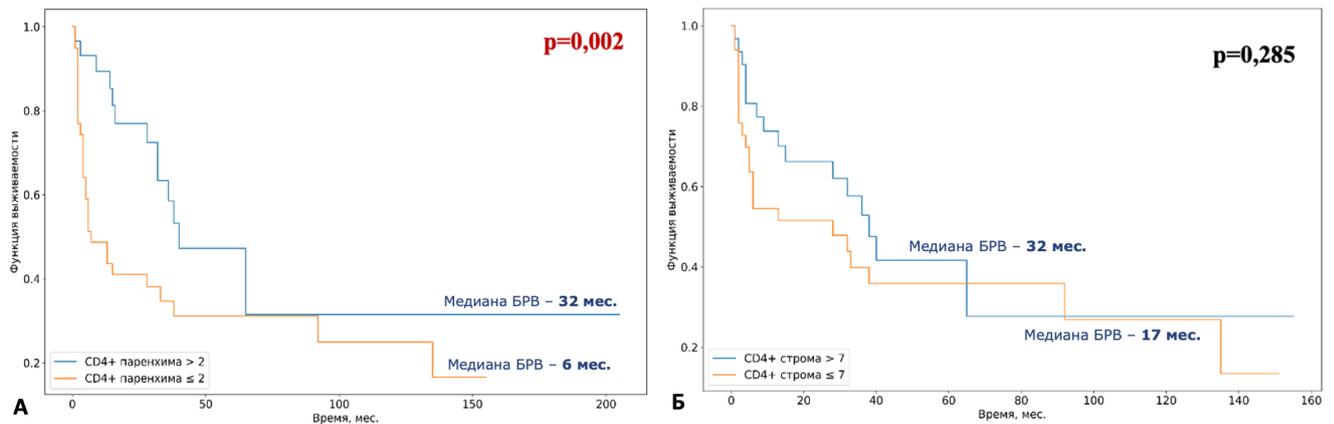


Рисунок 4.11 – Анализ безрецидивной выживаемости Каплана-Майера в зависимости от: А – уровня CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли; Б – уровня CD4+ иммунных клеток в строме опухоли

Однофакторный анализ БФВ с использованием метода Кокса показал, что численность CD4+ клеток в паренхиме опухоли при АКР является значимым прогностическим признаком ($HR=0,8$; 95% CI: 0,7-0,9; $p=0,031$) (Таблица 4.34), то есть увеличение количества CD4+

иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 соответствует снижению риска развития рецидива в 1,25 раз.

Таблица 4.34 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для БРВ и количества CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли	0,8 [0,7-0,9]	0,031

Также было проведено исследование влияния CD4+ иммуноцитов в строме опухоли на БРВ. У пациентов с уровнем данного показателя выше медианного значения выживаемость составила 62,9%, в сравнении с 50,6% в группе со значением показателя ниже медианы (Таблица 4.35). Статистический анализ также не выявил значимости в продолжительности БРВ данных групп (p=0,285) (Рисунок 4.11Б).

Таблица 4.35– Продолжительность БРВ пациентов при количестве CD4+ иммунных клеток в строме опухоли выше и ниже медианного значения

Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD4+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (n=33)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск рецидива, %		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	25	8	30,1	69,9
12	22	10	36,9	63,1
18	17	12	36,9	63,1
24	17	12	40,6	59,4
36	13	14	59,0	41,0
60	4	17	69,3	30,7
Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD4+ иммунных клеток в строме опухоли ниже медианы (n=34)				
6	21	12	45,7	54,3
12	17	15	49,0	51,0
18	15	16	49,0	51,0
24	15	16	52,6	47,4
36	9	19	65,5	34,5
60	4	20	65,5	34,5

При использовании метода регрессии Кокса также было установлено, что численность CD4+ иммунных клеток в строме опухоли не влияет на прогноз БРВ пациентов с АКР (HR=0,8; 95% CI: 0,4-1,4; p=0,418) (Таблица 4.36).

Таблица 4.36 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для продолжительности БРВ и количества CD4+ иммунных клеток в строме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD4+ иммунных клеток в строме опухоли	0,8 [0,4-1,4]	0,418

4.2.5. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества CD8+ иммунных клеток

Однолетняя БРВ пациентов при количестве CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше медианы составила 64,3%, при количестве иммуноцитов ниже медианы – 43,9% (Таблица 4.37). При анализе продолжительности БРВ пациентов с АКР в зависимости от численности CD8+ клеток в паренхиме выше и ниже медианы были выявлены значимые различия ($p=0,031$). Таким образом, БРВ пациентов в группе с CD8+ иммунной инфильтрацией в паренхиме опухолей, превышающей 9 клеток/мм², оказалась значительно выше, чем у пациентов с CD8+ иммунной инфильтрацией в паренхиме опухолей, не превышающей 9 клеток/мм² (Рисунок 4.12А).

Таблица 4.37 – Безрецидивная выживаемость пациентов в группах с количеством CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше и ниже медианного значения

Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше медианы (n=36)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск рецидива, %		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	28	9	29,5	70,5
12	25	11	35,5	64,5
18	20	13	35,5	64,5
24	20	13	35,5	64,5
36	14	15	51,7	48,3
60	7	17	58,6	41,4
Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли ниже медианы (n=36)				
6	22	11	42,6	57,4
12	18	14	55,7	44,3
18	13	18	55,7	44,3
24	13	18	62,8	37,2
36	9	21	74,9	25,1
60	2	23	74,9	25,1

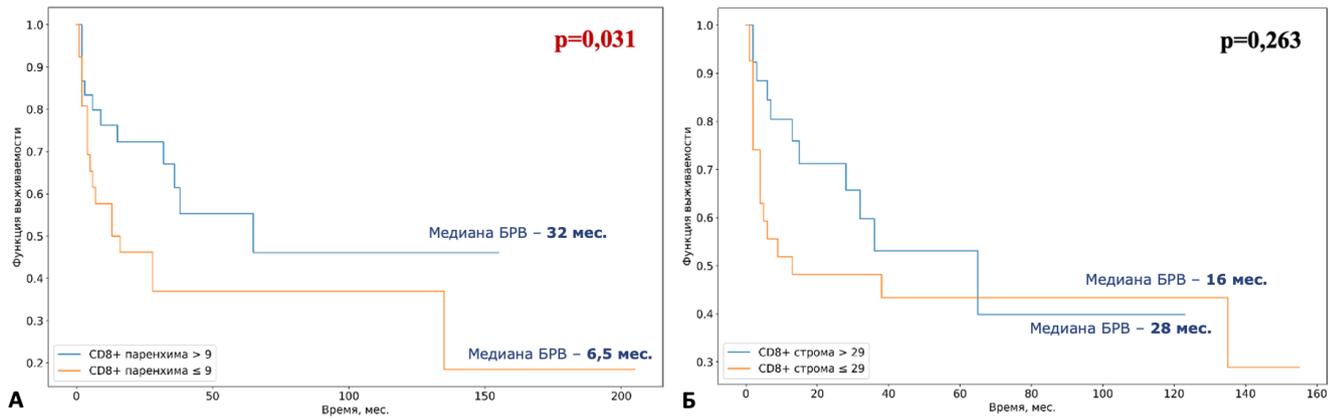


Рисунок 4.12 – Анализ безрецидивной выживаемости Каплана-Майера в зависимости от: А – уровня CD8⁺ иммунных клеток в паренхиме опухоли; Б – уровня CD8⁺ иммунных клеток в строме опухоли

Далее был применен метод регрессии Кокса (Таблица 4.38) по результатам которого было установлено, что увеличение значения CD8⁺ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 соответствует снижению риска развития рецидива АКР в 2 раза (HR=0,5; 95% CI: 0,3-0,9; p=0,037).

Таблица 4.38 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для значений продолжительности БРВ и количества CD8⁺ иммунных клеток в паренхиме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD8 ⁺ иммунных клеток в паренхиме опухоли	0,5 [0,3-0,9]	0,037

Однолетняя БРВ пациентов при количестве CD8⁺ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы составила 63,9%, при количестве ниже медианы – 47,4% (Таблица 4.39). Сравнительный анализ БРВ групп пациентов с количеством CD8⁺ иммунных клеток в строме опухоли выше и ниже медианы статистически значимых различий не выявил (p=0,263) (Рисунок 4.12Б).

Таблица 4.39 – Продолжительность БРВ пациентов с АКР в группах с количеством CD8+ иммунных клеток в строме опухоли выше и ниже медианного значения

Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD8+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (n=33)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск рецидива, %		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	26	8	29,2	70,8
12	23	10	36,0	64,0
18	17	12	36,0	64,0
24	17	12	39,7	60,3
36	12	15	62,0	38,0
60	5	18	69,6	30,4
Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD8+ иммунных клеток в строме опухоли ниже медианы (n=34)				
6	19	12	48,6	51,4
12	15	15	52,1	47,9
18	14	16	52,1	47,9
24	14	16	52,1	47,9
36	10	17	61,1	38,9
60	3	18	61,1	38,9

При применении анализа Кокса также было установлено, что численность CD8+ иммунных клеток в строме опухоли не является значимым прогностическим признаком при оценке БРВ у пациентов с АКР (HR=1,0; 95% CI: 0,73-1,28; p=0,312) (Таблица 4.40).

Таблица 4.40 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для продолжительности БРВ и количества CD8+ иммунных клеток в строме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD8+ иммунных клеток в строме опухоли	1,0 [0,73-1,28]	0,312

4.2.6. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества CD68+ иммунных клеток

Однолетняя БРВ выживаемость больных в группе с CD68+ иммунными клетками в паренхиме опухоли выше медианы составила 53,5%, в то время как выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток ниже медианы – 57,7% (Таблица 4.41). Анализ связи БРВ

пациентов при АКР с изучаемыми факторами достоверных различий не выявил ($p=0,847$) (Рисунок 4.13А).

Таблица 4.41 – Продолжительность БРВ пациентов при количестве CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше и ниже медианного значения

Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше медианы (n=30)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск рецидива, %		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	20	9	38,1	61,9
12	17	11	46,1	53,9
18	12	13	46,1	53,9
24	12	13	50,8	49,2
36	8	15	67,0	33,0
60	3	17	78,0	22,0
Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли ниже медианы (n=30)				
6	20	9	34,6	65,4
12	18	10	41,8	58,2
18	16	12	41,8	58,2
24	16	12	45,6	54,4
36	11	15	64,0	36,0
60	3	17	64,0	36,0

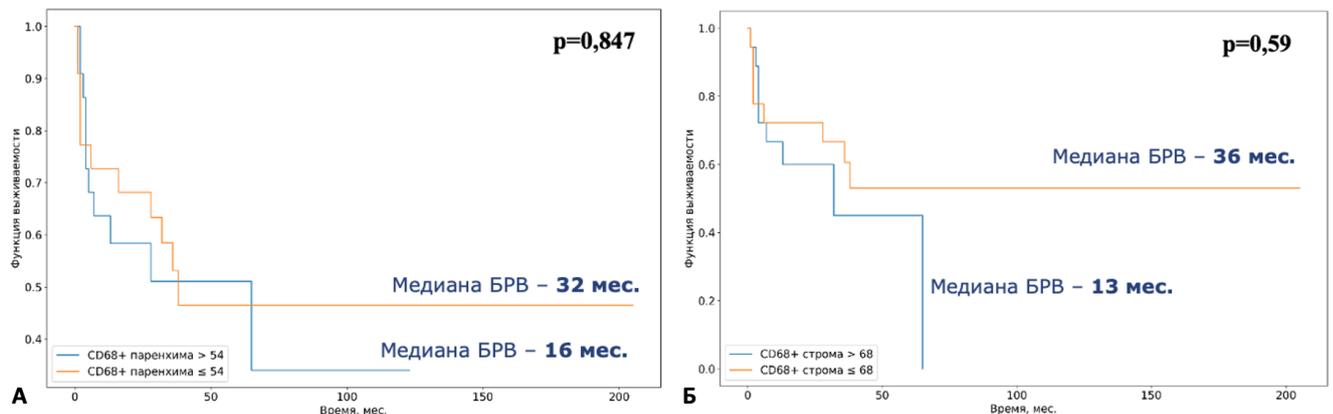


Рисунок 4.13 – Анализ безрецидивной выживаемости Каплана-Майера в зависимости от: А – уровня CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли; Б – уровня CD68+ иммунных клеток в строме опухоли

Далее для оценки влияния количества CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на БРВ пациентов с АКР был применен метод регрессии Кокса, однако в ходе анализа также было установлено, что данный фактор не является значимым ($HR=1,1$; 95% CI: 0,5-2,1; $p=0,849$) (Таблица 4.42).

Таблица 4.42 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для показателей продолжительности БРВ и количества CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли	1,1 [0,5-2,1]	0,849

Однолетняя БРВ больных в группе с CD68+ иммунными клетками в строме опухоли выше медианы составила 57,3%, в то время как выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток ниже медианы – 61,9% (Таблица 4.43). При сравнительном анализе БРВ значимых различий в данных группах установлено не было (p=0,59) (Рисунок 4.13Б).

Таблица 4.43 – Продолжительность БРВ у пациентов в группах с количеством CD68+ иммунных клеток в строме опухоли выше и ниже медианного значения

Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (n=35)				
Сроки наблюдения, мес.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала, чел.	Риск рецидива, %		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	16	6	36,7	63,3
12	13	8	42,2	57,8
18	9	9	42,2	57,8
24	9	9	42,2	57,8
36	4	11	60,0	40,0
60	2	11	80,0	20,0
Безрецидивная выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток в строме опухоли ниже медианы (n=35)				
6	14	7	38,1	61,9
12	13	8	38,1	61,9
18	13	8	38,1	61,9
24	13	8	42,9	57,1
36	11	9	60,0	40,0
60	3	9	60,0	40,0

При применении метода Кокса также было установлено, что численность CD68+ иммунных клеток в строме опухоли при АКР не является значимым прогностическим признаком (HR=0,6; 95% CI: 0,5-2,8; p=0,596) (Таблица 4.44).

Таблица 4.44 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для продолжительности БРВ и количества CD68+ иммунных клеток в строме опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
Количество CD68+ иммунных клеток в строме опухоли	0,6 [0,5-2,8]	0,596

4.2.7. Анализ безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от PD-L1 статуса опухоли

При оценке влияния статуса PD-L1 опухоли на БРВ было установлено, что пациенты с экспрессией PD-L1 демонстрируют статистически значимо более низкую БРВ, чем пациенты с PD-L1-негативными опухолями ($p < 0,001$) (Рисунок 4.14).

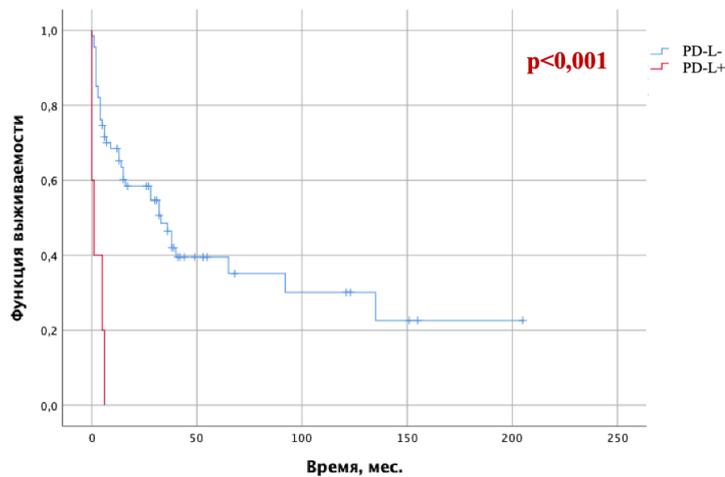


Рисунок 4.14. Кривые БРВ Каплана-Майера в зависимости от наличия экспрессии PD-L1 в опухоли при АКР

При применении метода регрессии Кокса было установлено, что наличие экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани в 2,8 раз повышает риск развития рецидива у пациентов с АКР (HR=2,8; 95% CI: 1,54-4,57; $p=0,005$) (Таблица 4.45).

Таблица 4.45 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для продолжительности БРВ и PD-L1 статуса опухоли

Фактор	HR; 95% CI	p
PD-L1 статус опухоли	2,8 [1,54-4,57]	0,005

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что факторами влияющими на продолжительность БРВ пациентов с АКР являются: уровень CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,5; 95% CI: 0,3-0,9; $p=0,018$) – увеличение значения CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли снижает риска развития рецидива в 2 раза; уровень CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,6; 95% CI: 0,3-0,9; $p=0,049$) – увеличение значения CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли снижает риска развития рецидива примерно в 1,7 раз;

уровень CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,8; 95% CI: 0,7-0,9; p=0,031) – увеличение значения CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли снижает риска развития рецидива в 1,25 раз; уровень CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,5; 95% CI: 0,3-0,9; p=0,037) – увеличение значения CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли снижает риска развития рецидива в 2 раза; а также PD-L1 статус опухоли (HR=2,8; 95% CI: 1,54-4,57; p=0,005) – экспрессия PD- L1 в 2,8 раз повышает вероятность развития рецидива у пациентов с АКР.

4.3. Прогностические модели для оценки рецидива и выживаемости пациентов с адренокортикальным раком

С учетом полученных выше данных были разработаны две математические модели для оценки и прогнозирования риска смерти и рецидива у пациентов с АКР.

4.3.1. Разработка модели для прогнозирования выживаемости пациентов с адренокортикальным раком

Исследуемая выборка пациентов с АКР была случайным образом разделена на 2 группы: 29 пациентов - в обучающей выборке и 13 пациентов - в тестирующей выборке. Пациенты в двух группах были хорошо сбалансированы по основным характеристикам.

Для разработки прогностической модели, описывающей изменения ОВ был использован многофакторный регрессионный анализ методом пошагового исключения по Вальду. В результате отбора предикторов была получена следующая математическая модель (1):

$$h_i(t) = h_0(t) * \exp(-25,5 * X_1 + 18,6 * X_2 - 13,3 * X_3 - 23,6 * X_4 + 17,1 * X_5) \quad (1)$$

где $h_i(t)$ – риск летального исхода от АКР у i -го пациента (в %), $h_0(t)$ – базовый риск летального исхода от АКР в течение срока наблюдения t (в %), X_1 – количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (клеток/мм²), X_2 – количество CD45+ иммунных клеток в строме опухоли (клеток/мм²), X_3 – количество CD8+ иммунных клеток в строме опухоли (клеток/мм²),

X_4 – количество CD68+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (клеток/мм²), X_5 – количество CD68+ иммунных клеток в строме опухоли (клеток/мм²).

Полученная регрессионная модель была статистически значимой ($p=0,01$, χ^2).

Значения базового риска летального исхода от АКР для модели представлены в Таблице 4.46.

Таблица 4.46 – Значения базового риска летального исхода от АКР для модели (1)

Период наблюдения, мес.	Общая выживаемость, %
6	0,026
12	0,094
18	0,278
24	0,376

Характеристики предикторов модели представлены в Таблице 4.47. Для каждого из пяти независимых факторов риска были получены коэффициенты, которые были использованы для вычисления индивидуального риск летального исхода от АКР.

Таблица 4.47 – Характеристики предикторов модели для прогноза общей выживаемости ($n=29$, $p = 0,01$, χ^2)

Предиктор	Оценка параметра	p	HR; 95% CI
CD45+ иммунные клетки в паренхиме опухоли	-25,5	0,014	0,15; 0,002-0,36
CD45+ иммунные клетки в строме опухоли	18,6	0,006	12,54; 2,73-62,34
CD8+ иммунные клетки в строме опухоли	-13,3	0,001	0,006; 0,001-0,036
CD68+ иммунные клетки в паренхиме опухоли	-23,6	0,011	0,005; 0,001-0,029
CD68+ иммунные клетки в строме опухоли	17,1	<0,001	28,03; 3,48-75,04

В соответствии с приведенной таблицей, установлено, что положительной ассоциацией с летальным исходом пациентов обладают уровни CD45+ ($p=0,006$) и CD68+ ($p<0,001$) иммунных клеток в строме опухоли, отрицательной – уровни CD45+ ($p=0,014$) и CD68+ ($p=0,011$) иммуноцитов в паренхиме опухоли, а также уровень CD8+ ($p=0,001$) клеток в строме опухоли.

Матрица классификации модели на обучающей выборке представлена в Таблице 4.48.

Таблица 4.48 – Матрица классификации пациентов с использованием модели на обучающей выборке (n=29)

Обучающая выборка		Истина	
		Смерть	Выживание
Прогноз модели	Смерть	5	2
	Выживание	3	19

Операционные характеристики обучающей выборки:

Диагностическая чувствительность (ДЧ) = 63% (95% CI: 30% - 82%);

Диагностическая специфичность (ДС) = 91% (95% CI: 78% - 98%);

Прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР) = 71% (95% CI: 34% - 94%);

Прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР) = 86% (95% CI: 75% - 94%).

Матрица классификации модели на тестовой выборке представлена в Таблице 4.49.

Таблица 4.49 – Матрица классификации пациентов с использованием модели на тестовой выборке (n=13)

Тестовая выборка		Истина	
		Смерть	Выживание
Прогноз модели	Смерть	3	2
	Выживание	1	7

Операционные характеристики тестовой выборки:

ДЧ = 75%;

ДС = 78%;

ПЦПР = 60%;

ПЦОР = 88%.

Так как нижняя граница 95% CI ПЦПР полученной математической модели пересекает 50%, данная характеристика является неудовлетворительной. Таким образом, разработанную нами модель рекомендуется использовать только для исключения летального исхода, но не для его прогнозирования.

4.3.2. Разработка модели для прогнозирования рецидива у пациентов с адренокортикальным раком

Для разработки математической модели для прогнозирования риска рецидива АКР исследуемая выборка пациентов также была случайным образом разделена на 2 группы: 44 пациента - в обучающей выборке и 19 пациентов - в тестирующей выборке. Пациенты в двух группах были хорошо сбалансированы по основным характеристикам.

Для разработки прогностической модели, описывающей изменения БРВ также был использован многофакторный регрессионный анализ методом пошагового исключения по Вальду. В результате отбора предикторов была получена следующая математическая модель (2):

$$h_i(t) = h_0(t) * \exp(-4,4*X_1 + 4,1*X_2 - 1,1*X_3 - 1,7*X_4 + 0,3*X_5 + 1,8*X_6) \quad (2)$$

где $h_i(t)$ – риск рецидива АКР у i -го пациента (в %), $h_0(t)$ – базовый риск рецидива АКР в течение срока наблюдения t (в %), X_1 – количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (клеток/мм²), X_2 – количество CD45+ иммунных клеток в строме опухоли (клеток/мм²), X_3 – количество CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (клеток/мм²), X_4 – количество CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (клеток/мм²), X_5 – количество CD4+ иммунных клеток в строме опухоли (клеток/мм²), X_6 – количество CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (клеток/мм²).

Полученная регрессионная модель была статистически значимой ($p = 0,002$, χ^2).

Значения базового риска летального исхода от АКР для модели представлены в Таблица 4.50.

Таблица 4.50 – Значения базового риска развития рецидива АКР для модели (2)

Период наблюдения, мес.	Общая выживаемость, %
6	0,407
12	0,5
18	0,61
24	0,676

В результате анализа было установлено, что уровень CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли обладает отрицательной ассоциацией с развитием рецидивов в пациентов с адренокортикальным раком. Характеристики предикторов модели представлены в Таблице 4.51.

Для каждого из шести факторов риска были получены коэффициенты, которые были использованы для вычисления индивидуального риска рецидива обсуждаемого заболевания.

Таблица 4.51 – Результаты регрессии Кокса для прогноза рецидива (n=44, p = 0,002, χ^2)

Предиктор	Оценка параметра	p	HR; 95% CI
CD45+ иммунные клетки в паренхиме опухоли	- 4,4	0,014	0,01; 0,0003 -0,4
CD45+ иммунные клетки в строме опухоли	4,1	0,069	60,9; 0,7 - 51*10 ²
CD3+ иммунные клетки в паренхиме опухоли	-1,1	0,403	0,3; 0,03-4,2
CD4+ иммунные клетки в паренхиме опухоли	-1,7	0,630	0,2; 0,0001 - 247
CD4+ иммунные клетки в строме опухоли	0,3	0,894	1,4; 0,01 - 127
CD8+ иммунные клетки в паренхиме опухоли	1,8	0,366	6,0; 0,1 - 290

Матрица классификации модели на обучающей выборке представлена в Таблица 4.52.

Таблица 4.52 – Матрица классификации пациентов с использованием модели на обучающей выборке (n=44)

Обучающая выборка		Истина	
		Рецидив есть	Рецидива нет
Прогноз модели	Рецидив есть	18	4
	Рецидива нет	8	14

Операционные характеристики обучающей выборки:

ДЧ = 69% (95% CI: 48% - 86%);

ДС = 78% (95% CI: 52% - 94%);

ПЦПР = 82% (95% CI: 60% - 95%);

ПЦОР = 64% (95% CI: 41% - 83%).

Матрица классификации модели на тестовой выборке представлена в Таблица 4.53.

Таблица 4.53 – Матрица классификации пациентов с использованием модели на тестовой выборке (n=19)

Тестовая выборка		Истина	
		Рецидив есть	Рецидива нет
Прогноз модели	Рецидив есть	6	1
	Рецидива нет	5	7

Операционные характеристики тестовой выборки:

ДЧ = 55%;

ДС = 88%;

ПЦПР = 86%;

ПЦОР = 58%.

Так как нижняя граница 95% СІ ПЦОР математической модели пересекает 50%, данная характеристика является неудовлетворительной. Таким образом, разработанную модель рекомендуется использовать только для прогнозирования рецидива, но не для его исключения.

Клинический пример 1. Пациентка П., 55 лет. При обследовании в марте 2022 г. по данным УЗИ было обнаружено новообразование правого надпочечника диаметром до 52 мм, при повторном исследовании в июне 2022 г. – образование 64 мм.

Данные МСКТ: в правом надпочечнике обнаружено новообразование – 68x48x37 мм, плотность до в/в контраста – 38-56 ед. Н, после артериальная фаза – +43-70 ед. Н, в венозную фазу – +55-100 ед. Н. При лабораторном исследовании признаков гормональной гиперсекреции образования не выявлено.

Выполнено хирургическое лечение в объеме правосторонней адреналэктомии с опухолью. По результатам гистологического исследования выставлен диагноз – классический подтип аденокортикального рака (Рисунок 4.15). Результаты иммуногистохимического исследования операционного материала представлены в Таблице 4.54.

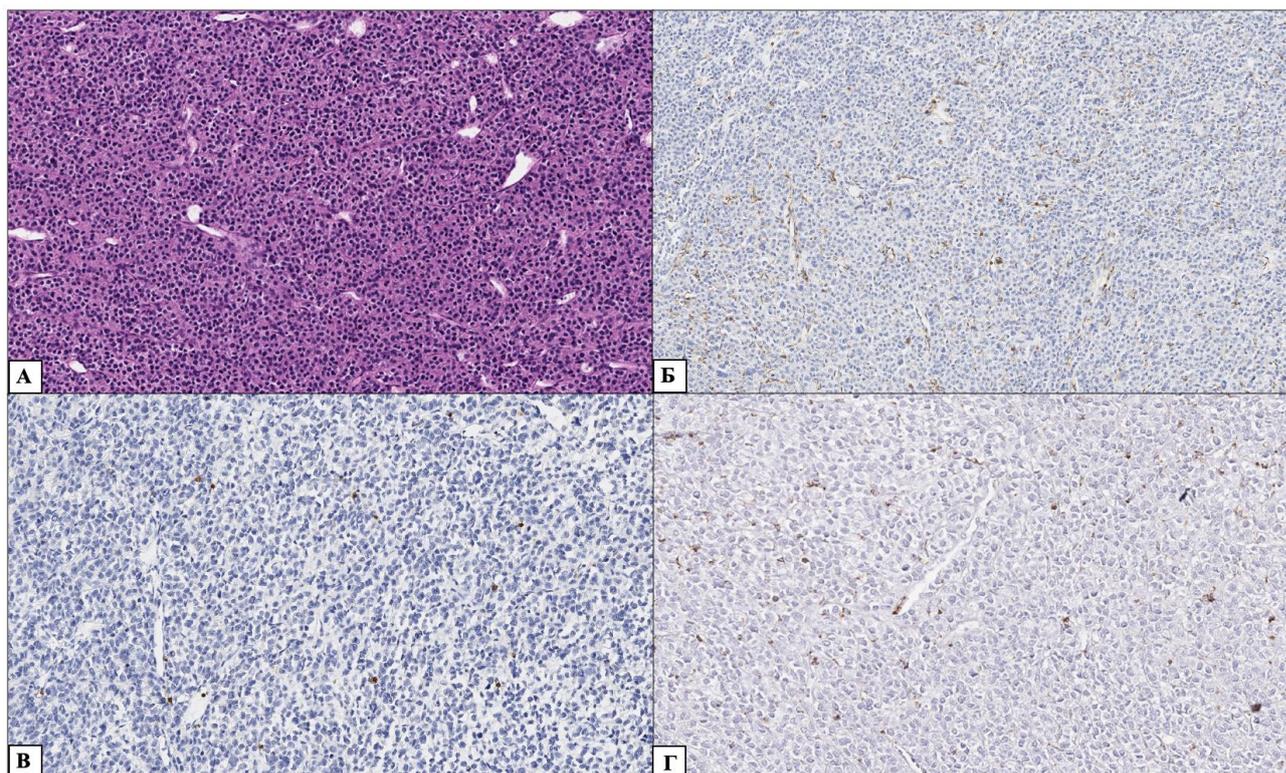


Рисунок 4.15 – Классический подтип аденокортикального рака. Паренхима опухоли. А – Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x100. Б – ИГХ реакция с антителом к CD45. Увеличение x100; В – ИГХ реакция с антителом к CD8. Увеличение x100; Г – ИГХ реакция с антителом к CD68. Увеличение x100

Таблица 4.54 - Результаты ИГХ исследования операционного материала

ИГХ исследование с маркером	Количество иммунных клеток, клеток/мм ²		
	Клинический пример 1	Клинический пример 2	Клинический пример 3
CD45 (паренхима опухоли)	58	396	46
CD45 (строма опухоли)	123	406	107
CD3 (паренхима опухоли)	19	178	9
CD4 (паренхима опухоли)	5	61	2
CD4 (строма опухоли)	6	26	9
CD8 (паренхима опухоли)	10	89	7
CD8 (строма опухоли)	11	58	53
CD68 (паренхима опухоли)	124	207	78
CD68 (строма опухоли)	147	223	98

При применении разработанных математических моделей риск развития рецидива (12 мес.) у данного пациента составил 87,6%, риск летального исхода (24 мес.) – 77,9 %.

Спустя 13 мес. у пациентки был выявлен рецидив заболевания, а ОВ пациентки составила 20 мес.

Клинический пример 2. Пациентка В., 53 года, обратилась с жалобами эпизодические подъемы АД до 220/130 мм рт. ст. При проведении УЗИ в январе 2020 г. выявлено образование левого надпочечника размером около 55 мм.

По результатам проведенного МСКТ обнаружено солидное образование левого надпочечника диаметром до 57 мм. По результатам гормонального обследования отмечается гиперсекреция опухолью кортизола – кортизол – 384,8 нмоль/л, АКТГ утр. – 4,3 пмоль/л, альдостерон – 143,8 пг/мл, ренин – 21,8 мкМЕ/мл.

Выполнено хирургическое лечение в объеме левосторонней адреналэктомии с опухолью. По результатам гистологического исследования выставлен диагноз – онкоцитарный подтип адренокортикального рака (Рисунок 4.16). Результаты иммуногистохимического исследования операционного материала представлены в Таблице 4.54.

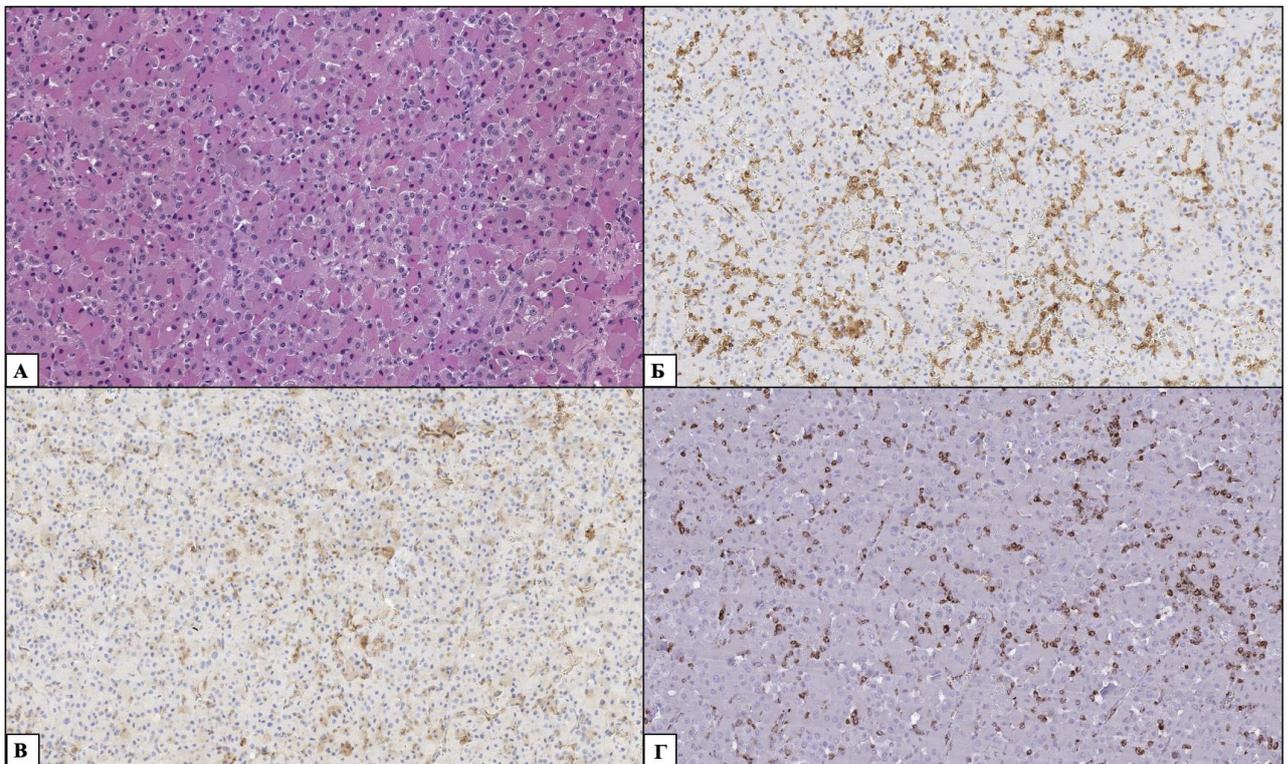


Рисунок 4.16 – Онкоцитарный подтип адренокортикального рака. Паренхима опухоли. А – Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x100. Б – ИГХ реакция с антителом к CD45. Увеличение x100; В – ИГХ реакция с антителом к CD4. Увеличение x100; Г – ИГХ реакция с антителом к CD68. Увеличение x100

При применении разработанных математических моделей риск развития рецидива (24 мес.) у данного пациента составил 30,6%, риск летального исхода (24 мес.) – 20,9 %.

На момент обследования пациентки в декабре 2023 безрецидивная и общая выживаемость составили 47 мес. признаков распространения опухолевого процесса не обнаружено.

Клинический пример 3. Пациентка П., 46 лет. Госпитализирована в декабре 2019 г. с жалобами на избыточный рост волос на лице и теле, выпадение волос в височной области, огрубение голоса, повышение АД максимально до 160/90 мм рт. ст.

По результатам гормонального исследования выявлен эндогенный гиперкортицизм надпочечникового генеза: повышение кортизола в суточной моче до 850,2 нмоль/сут (до 379), кортизол утром в ходе малой дексаметазоновой пробы 681 нмоль/л, подавление АКТГ до 1,01 пг/мл, а также нарушение ритма секреции АКТГ/кортизол, по данным МСКТ брюшной полости в январе 2022 г. выявлено объемное неоднородное образование в области левого надпочечника, размерами 9×6,8×9 см (нативная плотность не указана), интенсивно накапливающее контрастное вещество, деформирующее верхний полюс левой почки.

Выполнено хирургическое лечение в объеме лапароскопической адреналэктомии слева. По результатам гистологического исследования подтвержден клинический диагноз – классический подтип аденокортикального рака (Рисунок 4.17). Результаты иммуногистохимического исследования операционного материала представлены в Таблице 4.54.

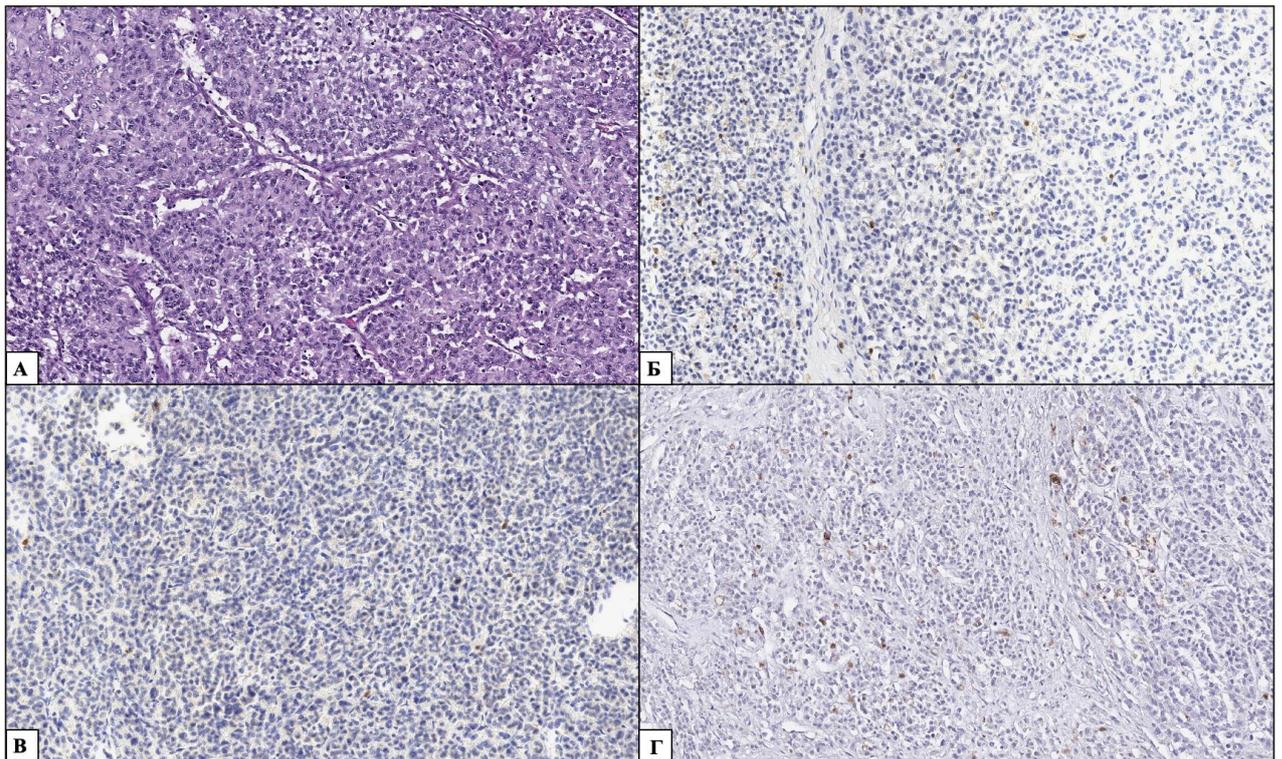


Рисунок 4.17 – Классический подтип аденокортикального рака. Паренхима опухоли. А – Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x100. Б – ИГХ реакция с антителом к CD45. Увеличение x100; В – ИГХ реакция с антителом к CD3. Увеличение x100; Г – ИГХ реакция с антителом к CD68. Увеличение x100

При применении разработанных математических моделей риск развития рецидива (12 мес.) у данной пациентки составил 89,4%, риск летального исхода (24 мес.) – 82,8 %.

На момент последнего обследования БРВ и ОВ составили 7 и 22 мес. соответственно, установлен системный рецидив, на сегодняшний день связь с пациенткой потеряна.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адренкортикальный рак (АКР) – редкая злокачественная эндокринная опухоль из клеток коры надпочечника с частотой встречаемости 0,7–2 случая на 1 млн населения в год [40, 41, 50]. В последние годы АКР рассматривается как гетерогенная группа заболеваний с различными патоморфологическими и геномными особенностями, что обуславливает вариабельность клинической картины и прогноза для пациентов. Однако несмотря на высокую агрессивность АКР, в ряде случаев заболевание демонстрирует длительную безрецидивную (БРВ) и общую выживаемостью (ОВ) пациентов. Необходимость определения новых прогностических параметров для выбора наиболее эффективной тактики ведения пациентов до сих пор остается одной из главных и нерешенных проблем.

Согласно различным данным, состав микроокружения опухоли имеет решающее значение для разработки стратегий иммунотерапевтического лечения рака. Одним из компонентов микроокружения опухоли являются иммунные клетки, наличие которых ассоциируется с лучшим прогнозом для пациентов с рядом злокачественных опухолей [26], однако известно, что различные субпопуляции иммунных клеток оказывают разнонаправленное действие на опухолевый рост: часть из них стимулирует прогрессирование опухолей, другая часть подавляет, что зависит от спектра вырабатываемых ими цитокинов. Все большее число исследований в последние годы подчеркивают значение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, а также других типов иммунных клеток в прогнозе пациентов с АКР, однако детальный анализ состава опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток при АКР до настоящего времени не проводился [40, 41].

В связи с вышеизложенным целью данной работы явилась оценка субпопуляционного состава и прогностического влияния иммунного микроокружения опухоли в различных гистологических подтипах АКР.

На первом этапе нами было проведено гистологическое исследование образцов опухолевой ткани от 73 пациентов с АКР. Средний возраст пациентов составил $46,8 \pm 1,7$ лет. Среди изученного гистологического материала классический морфологический подтип АКР был диагностирован в 52,1% случаев (n=38), онкоцитарный – в 24,7% случаев (n=18), миксоидный – в 12,3% (n=9). В 11% случаев (n=8) был установлен смешанный подтип опухоли, 6 случаев из которого были представлены классическим и онкоцитарными подтипами и 2 случая – классическим и миксоидным.

Был проведен анализ доступных клинических данных. Согласно результатам гормонального исследования (доступно у 62 пациентов), в 25 случаях (40,3%) были

диагностированы гормональные нарушения: у 20 пациентов (32,3%) отмечался гиперкортицизм, у 3 пациентов (4,8%) – гиперкортицизм сочетался с гиперандрогенией, в 1 случаев (1,6%) наблюдалась гиперандрогения, в 1 случае (1,6%) – гиперальдостеронизм.

По результатам патологоанатомического исследования гистологического материала была определена стадирования заболевания по классификации ENSAT. В 45,2% случаях (n=33) была установлена II стадия, в 32,9% случаях (n=24) – III, в 13,7% случаях (n=10) – I и в 8,2% случаях (n=6) – IV стадия.

Далее было проведено ИГХ исследование образцов опухолевой ткани на маркеры основных субпопуляций иммунных клеток с последующим анализом полученных данных.

В паренхиме (n=71) и строме (n=67) исследованных опухолей было обнаружено относительно низкое среднее количество CD45+ иммунных клеток (142 и 187 клеток/мм² соответственно). Статистически значимых различий в зависимости от пола, возраста и размера образования выявлено не было. Однако, при анализе экспрессии данного маркера в различных гистологических подтипах АКР были выявлены статистически значимые различия как в паренхиме (p<0,001) так и в строме опухолей (p<0,001), при попарном сравнении было установлено, что данные различия обусловлены более выраженной CD45+ иммунной инфильтрацией онкоцитарного подтипа АКР как в паренхиме (p<0,001), так и в строме (p<0,001) опухоли по сравнению с классическим гистологическим подтипом.

В группе пациентов со смешанной гормональной активностью по сравнению с группой пациентов с гиперкортицизмом на уровне статистической тенденции отмечается более выраженная CD45+ иммунная инфильтрация в паренхиме (p=0,010) и в строме опухолевой ткани (p=0,013). В группе со смешанной гормональной активностью на уровне статистической тенденции также наблюдался более высокий уровень CD45+ в строме по сравнению с группой с отсутствием гормональной активности (p=0,043).

Среднее количество CD3+ иммунных клеток в паренхиме (n=73) и строме (n=65) в исследуемых образцах АКР составило 52 и 94 клеток/мм², соответственно. При анализе экспрессии данного маркера в различных гистологических подтипах АКР статистически значимые различия были отмечены только в паренхиме опухоли (p<0,001), при попарном сравнении было установлено, что данные различия также обусловлены более выраженной CD3+ иммунной инфильтрацией онкоцитарного подтипа АКР по сравнению с классическим (p<0,001).

Среднее количество CD4+ иммунных клеток в паренхиме (n=71) и строме (n=67) исследуемых образцов опухоли составило 7 и 18 клеток/мм² соответственно. При анализе экспрессии CD4+ клеток в различных гистологических подтипах АКР были выявлены статистически значимые различия только в паренхиме опухоли (p=0,002). При попарном сравнении было установлено, что данные различия также обусловлены более выраженной CD4+

иммунной инфильтрацией в онкоцитарном подтипе АКР по сравнению с классическим ($p < 0.001$). В то же время было установлено, что в группе пациентов со смешанной гормональной активностью по сравнению с группой пациентов с гиперкортицизмом на уровне статистической тенденции отмечается более выраженная CD4+ иммунная инфильтрация как в паренхиме ($p = 0,049$), так и в строме опухоли ($p = 0,028$).

Среднее количество CD8+ иммунных клеток в паренхиме ($n = 72$) и строме ($n = 67$) исследуемых образцов АКР составило 34 и 53 клеток/мм², соответственно. При анализе экспрессии CD8 в различных гистологических подтипах АКР статистически значимые различия были отмечены только в паренхиме опухоли ($p = 0,004$), данные различия также обусловлены более выраженной CD8+ иммунной инфильтрацией в паренхиме онкоцитарного гистологического подтипа АКР в сравнении с классическим подтипом ($p = 0,003$).

Среднее количество CD68+ моноцитов/макрофагов в паренхиме и строме опухоли составило 109 и 114 клеток/мм², соответственно. Однако несмотря на некоторые колебания в значениях медианы экспрессии данного маркера между разными гистологическими подтипами, статистически значимых различий ни в паренхиме ($p = 0,205$), ни и в строме ($p = 0,157$) опухоли установлено не было. Тем не менее при анализе опухолей по наличию отдаленных метастазов выявлено, что в образцах опухолевой ткани, полученных от пациентов с отсутствием отдаленных метастазов (M0) наблюдается достоверно более высокий уровень CD68+ иммунной инфильтрации в паренхиме опухоли ($p = 0,009$).

Выполнен анализ экспрессии маркера PD-L1 в доступных образцах АКР. Позитивный PD-L1-статус был выявлен в 6,8% (5 из 73) случаях АКР, негативный PD-L1-статус – в 93,2% (68 из 73) наблюдений. По результатам исследования было установлено, что в образцах опухоли с положительной экспрессией PD-L1 отмечалась значительно менее выраженная CD68+ иммунная инфильтрация в паренхиме опухоли ($p = 0,008$).

На следующем этапе был проведен анализ выживаемости исследуемой выборки пациентов ($n = 73$). Медиана времени наблюдения за пациентами составила 34 мес. (от 4 до 205 мес).

При анализе 5-летней выживаемости было установлено, что пациенты с онкоцитарным подтипом АКР в сравнении с другими группами имели максимальное значение ОВ равное 100%, которое сохранялось на данном уровне в течение всего периода наблюдения, а именно 17,5 лет. У больных с классическим подтипом АКР 5-летняя ОВ была значительно ниже и составляла 45,3%, у больных с миксоидным – 75,0%, а со смешанным – 84,6%. При оценке влияния гистологического подтипа на ОВ пациентов с АКР отмечалось статистически значимое различие ($p = 0,008$), что было обусловлено различиями между классическими и онкоцитарными подтипами ($p = 0,003$), а также между миксоидным и смешанным подтипами АКР ($p < 0,001$).

Анализ 5-летней ОВ пациентов с различным количеством CD45+ иммуноцитов в паренхиме опухоли показал, что у пациентов с количеством иммуноцитов выше медианы (66 клеток/мм²) 5-летняя ОВ составила 87,0%, в то время как у пациентов с меньшим количеством клеток - 46,0% (p=0,005). Пациенты с числом CD45+ клеток в строме опухоли выше медианы (132 клеток/мм²) имели выживаемость 81,7%, а пациенты с количеством CD45+ иммунных клеток ниже медианы – 56,6% (p=0,145).

Аналогичные результаты отмечались и при анализе продолжительности выживаемости пациентов относительно уровня экспрессии других иммунных маркеров. 5-летняя ОВ больных в группе с количеством CD3+ иммунными клетками в паренхиме опухоли выше медианы (26 клеток/мм²) составила 85,4%, у пациентов с CD3+ иммунными клетками ниже медианы выживаемость – 49,6%, проведенный анализ также выявил статистически значимые различия между данными группами (p=0,013). Однако, различие в выживаемости у групп с разным количеством CD3+ клеток в строме опухоли (выше и ниже медианы в 62 клеток/мм²) оказалось статистически не значимым (p=0,639).

В случае с CD4+ иммунными клетками в паренхиме опухоли, пациенты с количеством клеток выше медианы (2 клетки/мм²) имели выживаемость 70,1%, а пациенты с количеством CD4+ иммунных клеток ниже медианы – 62,3% (p=0,033). Анализ ОВ пациентов в зависимости от уровня инфильтрации стромы опухоли CD4+ клетками достоверных различий не выявил (p=0,873).

Общая 5-летняя выживаемость больных в группе с CD8+ иммунными клетками в паренхиме опухоли выше медианы (9 клеток/мм²) составила 82,1%, выживаемость пациентов с количеством CD8+ иммунных клеток ниже медианы – 54,8%, в данных группах также отмечались статистически значимые различия (p=0,015). Однако при анализе ОВ пациентов в зависимости от уровня инфильтрации стромы опухоли CD8+ клетками достоверных данных получено не было (p=0,562).

И наконец, пациенты с CD68+ клетками в паренхиме опухоли выше медианы демонстрировали пятилетнюю выживаемость 78,8%, в то время как у тех, у кого инфильтрация была ниже, она составляла 53,2%, тем не менее не смотря на некоторые различия, статистической значимости отмечено не было (p=0,068). У пациентов с CD68+ клетками в строме опухоли выше медианы выживаемость составляла 51,0%, а у тех, у кого их количество было ниже медианы - 67,9% (p=0,417).

Оценка влияния статуса PD-L1 опухоли на выживаемость показала, что продолжительность ОВ пациентов у которых в опухоли была отмечена экспрессией маркера PD-L1 была достоверно ниже в сравнении с больными, в опухолевой ткани которых экспрессия данного маркера обнаружена не была (p<0,001).

Дополнительно был проведен однофакторный анализ выживаемости в регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса [32], в ходе которого было установлено, что факторами влияющими на ОБ пациентов с АКР являются: уровень CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,2; 95% CI: 0,05-0,69; p=0,011) – при увеличении значения CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 отмечается снижение риска летального исхода в 5 раз; уровень CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,5; 95% CI: 0,34-0,9; p=0,05) – увеличение значения CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 соответствовало снижению риска летального исхода в 2 раза; уровень CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,8; 95% CI: 0,68-0,97; p=0,049) – увеличение значения CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 соответствовало снижению риска летального исхода в 1,25 раза; уровень CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,3; 95% CI: 0,09-0,89; p=0,023) – при увеличении значения CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли на 1,0 отмечается снижение риска летального исхода примерно в 3,33 раз; а также PD-L1 статус опухоли (HR=6,9; 95% CI: 1,8-26,6; p=0,005) – экспрессия PD-L1 в 6,9 раз повышала риск летального исхода у пациентов с АКР.

Медиана БРВ пациентов с классическим подтипами АКР составила 15 (4; 33) мес., пациентов с онкоцитарным подтипом – 27 (7; 53) мес., с миксоидным – 13 (3; 38) мес., со смешанным – 16,5 (3; 35,5) мес. Наиболее продолжительная 5-летняя БРВ была отмечена у пациентов с онкоцитарным подтипом АКР и составляла 62,0%, в случаях с классическим подтипом – 26,9%, при миксоидном и смешанном – 29,6% и 37,5%, соответственно. Зависимость риска развития рецидива от гистологического подтипа АКР была статистически значимой (p=0,03), данные различия обусловлены лучшей БРВ пациентов с онкоцитарным подтипом АКР в сравнении с пациентами с классическим подтипом опухоли (p=0,026).

Однолетняя БРВ пациентов при количестве CD45+ клеток в паренхиме опухоли выше медианы (66 клеток/мм²) составила 67,0%, при количестве ниже медианы – 38,4% (p=0,013). Однолетняя БРВ пациентов при количестве CD45+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (132 клеток/мм²) составила 67,3%, при количестве ниже медианы – 42,2% (p=0,1).

Исследование одногодичной БРВ пациентов показало, что при наличии количества CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли, превышающей медианное значение (26 клеток/мм²), выживаемость составляет 63,4%, в то время как для пациентов с количеством клеток ниже медианного уровня, данный показатель составил 42,6% (p=0,031). При анализе CD3+ иммунных клеток в строме опухоли, выживаемость пациентов с показателем выше медианы составила 65,6%, в то время как при показателе ниже медианы – 47,3% (p=0,134).

При изучении однолетней БРВ пациентов было выявлено, что в группе больных с CD4+ иммунными клетками в паренхиме опухоли выше медианного уровня (2 клеток/мм²), процент

выживаемости составил 60,2%. Пациенты, имеющие количество CD4+ иммунных клеток ниже медианы, напротив, демонстрировали выживаемость на уровне 46,2% ($p=0,002$). Также было проведено исследование влияния CD4+ иммуноцитов в строме опухоли на БРВ. У пациентов с уровнем данного показателя выше медианного значения выживаемость составила 62,9%, в сравнении с 50,6% в группе со значением показателя ниже медианы ($p=0,285$).

Однолетняя БРВ пациентов при количестве CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли выше медианы (9 клеток/мм²) составила 64,3%, при количестве иммуноцитов ниже медианы – 43,9% ($p=0,031$). Однолетняя БРВ пациентов при количестве CD8+ иммунных клеток в строме опухоли выше медианы (29 клеток/мм²) составила 63,9%, при количестве ниже медианы – 47,4% ($p=0,263$).

Однолетняя БРВ выживаемость больных в группе с CD68+ иммунными клетками в паренхиме опухоли выше медианы составила 53,5%, в то время как выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток ниже медианы – 57,7% ($p=0,847$). Однолетняя БРВ больных в группе с CD68+ иммунными клетками в строме опухоли выше медианы составила 57,3%, в то время как выживаемость пациентов с количеством CD68+ иммунных клеток ниже медианы – 61,9% ($p=0,59$).

Также при проведении анализа влияния экспрессии маркера PD-L1 в образцах опухолевой ткани на продолжительность БРВ пациентов с АКР было выявлено, что у больных с наличием экспрессии данного маркера наблюдается более низкая БРВ, в сравнении с пациентами в опухолях которых экспрессии PD-L1 выявлено не было ($p<0,001$).

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что факторами влияющими на продолжительность БРВ больных АКР являются: уровень CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,5; 95% CI: 0,3-0,9; $p=0,018$) – увеличение значения CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли снижает риска развития рецидива в 2 раза; уровень CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,6; 95% CI: 0,3-0,9; $p=0,049$) – увеличение значения CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли снижает риска развития рецидива примерно в 1,7 раз; уровень CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,8; 95% CI: 0,7-0,9; $p=0,031$) – увеличение значения CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли снижает риска развития рецидива в 1,25 раз; уровень CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,5; 95% CI: 0,3-0,9; $p=0,037$) – увеличение значения CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли снижает риска развития рецидива в 2 раза; а также PD-L1 статус опухоли (HR=2,8; 95% CI: 1,54-4,57; $p=0,005$) – наличие экспрессии маркера PD-L1 в опухоли увеличивает риск рецидива АКР в 2,8 раз.

На заключительном этапе исследования были разработаны две прогностические математические модели. Модель для прогнозирования риска летального исхода ($p = 0,01$, χ^2) включает в себя комплекс из пяти значимых показателей: уровни CD45+ и CD68+ иммунных

клеток в паренхиме опухоли, а также уровни CD45+, CD8+ и CD68+ иммуноцитов в строме опухоли. С учетом представленных данных об эффективности работы полученной математической модели, рекомендовано ее использование для исключения летального исхода у пациентов с АКР. Модель для прогнозирования риска развития рецидива АКР ($p = 0,002$, χ^2) включает в себя шесть показателей: уровни CD45+, CD3+, CD4+ и CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли, а также уровни CD45+ и CD4+ иммуноцитов в строме опухоли.

Так, в представленном исследовании впервые был выполнен анализ состава иммунного микроокружения и его прогностического значения в различных морфологических подтипах АКР. В ходе данной работы мы пришли к выводу, что онкоцитарный гистологический подтип опухоли имеет значимо более выраженную иммунную инфильтрацию нежели классический подтип, что также ассоциировано с лучшей общей и безрецидивной выживаемостью пациентов с онкоцитарным подтипом АКР. Учитывая необходимость разработки новых прогностических критериев, которые помогут определять более агрессивные формы опухолей и способствовать более персонализированному подходу к ведению и лечению пациентов с АКР, полученные результаты могут найти применение в клинической практике. На основании проведенного исследования и полученных результатов, нами разработан индивидуальный прогностический алгоритм риска летального исхода и развития рецидива аденокарциномы (Схема А.1).

ВЫВОДЫ

1. Аденокортикальный рак характеризуется низкой иммунной инфильтрацией как в паренхиме, так и в строме опухоли – среднее количество CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли составляет 142 клетки/мм², в строме опухоли – 187 клеток/мм². Онкоцитарный гистологический подтип в сравнении с классическим подтипом аденокортикального рака характеризуется значимо более выраженной CD45+ иммунной инфильтрацией в паренхиме (310 vs 44 клетки/мм² соответственно; $p < 0,001$) и в строме (312 vs 68 клеток/мм² соответственно; $p < 0,001$) опухоли, CD3+ иммунной инфильтрацией в паренхиме опухоли (63 vs 17 клеток/мм² соответственно; $p < 0,001$), CD4+ иммунной инфильтрацией в паренхиме опухоли (9 vs 2 клетки/мм² соответственно; $p < 0,001$), а также CD8+ иммунной инфильтрацией в паренхиме опухоли (28 vs 6 клеток/мм² соответственно; $p = 0,003$).

2. Опухоли пациентов со смешанной гормональной активностью по сравнению с опухолями пациентов с гиперкортицизмом характеризуются более выраженной CD45+ иммунной инфильтрацией как в паренхиме (427 vs 38 клеток/мм² соответственно; $p = 0,01$), так и в строме опухоли (529 vs 80 клеток/мм² соответственно; $p = 0,013$). Также в образцах опухолевой ткани от пациентов со смешанной гормональной активностью по сравнению с группой с отсутствием гормональной активности отмечается более высокий уровень CD45+ иммуноцитов в строме опухоли (529 vs 121 клеток/мм² соответственно; $p = 0,043$), CD4+ иммуноцитов в паренхиме (9 vs 2 клетки/мм² соответственно; $p = 0,049$) и строме опухоли (67 vs 8 клеток/мм² соответственно; $p = 0,028$). У пациентов с аденокортикальным раком без признаков отдаленного метастазирования опухоли (M0) наблюдается более высокий уровень CD68+ иммунной инфильтрации в паренхиме опухоли по сравнению с пациентами с выявленными признаками метастазирования (72 vs 16 клеток/мм² соответственно; $p = 0,009$).

3. В PD-L1-позитивных аденокортикальных карциномах отмечается менее выраженная CD68+ иммунная инфильтрация в паренхиме опухоли в сравнении с PD-L1-негативными образцами (3 vs 72 клетки/мм² соответственно; $p = 0,008$), в то же время пациенты с PD-L1-позитивными опухолями демонстрируют более низкую общую ($p < 0,001$) и безрецидивную выживаемость ($p < 0,001$).

4. Факторами достоверно влияющими на общую выживаемость пациентов с аденокортикальным раком являются: морфологический подтип АКР ($p = 0,008$), уровень CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,2; 95% CI: 0,05-0,69; $p = 0,011$), уровень CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,5; 95% CI: 0,34-0,9; $p = 0,05$), уровень CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,8; 95% CI: 0,68-0,97; $p = 0,049$), уровень CD8+

иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,3; 95% CI: 0,09-0,89; p=0,023), а также PD-L1 статус опухоли (HR=6,9; 95% CI: 1,8-26,6; p=0,005).

5. Факторами достоверно влияющими на безрецидивную выживаемость пациентов с аденокортикальным раком являются: морфологический подтип АКР (p=0,03), уровень CD45+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,5; 95% CI: 0,3-0,9; p=0,018), уровень CD3+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,6; 95% CI: 0,3-0,9; p=0,049), уровень CD4+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,8; 95% CI: 0,7-0,9; p=0,031), уровень CD8+ иммунных клеток в паренхиме опухоли (HR=0,5; 95% CI: 0,3-0,9; p=0,037), а также PD-L1 статус опухоли (HR=2,8; 95% CI: 1,54-4,57; p=0,005).

6. Разработанные математические модели, основанные на иммуногистохимической оценке иммунного инфильтрата опухоли позволяют производить прогнозирование риска летального исхода (p=0,01, χ^2) и риска развития рецидива (p=0,002, χ^2) у пациентов с аденокортикальным раком.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для прогнозирования клинического течения аденокортикального рака в дополнение к морфологическому исследованию рекомендуется проведение иммуногистохимического исследования с антителами к CD45, CD3, CD4 и CD8.

2. Иммуногистохимическая оценка экспрессии CD68 в паренхиме опухоли может косвенно указывать на вероятность метастазирования аденокортикального рака.

3. Всем пациентам с аденокортикальным раком необходимо проводить иммуногистохимическое исследование с маркером к PD-L1, поскольку экспрессия данного маркера является значимым независимым неблагоприятным фактором летального исхода и рецидива данного заболевания.

4. При выборе тактики ведения пациентов с аденокортикальным раком для оценки риска летального исхода и рецидива обсуждаемого заболевания рекомендуется применение разработанных математических моделей (Схема А.1).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АД – артериальное давление
- АКР – адренкортикальный рак
- АПК – антигенпрезентирующие клетки
- БРВ – безрецидивная выживаемость
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ДК – дендритные клетки
- ДС - диагностическая специфичность
- ДЧ - диагностическая чувствительность
- ИГХ – иммуногистохимическое (исследование)
- КРР – колоректальный рак
- ОАА – опухлеассоциированные антигены
- ОАМ – опухлеассоциированные макрофаги
- ОВ – общая выживаемость
- ПЦОР - прогностическая ценность отрицательного результата
- ПЦПР - прогностическая ценность положительного результата
- РКИ – рандомизированное контролируемое исследование
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты
- АJСС – Американский объединенный комитет по злокачественным опухолям (англ. American Joint Commission on Cancer)
- СI – доверительный интервал (англ. confidence interval)
- СТLA-4 – гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (англ. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)
- СYP3A4 – Цитохром P450 3A4 (англ. Cytochrome P450 3A4)
- ENSAT – Европейская сеть по изучению опухолей надпочечников (англ. European Network for the Study of Adrenal Tumors)
- ESE – Европейское общество эндокринологов (англ. European Society of Endocrinology)
- HPF – поле высокой мощности (англ. high-power field)
- HR – отношение рисков (англ. hazard ratio)
- IFN γ – интерферон-гамма (англ. interferon- γ)
- Ig – иммуноглобулин (англ. immunoglobulin)
- IL – интерлейкин (англ. Interleukin)

MCH I, MCH II – главный комплекс гистосовместимости I, II класса (англ. major histocompatibility complex)

MSI – микросателлитная нестабильность (англ. microsatellite instability)

NK-клетки – естественные киллеры (англ. natural killer cells)

PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели 1 (англ. Programmed (cell) Death

PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 (англ. Programmed (cell) Death Ligand 1)

PHH3 - фосфогистон H3 (англ. phosphohistone H3)

RNA-seq – секвенирование РНК (англ. RNA sequencing)

SEER – Программа эпиднадзора, эпидемиологии и конечных результатов Национального института рака США (англ. the Surveillance, Epidemiology, and End Results)

SF-1 - стероидогенный фактор 1 (англ. steroidogenic factor 1)

SOAT1 – фермент стерол-О-ацилтрансфераза-1 (англ. sterol O-acyltransferase 1)

TCGA – Атлас генома рака (англ. The Cancer Genome Atlas)

TGF- β – трансформирующий фактор роста бета (англ. transforming growth factor beta)

Th – Т-хелперы (англ. T-helper cells)

TIL – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (англ. tumor infiltrating lymphocytes)

TME – опухолевое микроокружение (англ. tumor microenvironment)

UICC – Международный союз по борьбе с онкологическими заболеваниями (англ. International Union Against Cancer)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адrenокортикальный рак: морфологические варианты, иммуногистохимическая характеристика / А.В. Ткачук, А.С. Тертычный, Д.Г. Бельцевич [и др.] // Архив патологии. – 2021. – Т.83. – №2. – С. 10-18.
2. Адrenокортикальный рак: поздняя диагностика заболевания на примере клинического случая / Е.А. Колпакова, Н.В. Молашенко, А.Р. Левшина, Н.В. Пачуашвили [и др.] // Терапевтический архив. – 2023. – Т.95 – №12. – С. 1133-1138.
3. Адrenокортикальный рак: современные представления о морфологической диагностике и классификации / Л.С. Урусова, И.С. Клецкая, Э.Э. Порубаева [и др.] // Архив патологии. – 2023. – Т.85. – №4. – С. 32-38.
4. Бельцевич, Д.Г. Проект клинических рекомендаций «Инциденталом надпочечника» / Д.Г. Бельцевич, Е.А. Трошина, Г.А. Мельниченко // Эндокринная хирургия. – 2021. – Т.15. – №1. – С. 4-26.
5. Боголюбова-Кузнецова, А.В. Молекулярные, гистологические и иммунологические особенности редких форм рака щитовидной железы : специальность 03.03.03 «Иммунология» : диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Боголюбова-Кузнецова Аполлинария Васильевна ; Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта. – Москва, 2019. – 121 с.
6. Данилова, Н.В. Разработка молекулярной классификации рака желудка : специальность 3.3.2 «Патологическая анатомия»; 3.1.6 «Онкология, лучевая терапия» : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Данилова Наталья Владимировна ; МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова. – Москва, 2023. – 490 с.
7. Данилова, Н.В. Разработка молекулярной классификации рака желудка : специальность 3.3.2 «Патологическая анатомия»; 3.1.6 «Онкология, лучевая терапия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Данилова Наталья Владимировна ; МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова. – Москва, 2023. – 42 с.
8. Демура, Т.А. Морфофункциональные и молекулярно-генетические особенности недифференцированной формы дисплазии соединительной ткани в акушерско-гинекологической практике: специальность 14.03.02 «Патологическая анатомия»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Демура Татьяна Александровна ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2014. – 224 с.

9. Динамика изменений тумор-ассоциированных макрофагов у пациентов с первичной меланомой кожи в зависимости от способа хирургического лечения / С.А. Яргуни, И.В. Решетов, Я.Н. Шойхет [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2023. – Т.13. – №2. – С. 12-28.
10. Злокачественные новообразования в России в 2021 году: (заболеваемость и смертность) / под редакцией А.Д. Каприна [и др.]. – Москва: МНИОИ им. П. А. Герцена – фил. ФГБУ "НМИРЦ" Минздрава России, 2022. – 251 с.– ISBN 978-5-85502-280-3.
11. Игрункова, А.В. Морфологическое обоснование эффективности применения NO-содержащих газовых потоков и донора оксида азота – ДНКЖ для стимуляции раневого заживления : специальность 14.03.02 «Патологическая анатомия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Игрункова Александра Валерьевна; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2022. – 173 с.
12. Иммуногистохимическая экспрессия маркеров RRM1, CYP2W1, SOAT1 как фактор, определяющий чувствительность аденокортикального рака к терапии митотаном / А.В. Ткачук, Д.Г. Бельцевич, Э.Э. Порубаева, Л.С. Урусова // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68. – №3. – С. 129-130.
13. Иммунотерапия опухолей, основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов») / А.В. Боголюбова, Г.А. Ефимов, М.С. Друцкая [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17. – №5. – С. 395-406.
14. Индолентное течение аденокортикального рака: клинико-морфологическая характеристика 7 больных / В.Ю. Бохян, А.И. Павловская, А.А. Коломейцева [и др.] // Эндокринная хирургия. – 2016. – Т.10. – №4. – С. 13-19.
15. Клиническая оценка гистологических систем диагностики аденокортикальных опухолей / В.Ю. Бохян, А.И. Павловская, Г.И. Губина [и др.] // Архив патологии. – 2015. – Т.77. – №3. – С. 17-22.
16. Кривошеев, А.В. Лапароскопическая адреналэктомия в хирургическом лечении аденокортикального рака / А.В. Кривошеев, Т.А. Бритвин, М.Е. Белошицкий // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2019. – №1. – С. 75-78.
17. Кутукова, С.И. Персонализированный подход к выбору тактики лечения больных злокачественными новообразованиями челюстно-лицевой области и шеи на основе наиболее значимых клинических и молекулярных маркеров: специальность 14.01.14 «Стоматология»; 14.01.12 «Онкология»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Кутукова Светлана Игоревна ; ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России. – Санкт-Петербург, 2022. – 390 с.

18. Метастатическое поражение легких при аденокортикальном раке (редкое наблюдение) / Н.В. Нуднов, Н.В. Черниченко, Я.Ю. Мурзин [и др.] // Медицинская визуализация. – 2018. – Т.22. – №6. – С. 33-39.
19. Метастатическое поражение надпочечников. Опыт НМИЦ Эндокринологии / Н.В. Пачуашвили, А.А. Рослякова, Э.Э. Порубаева [и др.] // Проблемы Эндокринологии. – 2023. – Т.69. – №3. – С. 11-20.
20. Микроокружение опухоли: формирование иммунного профиля / Е.К. Олейник, М.И. Шibaев, К.С. Игнатьев [и др.] // Медицинская иммунология. – 2020. – Т.22. – №2. – С. 207-220.
21. Молекулярно-генетические маркеры и критерии прогноза аденокортикального рака / Л.С. Селиванова, А.А. Рослякова, А.В. Боголюбова [и др.] // Архив патологии. – 2019. – Т.81. – №5. – С. 92-96.
22. Морфологические предикторы эффективности терапии митотаном при аденокортикальном раке / А.В. Ткачук, Д.Г. Бельцевич, Э.Э. Порубаева [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2022. – Т.68. – №6. – С. 76-88.
23. Мультифакторная оценка прогностических особенностей аденокортикального рака / Э.Э. Порубаева, Н.В. Пачуашвили, Л.С. Урусова [и др.] // Архив патологии. – 2022. – Т.84. – №5. – С. 20-27.
24. Онкоцитарная аденокортикальная опухоль надпочечника / Л.С. Селиванова, Ф.М. Абдулхабирова, И.А. Воронкова [и др.] // Архив патологии. – 2015. – Т.77. – №1. – С. 55-59.
25. Особенности морфологической диагностики и определение злокачественного потенциала аденокортикальных опухолей у детей / И.С. Клецкая, Д.В. Рогожин, Д.М. Коновалов [и др.] // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2018. — Т.17. – №3. — С. 111-119.
26. Пачуашвили, Н.В. Иммунное микроокружение опухоли как перспектива таргетной терапии аденокортикального рака / Н.В. Пачуашвили, Э.Э. Порубаева, Л.С. Урусова. – Текст: непосредственный // Алмазовский международный медицинский форум: материалы V Инновационного Петербургского медицинского форума / Трансляционная медицина. – Санкт-Петербург, 2022. – С. 276-277.
27. Пачуашвили, Н.В. Поиск новых мишеней для терапии аденокортикального рака / Н.В. Пачуашвили, Э.Э. Порубаева, Л.С. Урусова // Вопросы онкологии. – 2022. — Т.68. – №3. – С. 159-160.
28. Пачуашвили, Н.В. Поиски новых мишеней для терапии аденокортикального рака / Н.В. Пачуашвили, А.В. Боголюбова-Кузнецова, Л.С. Урусова. – Текст: непосредственный // Современная патологическая анатомия: научно-практический опыт, пути совершенствования и инновационные технологии морфологической диагностики, роль в клинической практике,

актуальные проблемы и перспективы развития: материалы IV Съезда патологоанатомов республики Беларусь с международным участием. – Минск, 2022. – С.258-262.

29. Пачуашвили, Н.В. Прогностическое значение субпопуляций опухолевидно-инфильтрирующих Т-лимфоцитов, макрофагов и PD-L1 статус в различных вариантах аденокарциномы / Н.В. Пачуашвили, Э.Э. Порубаева. – Текст: непосредственный // Медицинская весна – 2021: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Москва, 2021. – С.359-361.

30. Пипиа, Н.П. Изучение эффекторной функции лимфоцитов больных с саркомами мягких тканей в опухолевом микроокружении *in vitro*: специальность 14.01.12 «Онкология»; 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Пипиа Нино Петровна ; ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. – Санкт-Петербург, 2018. – 168 с.

31. Порубаева, Э.Э. Мультифакторная оценка прогностических особенностей аденокарциномы / Э.Э. Порубаева, Н.В. Пачуашвили, Л.С. Урусова. – Текст: непосредственный // Современная патологическая анатомия: научно-практический опыт, пути совершенствования и инновационные технологии морфологической диагностики, роль в клинической практике, актуальные проблемы и перспективы развития: материалы IV Съезда патологоанатомов республики Беларусь с международным участием. – Минск, 2022. – С.280-283.

32. Прогностическая значимость экспрессии PD-L1 как потенциального предиктора выживаемости при раке желудка / Т.Н. Сотникова, Н.В. Данилова, П.Г. Мальков [и др.] // Архив патологии. – 2023. – Т.85. – №4. – С. 18-23.

33. Прогностическое значение клинико-патологических маркеров аденокарциномы / Э.Э. Порубаева, Н.В. Пачуашвили, А.В. Ткачук [и др.] // Вопросы онкологии. – 2022. – Т.68. – №3. – С. 120.

34. Результаты иммуногистохимического исследования антител к CYP11B2 при первичном гиперальдостеронизме / Н.Ю. Романова, Л.С. Селиванова, Н.М. Платонова [и др.] // Ожирение и метаболизм. – 2021. – Т.18 – №3. – С.245-253.

35. Слащук, К.Ю. Технологии функционально-топической визуализации в комплексной диагностике гиперпаратиреоза : специальность 3.1.19 «Эндокринология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Слащук Константин Юрьевич ; ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. – Москва, 2021. – 44 с.

36. Современные возможности применения стероидного профиля мочи для диагностики аденокарциномы / И.Е. Щербаков., Р.А. Черников, В.Ф. Русаков [и др.]. // Эндокринная хирургия. – 2020. — Т.14. – №1. – С. 4-13.

37. Современные критерии диагностики аденокортикального рака / Л.С. Селиванова, А.А. Рослякова, Ю.А. Коваленко [и др.] // Архив патологии. – 2019. – Т.81. – №3. – С. 66-73.
38. Современные опции и перспективы системной терапии местнораспространенного и метастатического аденокортикального рака / Я.А. Жуликов, Е.И. Коваленко, В.Ю. Бохян [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2021. – Т.11. – №3. – С. 36-44.
39. Текущий статус лекарственной терапии аденокортикального рака / С.Н. Фогт, В.В. Калугина, Н.В. Ворохобина [и др.] // Медицинский вестник Юга России. – 2022. – Т.13. – №2. – С. 154-161.
40. Урусова, Л.С. Морфологические, иммуногистохимические, молекулярногенетические диагностические характеристики и факторы прогноза аденокортикального рака : специальность 3.1.19 «Эндокринология»; 3.3.2 «Патологическая анатомия» : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Урусова Лилия Сергеевна ; ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2023. – 305 с.
41. Урусова, Л.С. Морфологические, иммуногистохимические, молекулярногенетические диагностические характеристики и факторы прогноза аденокортикального рака : специальность 3.1.19 «Эндокринология»; 3.3.2 «Патологическая анатомия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Урусова Лилия Сергеевна ; ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2023. – 44 с.
42. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению аденокортикального рака / Г.А. Мельниченко, И.С. Стилиди, Б.Я. Алексеев [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2014. – Т.60. – №2. – С. 2.
43. Экспрессия маркеров пролиферации, апоптоза и рецепторов стероидных гормонов в эндометрии при акромегалии: есть ли онкологический потенциал? / Г.А. Мельниченко, И.В. Станоевич, Л.С. Селиванова [и др.] // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2019. – Т.18. – №1. – С. 28-35.
44. Эффективность химиотерапии по схеме EDP±митотан в лечении метастатического аденокортикального рака. Предиктивные и прогностические факторы эффективности / Я.А. Жуликов, Е.И. Коваленко, В.Ю. Бохян [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2021. – Т.11. – №1. – С. 37-46.
45. Яшина, Д.П. Молекулярно-генетические аспекты аденокортикального рака / Д.П. Яшина, З.А. Афанасьева // Успехи молекулярной онкологии – 2023. – Т.10. – №2. – С. 42–57.

46. A nomogram for individualized estimation of survival among adult patients with adrenocortical carcinoma after surgery: a retrospective analysis and multicenter validation study. / J. Kong, J. Zheng, J. Cai [et al.] // *Cancer communications*. – 2019. – Vol.39. – №1. – P.80.
47. A novel staging system for adrenocortical carcinoma better predicts survival in patients with stage I/II disease. / E.A. Asare, T.S. Wang, D.P. Winchester, [et al.] // *Surgery*. – 2014. – Vol. 156. – № 6. – P. 1376-1378.
48. Abdel-Rahman, O. Revisiting the AJCC staging system of adrenocortical carcinoma. / O. Abdel-Rahman // *Journal of endocrinological investigation*. – 2022. – Vol. 45. – № 1. – P. 89-94.
49. Adjuvant therapies and patient and tumor characteristics associated with survival of adult patients with adrenocortical carcinoma / T. Else, A.R. Williams, A. Sabolch, [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2014. – Vol. 99. – № 2. – P. 455-461.
50. Adrenocortical carcinoma - 12-year observation period in a single centre. Case report with literature review / P. Dasiewicz, E. Moszczyńska, D. Perek, [et al.] // *Pediatric endocrinology, diabetes, and metabolism*. – 2023. – Vol. 29. – № 3. – P. 202-208.
51. Adrenocortical carcinoma / T. Else, A.C. Kim, A. Sabolch, [et al.] // *Endocrine reviews*. – 2014. – Vol. 35. – № 2. – P. 282-326.
52. Adrenocortical carcinoma: a literature review / A. Thampi, E. Shah, G. Elshimy, [et al.] // *Translational cancer research*. – 2020. – Vol. 9. – № 2. – P. 1253-1264.
53. Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center / M. Ayala-Ramirez, S. Jasim, L. Feng, [et al.] // *European journal of endocrinology*. – 2013. – Vol. 169. – № 6. – P. 891-899.
54. Adrenocortical carcinoma: presentation and outcome of a contemporary patient series / I. Kostianen, L. Hakaste, P. Kejo, [et al.] // *Endocrine*. – 2019. – Vol. 65. – № 1. – P. 166-174.
55. Adrenocortical carcinomas and malignant pheochromocytomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / M. Fassnacht, G. Assie, E. Baudin, [et al.] // *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2020. – Vol. 31. – № 11. – P. 1476-1490.
56. Adrenocortical oncocytic tumors: report of 10 cases and review of the literature / M. Bisceglia, O. Ludovico, A. Di Mattia, [et al.] // *International journal of surgical pathology*. – 2004. – Vol. 12. – № 3. – P. 231-243.
57. Advanced Adrenocortical Carcinoma - What to do when First-Line Therapy Fails? / F. Megerle, M. Kroiss, S. Hahner, [et al.] // *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. – 2019. – Vol. 127. – № 2-03. – P. 109-116.

58. Advances in pharmacokinetics and pharmacodynamics of PD-1/PD-L1 inhibitors / T. Yan, L. Yu, D. Shangguan, [et al.] // *International immunopharmacology*. – 2023. – Vol. 115. – P. 109638.
59. Advantages of targeting the tumor immune microenvironment over blocking immune checkpoint in cancer immunotherapy / T. Tang, X. Huang, G. Zhang, [et al.] // *Signal transduction and targeted therapy*. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 72.
60. Ai, L. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond / L. Ai, A. Xu, J. Xu // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2020. – Vol. 1248. – P. 33-59.
61. Alyateem, G. Current Status and Future Targeted Therapy in Adrenocortical Cancer / G. Alyateem, N. Nilubol // *Frontiers in Endocrinology*. – 2021. – Vol. 12.
62. Arneth, B. Tumor Microenvironment. / B. Arneth // *Medicina*. – 2019. – Vol. 56. – № 1.
63. Association between PD1 mRNA and response to anti-PD1 monotherapy across multiple cancer types / L. Paré, T. Pascual, E. Seguí, [et al.] // *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2018. – Vol. 29. – № 10. – P. 2121-2128.
64. Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma / A. Ribas, O. Hamid, A. Daud, [et al.] // *JAMA*. – 2016. – Vol. 315. – № 15. – P. 1600-1609.
65. Association of tumor size with metastatic potential and survival in patients with adrenocortical carcinoma: an analysis of the National Cancer Database / D.J. Canter, K. Mallin, R. G. Uzzo, [et al.] // *The Canadian journal of urology*. – 2013. – Vol. 20. – № 5. – P. 6915-6921.
66. Avelumab in patients with previously treated metastatic adrenocortical carcinoma: phase 1b results from the JAVELIN solid tumor trial / C. Le Tourneau, C. Hoimes, C. Zarwan, [et al.] // *Journal for immunotherapy of cancer*. – 2018. – Vol. 6. – № 1. – P. 111.
67. Barnes, T.A. HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer / T.A. Barnes, E. Amir // *British Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 117. – № 4. – P. 451-460.
68. Benefits of Adjuvant Mitotane after Resection of Adrenocortical Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. / Y. Tang, Z. Liu, Z. Zou, [et al.] // *BioMed research international*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 9362108.
69. Bioinformatic analyses and experimental validation of the role of m6A RNA methylation regulators in progression and prognosis of adrenocortical carcinoma. / F. Xu, Y. Guan, Y. Ma, [et al.] // *Aging*. – 2021. – Vol. 13. – № 8. – P. 11919-11941.
70. Bronimann, S. Treatment of adrenocortical carcinoma: oncological and endocrine outcomes / S. Bronimann, N. Garstka, M. Remzi // *Current opinion in urology*. – 2023. – Vol. 33. – № 1. – P. 50-58.

71. Bruni, D. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy / D. Bruni, H.K. Angell, J. Galon // *Nature Reviews Cancer*. – 2020. – Vol. 20. – № 11. – P. 662-680.
72. Buller, D.M. Open versus minimally invasive surgery for suspected adrenocortical carcinoma / D.M. Buller, A.M. Hennessey, B.T. Ristau // *Translational andrology and urology*. – 2021. – Vol. 10. – № 5. – P. 2246-2263.
73. Cain, D.W. Immune regulation by glucocorticoids / D.W. Cain, J.A. Cidlowski // *Nature Reviews Immunology*. – 2017. – Vol. 17. – № 4. – P. 233-247.
74. Carcinoembryonic antigen-specific but not antiviral CD4+ T cell immunity is impaired in pancreatic carcinoma patients / E. Tassi, F. Gavazzi, L. Albarello, [et al.] // *Journal of immunology*. – 2008. – Vol. 181. – № 9. – P. 6595-6603.
75. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival / C. Gu-Trantien, S. Loi, S. Garaud, [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2013. – Vol. 123. – № 7. – P. 2873-2892.
76. Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma / X. Wang, G. Guo, H. Guan, [et al.] // *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*. – 2019. – Vol. 38. – № 1. – P. 87.
77. Characteristics of adrenocortical carcinoma in South Korea: a registry-based nationwide survey / J. S. Lim, S.-E. Lee, J. H. Kim, [et al.] // *Endocrine connections*. – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 519-529.
78. Clinical Impact of Pathological Features Including the Ki-67 Labeling Index on Diagnosis and Prognosis of Adult and Pediatric Adrenocortical Tumors / S.N. Martins-Filho, M.Q. Almeida, I. Soares, [et al.] // *Endocrine pathology*. – 2021. – Vol. 32. – № 2. – P. 288-300.
79. Clinical, Biochemical, and Radiological Characteristics of a Single-Center Retrospective Cohort of 705 Large Adrenal Tumors / N.M. Iñiguez-Ariza, J.D. Kohlenberg, D.A. Delivanis, [et al.] // *Mayo Clinic proceedings. Innovations, quality & outcomes*. – 2018. – Vol. 2. – № 1. – P. 30-39.
80. Combination Chemotherapy in Advanced Adrenocortical Carcinoma / M. Fassnacht, M. Terzolo, B. Allolio, [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2012. – Vol. 366. – № 23. – P. 2189-2197.
81. Comparative diagnostic and prognostic performances of the hematoxylin-eosin and phosphohistone H3 mitotic count and Ki-67 index in adrenocortical carcinoma / E. Duregon, L. Molinaro, M. Volante, [et al.] // *Modern Pathology*. – 2014. – Vol. 27. – № 9. – P. 1246-1254.
82. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy / B. Li, E. Severson, J.C. Pignon, [et al.] // *Genome biology*. – 2016. – Vol. 17. – № 1. – P. 174.

83. Conserved pan-cancer microenvironment subtypes predict response to immunotherapy / A. Bagaev, N. Kotlov, K. Nomie, [et al.] // *Cancer Cell*. – 2021. – Vol. 39. – P. 186-191.
84. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence / M. Camus, M. Tosolini, B. Mlecnik, [et al.] // *Cancer research*. – 2009. – Vol. 69. – № 6. – P. 2685-2693.
85. Cytological diagnosis of adrenocortical carcinoma: A report of 2 cases in children / B. Kanjilal, M. Ghosh, A. Mitra, [et al.] // *Diagnostic cytopathology*. – 2018. – Vol. 46. – № 12. – P. 1064-1067.
86. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry / A.M. Newman, C.B. Steen, C.L. Liu, [et al.] // *Nature biotechnology*. – 2019. – Vol. 37. – № 7. – P. 773-782.
87. Development and Internal Validation of a Multivariable Prediction Model for Adrenocortical-Carcinoma-Specific Mortality / M.H.T. Ettaieb, S.M.J. van Kuijk, A. de Wit-Pastors, [et al.] // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12. – № 9.
88. Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Adrenal Cortical Carcinoma / O. Mete, H. Gucer, M. Kefeli, [et al.] // *The American journal of surgical pathology*. – 2018. – Vol. 42. – № 2. – P. 201-213.
89. Diagnostic and prognostic role of steroidogenic factor 1 in adrenocortical carcinoma: a validation study focusing on clinical and pathologic correlates / E. Duregon, M. Volante, J. Giorcelli, [et al.] // *Human Pathology*. – 2013. – Vol. 44. – № 5. – P. 822-828.
90. Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways / Y.L. Zhang, J. Li, H.Y. Mo, [et al.] // *Molecular cancer*. – 2010. – Vol. 9. – P. 4.
91. Dissecting Morphological and Molecular Heterogeneity in Adrenocortical Carcinoma / E. Duregon, M. Volante, I. Rapa, [et al.] // *Turk patoloji dergisi*. – 2015. – Vol. 31. – №1. – P. 98-104.
92. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer / F. Pagès, A. Berger, M. Camus, [et al.] // *The New England journal of medicine*. – 2005. – Vol. 353. – № 25. – P. 2654-2666.
93. Efficacy and safety of pembrolizumab in patients with advanced adrenocortical carcinoma / N.P. Raj, Y. Zheng, V. Kelly, [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2019. – Vol. 37. – № 15. – P. 4112.
94. Epidemiological risk factors for adrenocortical carcinoma: A hospital-based case-control study / M.A. Habra, M.A. Sukkari, A. Hasan, [et al.] // *International journal of cancer*. – 2020. – Vol. 146. – № 7. – P. 1836-1840.
95. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression / E. Becht, N.A. Giraldo, L. Lacroix, [et al.] // *Genome Biology*. – 2016. – Vol. 17. – № 1. – P. 218.
96. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of

Adrenal Tumors / M. Fassnacht, O. Dekkers, T. Else, [et al.] // *European journal of endocrinology*. – 2018. – Vol. 179. – № 4. – P. G1-G46.

97. Evaluation of Necrosis as a Diagnostic and Prognostic Indicator in Adrenocortical Carcinoma. / S. S. Pearlstein, P. C. Conroy, K. C. Menut, [et al.] // *JAMA surgery*. – 2021. – Vol. 156. – № 12. – P. 1173-1174.

98. Evaluations of interferon- γ /interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients / H. Ubukata, G. Motohashi, T. Tabuchi, [et al.] // *Journal of surgical oncology*. – 2010. – Vol. 102. – № 7. – P. 742-747.

99. Fassnacht, M. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification / M. Fassnacht, S. Johanssen, M. Quinkler // *Cancer*. – 2009. – Vol. 115. – № 2. – P. 243-250.

100. FOXP3 and survival in urinary bladder cancer / M.E. Winerdal, P. Marits, M. Winerdal, [et al.] // *BJU international*. – 2011. – Vol. 108. – № 10. – P. 1672-1678.

101. Fridman, W.H. The immune contexture in cancer prognosis and treatment / W.H. Fridman, L. Zitvogel, C. Sautès-Fridman, G. Kroemer // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 14. – № 12. – P. 717-734.

102. Future Directions in Diagnosis, Prognosis and Disease Monitoring of Adrenocortical Carcinoma: Novel Non-Invasive Biomarkers / Y. Cheng, W. Kou, D. Zhu, [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2022. – Vol. 12.

103. Genomic and Clinical Correlates of Adrenocortical Carcinoma in an Adult Patient with Li-Fraumeni Syndrome: A Case Report / S. Bondy, C. Tajzler, S.J. Hotte, [et al.] // *Current oncology*. – 2020. – Vol. 28. – № 1. – P. 226-232.

104. Glucocorticoids augment survival and proliferation of tumor cells / S. Gündisch, E. Boeckeler, U. Behrends, [et al.] // *Anticancer research*. – 2012. – Vol. 32. – № 10. – P. 4251-4261.

105. Guo, L. Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) Inhibitor for Targeted Immunotherapy in Tumor / L. Guo, H. Zhang, B. Chen // *Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 8. – № 3. – P. 410-416.

106. Han, Y. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer / Y. Han, D. Liu, L. Li // *American journal of cancer research*. – 2020. – Vol. 10. – № 3. – P. 727-742.

107. Helsinki score-a novel model for prediction of metastases in adrenocortical carcinomas. / M. Pennanen, I. Heiskanen, T. Sane, [et al.] // *Human pathology*. – 2015. – Vol. 46. – № 3. – P. 404-410.

108. High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors / S. Sbiera, S. Schull, G. Assie, [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2010. – Vol. 95. – № 10. – P. E161-171.

109. Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer / N.K. Yoon, E.L. Maresh, D. Shen, [et al.] // *Human pathology*. – 2010. – Vol. 41. – № 12. – P. 1794-1801.

110. Hinshaw, D.C. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression / D.C. Hinshaw, L.A. Shevde // *Cancer research*. – 2019. – Vol. 79. – № 18. – P. 4557-4566.
111. Hui, L. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil / L. Hui, Y. Chen // *Cancer letters*. – 2015. – Vol. 368. – № 1. – P. 7-13.
112. Identification of prognostic genes in adrenocortical carcinoma microenvironment based on bioinformatic methods / X. Li, Y. Gao, Z. Xu, [et al.] // *Cancer medicine*. – 2020. – Vol. 9. – № 3. – P. 1161-1172.
113. Identification of tumor-infiltrating immune cells and prognostic validation of tumor-infiltrating mast cells in adrenocortical carcinoma: results from bioinformatics and real-world data / X. Tian, W. Xu, Y. Wang, [et al.] // *OncoImmunology*. – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 1784529.
114. Identifying Immune-Specific Subtypes of Adrenocortical Carcinoma Based on Immunogenomic Profiling / Q. Lu, R. Nie, J. Luo, [et al.] // *Biomolecules*. – 2023. – Vol. 13. – № 1.
115. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy / X. Lei, Y. Lei, J.K. Li, [et al.] // *Cancer letters*. – 2020. – Vol. 470. – P. 126-133.
116. Immunotherapy against endocrine malignancies: immune checkpoint inhibitors lead the way / L.L. Cunha, M.A. Marcello, V. Rocha-Santos, [et al.] // *Endocrine-related cancer*. – 2017. – Vol. 24. – № 12. – P. T261-T281.
117. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients / X. Chen, J. Wan, J. Liu, [et al.] // *Lung cancer*. – 2010. – Vol. 69. – № 3. – P. 348-354.
118. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients / J.P. Zhang, J. Yan, J. Xu, [et al.] // *Journal of hepatology*. – 2009. – Vol. 50. – № 5. – P. 980-989.
119. Influence of hormonal functional status on survival in adrenocortical carcinoma: systematic review and meta-analysis / T. Vanbrabant, M. Fassnacht, G. Assie, [et al.] // *European journal of endocrinology*. – 2018. – Vol. 179. – № 6. – P. 429-436.
120. International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Endocrine and Neuroendocrine tumours. — Lyon (France), 2022.
121. Interplay between glucocorticoids and tumor-infiltrating lymphocytes on the prognosis of adrenocortical carcinoma / L.S. Landwehr, B. Altieri, J. Schreiner, [et al.] // *Journal for immunotherapy of cancer*. – 2020. – Vol. 8. – № 1.
122. Interplay between Immune Cell Infiltration and Tumor Histological Subtype: A Case of Adrenocortical Cancer / A.V. Bogolyubova, N.V. Pachuashvili, A.V. Tkachuk, [et al.] // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14.

123. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer / L. De Monte, M. Reni, E. Tassi, [et al.] // *The Journal of experimental medicine*. – 2011. – Vol. 208. – № 3. – P. 469-478.
124. Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients / J. Chen, J. Xia, X. Liang, [et al.] // *International journal of biological sciences*. – 2015. – Vol. 7. – № 1. – P. 53-60.
125. Jasim, S. Management of Adrenocortical Carcinoma / S. Jasim, M.A. Habra // *Current oncology reports*. – 2019. – Vol. 21. – № 3. – P. 20.
126. Jiménez-Sánchez, A. Comprehensive Benchmarking and Integration of Tumor Microenvironment Cell Estimation Methods / A. Jiménez-Sánchez, O. Cast, M.L. Miller // *Cancer Research*. – 2019. – Vol. 79. – № 24. – P. 6238 - 6246.
127. Jouinot, A. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Adrenocortical carcinoma: differentiating the good from the poor prognosis tumors / A. Jouinot, J. Bertherat // *European journal of endocrinology*. – 2018. – Vol. 178. – № 5. – P. 215-230.
128. Kenney, L. Adrenocortical Carcinoma: Role of Adjuvant and Neoadjuvant Therapy / L. Kenney, M. Hughes // *Surgical oncology clinics of North America*. – 2023. – Vol. 32. – № 2. – P. 279-287.
129. Kim, S.K. The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment / S.K. Kim, S.W. Cho // *Frontiers in pharmacology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 868695.
130. Kiriyaama, Y. Regulation of PD-L1 Expression by Nuclear Receptors / Y. Kiriyaama, H. Nochi // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 12.
131. Lam, A.K.Y. Adrenocortical carcinoma: Updates of clinical and pathological features after renewed world health organisation classification and pathology staging / A.K.Y. Lam // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. 1-25.
132. Li, Y. Hypoxia and the Tumor Microenvironment / Y. Li, L. Zhao, X.F. Li // *Technology in cancer research & treatment*. – 2021. – Vol. 20. – P. 15330338211036304.
133. Long-Term Outcomes of Adjuvant Mitotane Therapy in Patients with Radically Resected Adrenocortical Carcinoma / A. Berruti, S. Grisanti, A. Pulzer, [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2017. – Vol. 102. – № 4. – P. 1358-1365.
134. Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection / F. Beuschlein, J. Weigel, W. Saeger, [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2015. – Vol. 100. – № 3. – P. 841-849.
135. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors / M. Fassnacht,

W. Arlt, I. Bancos, [et al.] // *European journal of endocrinology*. – 2016. – Vol. 175. – № 2. – P. G1-G34.

136. Minimally Invasive Surgery for Resectable Adrenocortical Carcinoma: A Nationwide Analysis / A.M. Delman, K.M. Turner, A. Griffith, [et al.] // *The Journal of surgical research*. – 2022. – Vol. 279. – P. 200-207.

137. Mitotane Concentrations Influence Outcome in Patients with Advanced Adrenocortical Carcinoma / S. Puglisi, A. Calabrese, V. Basile, [et al.] // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12. – № 3.

138. Mitotane has a strong and a durable inducing effect on CYP3A4 activity / N.P. van Erp, H.J. Guchelaar, B.A. Ploeger, [et al.] // *European journal of endocrinology*. – 2011. – Vol. 164. – № 4. – P. 621-626.

139. Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells / S. Sbiera, E. Leich, G. Liebisch, [et al.] // *Endocrinology*. – 2015. – Vol. 156. – № 11. – P. 3895-3908.

140. Multiplatform computational analysis of mast cells in adrenocortical carcinoma tumor microenvironment / J.J. Baechle, D.N. Hanna, K.R. Sekhar, [et al.] // *Surgery*. – 2022. – Vol. 171. – № 1. – P. 111-118.

141. Myxoid and Sarcomatoid Variants of Adrenocortical Carcinoma: Analysis of Rare Variants in Single Tertiary Care Center / T.Y. Sung, Y.M. Choi, W.G. Kim, [et al.] // *Journal of Korean medical science*. – 2017. – Vol. 32. – № 5. – P. 764-771.

142. Myxoid variant of adrenocortical carcinoma / G. Jeremie, J. C. Lifante, F. B. Chazot, [et al.] // *Annales de pathologie*. – 2021. – Vol. 41. – № 2. – P. 186-191.

143. Najafi, S. The role of T helper 17 and regulatory T cells in tumor microenvironment / S. Najafi, A. Mirshafiey // *Immunopharmacol Immunotoxicol*. – 2019. – Vol. 41. – № 1. – P.16-24.

144. Nivolumab in Metastatic Adrenocortical Carcinoma: Results of a Phase 2 Trial / B.A. Carneiro, B. Konda, R.B. Costa, [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2019. – Vol. 104. – № 12. – P. 6193-6200.

145. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer / H. Borghaei, L. Paz-Ares, L. Horn, [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Vol. 373. – № 17. – P. 1627-1639.

146. Novel targets for immune-checkpoint inhibition in cancer / M. Borgeaud, J. Sandoval, M. Obeid, [et al.] // *Cancer treatment reviews*. – 2023. – Vol. 120. – P. 102614.

147. O'Donnell, J.S. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy / J.S. O'Donnell, M.W.L. Teng, M.J. Smyth // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2019. – Vol. 16. – № 3. – P. 151-167.

148. Oncocytic adrenocortical neoplasms – a clinicopathologic study of 13 new cases emphasizing the importance of their recognition / D.D. Wong, D.V. Spagnolo, M. Bisceglia, [et al.] // *Human Pathology*. – 2011. – Vol. 42. – № 4. – P. 489-499.
149. Oncocytic subtypes of adrenal cortical carcinoma: Aggressive in appearance yet more indolent in behavior? / J.K. Mills, M. Khalil, J. Pasieka, [et al.] // *Surgery*. – 2019. – Vol. 166. – № 4. – P. 524-533.
150. Open vs laparoscopic adrenalectomy for localized adrenocortical carcinoma / D. Kastelan, N. Knezevic, K. Zibar Tomsic, [et al.] // *Clinical endocrinology*. – 2020. – Vol. 93. – № 4. – P. 404-408.
151. Outcomes after resection of cortisol-secreting adrenocortical carcinoma / G.A. Margonis, Y. Kim, T.B. Tran, [et al.] // *American journal of surgery*. – 2016. – Vol. 211. – № 6. – P. 1106-1113.
152. Overview of the 2022 WHO Classification of Adrenal Cortical Tumors. / O. Mete, L. A. Erickson, C.C. Juhlin, [et al.] // *Endocrine pathology*. – 2022. – Vol. 33. – № 1. – P. 155-196.
153. Overview of the 2022 WHO Classification of Familial Endocrine Tumor Syndromes / V. Nosé, A. Gill, J.M.C. Teijeiro, [et al.] // *Endocrine pathology*. – 2022. – Vol. 33. – № 1. – P. 197-227.
154. Past, Present and Future of Epigenetics in Adrenocortical Carcinoma / M. Ettaieb, T. Kerkhofs, M. van Engeland, [et al.] // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12. – № 5.
155. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations / Y. Jiang, M. Chen, H. Nie, [et al.] // *Human vaccines & immunotherapeutics*. – 2019. – Vol. 15. – № 5. – P. 1111-1122.
156. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy / F. K. Dermani, P. Samadi, G. Rahmani, [et al.] // *Journal of cellular physiology*. – 2019. – Vol. 234. – № 2. – P. 1313-1325.
157. PD-L1 expression and Tumor mutation burden as Pathological response biomarkers of Neoadjuvant immunotherapy for Early-stage non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis / H. Deng, Y. Zhao, X. Cai, [et al.] // *Critical reviews in oncology/hematology*. – 2022. – Vol. 170. – P. 103582.
158. PD-L1 status in breast cancer: Current view and perspectives / S. Vranic, F.S. Cyprian, Z. Gatalica, [et al.] // *Seminars in cancer biology*. – 2021. – Vol. 72. – P. 146-154.
159. PD1/PD-L1 Axis in Uro-oncology / K. Junker, M. Eckstein, M. Fiorentino, [et al.] // *Current drug targets*. – 2020. – Vol. 21. – № 13. – P. 1293-1300.
160. PDL1 expression is associated with longer postoperative, survival in adrenocortical carcinoma / E. Billon, P. Finetti, A. Bertucci, [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2019. – Vol. 8. – № 11. – P. e1655362.
161. Pediatric adrenocortical carcinoma / M. Ilanchezhian, D.G. Varghese, J.W. Glod, [et al.] // *Frontiers in endocrinology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 961650.

162. Phase II clinical trial of pembrolizumab efficacy and safety in advanced adrenocortical carcinoma / M.A. Habra, B. Stephen, M. Campbell, [et al.] // *Journal for immunotherapy of cancer*. – 2019. – Vol. 7. – № 1. – P. 253.
163. Practical treatment using mitotane for adrenocortical carcinoma / M. Terzolo, B. Zaggia, B. Allasino, [et al.] // *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. – 2014. – Vol. 21. – № 3. – P. 159-165.
164. Predictive value of PD-L1 expression in response to immune checkpoint inhibitors for gastric cancer treatment: a systematic review and meta-analysis / M. Noori, F. Fayyaz, M.R. Zali, [et al.] // *Expert review of anticancer therapy*. – 2023. – Vol. 23. – № 9. – P. 1029-1039.
165. Primary malignant tumors of the adrenal glands / M.Q. Almeida, J.E. Bezerra-Neto, B.B. Mendonça, [et al.] // *Clinics*. – 2018. – Vol. 73. – № 1. – P. e756s.
166. Primary site surgery for metastatic adrenocortical carcinoma improves survival outcomes: an analysis of a population-based database / S. Wang, W.C. Gao, S.S. Chen, [et al.] // *OncoTargets and therapy*. – 2017. – Vol. 10. – P. 5311-5315.
167. Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study / R. Libé, I. Borget, C.L. Ronchi, [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2015. – Vol. 26. – № 10. – P. 2119-2125.
168. Prognostic impact of CD8+ T cell distribution and its association with the HLA class I expression in intrahepatic cholangiocarcinoma / Y. Asahi, K.C. Hatanaka, Y. Hatanaka, [et al.] // *Surgery today*. – 2020. – Vol. 50. – № 8. – P. 931-940.
169. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma / S. Schreck, D. Friebel, M. Buettner, [et al.] // *Hematological oncology*. – 2009. – Vol. 27. – № 1. – P. 31-39.
170. Prognostic Role of Ki-67 in Adrenocortical Carcinoma After Primary Resection: A Retrospective Mono-Institutional Study / F. Zhang, F. Zhang, Z. Liu, [et al.] // *Advances in therapy*. – 2019. – Vol. 36. – № 10. – P. 2756-2768.
171. Prognostic role of overt hypercortisolism in completely operated patients with adrenocortical cancer / A. Berruti, M. Fassnacht, H. Haak, [et al.] // *European urology*. – 2014. – Vol. 65. – № 4. – P. 832-838.
172. Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors / J.F.M. Jacobs, A.J. Idema, K.F. Bol, [et al.] // *Journal of neuroimmunology*. – 2010. – Vol. 225. – № 1-2. – P. 195-199.
173. Prognostic significance of immunohistochemical markers in adrenocortical carcinoma / L. Zlatibor, I. Paunovic, V. Zivaljevic, [et al.] // *Acta chirurgica Belgica*. – 2020. – Vol. 120. – № 1. – P. 23-29.

174. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature / Q. Zhang, L. Liu, C. Gong, [et al.] // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – № 12. – P. e50946.
175. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis / W.T. Hwang, S.F. Adams, E. Tahirovic, [et al.] // *Gynecologic oncology*. – 2012. – Vol. 124. – № 2. – P. 192-198.
176. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers / C. Badoual, S. Hans, J. Rodriguez, [et al.] // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 2006. – Vol. 12. – № 2. – P. 465-472.
177. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ T cells in gastrointestinal cancers: a meta-analysis / Y. Huang, H. Liao, Y. Zhang, [et al.] // *PloS one*. – 2014. – Vol. 9. – № 5. – P. e94376.
178. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis / Q. Fu, N. Chen, C. Ge, [et al.] // *OncoImmunology*. – 2019. – Vol. 8. – № 7. – P. e1593806.
179. Programmed death ligand-1 expression in adrenocortical carcinoma: an exploratory biomarker study / A.P. Fay, S. Signorett, M. Callea, [et al.] // *Journal for immunotherapy of cancer*. – 2015. – Vol. 3. – №3.
180. Radiomic mapping model for prediction of Ki-67 expression in adrenocortical carcinoma / A.A. Ahmed, M.M. Elmohr, D. Fuentes, [et al.] // *Clinical radiology*. – 2020. – Vol. 75. – № 6. – P. 479-479.
181. Rajbhandary, S. Tumor immune microenvironment (TIME) to enhance antitumor immunity. / S. Rajbhandary, H. Dhakal, S. Shrestha // *European journal of medical research*. – 2023. – Vol. 28. – № 1. – P. 169.
182. Recent advances in the role of Th17/Treg cells in tumor immunity and tumor therapy / Y. Qianmei, S. Zehong, W. Guang [et al.] // *Immunologic research*. – 2021. – Vol. 69. – №5. – P.398–414.
183. Recent advances of molecular mechanisms of regulating PD-L1 expression in melanoma / J. Han, X. Xu, Z. Liu, [et al.] // *International immunopharmacology*. – 2020. – Vol. 88. – P. 106971.
184. Recommendations From the 2023 International Evidence-based Guideline for the Assessment and Management of Polycystic Ovary Syndrome. / H.J. Teede, C.T. Tay, J.J.E. Laven [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2023. – Vol.108. – №10. – P.2447-2469.
185. Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer / T. Kusuda, K. Shigemasa, K. Arihiro, [et al.] // *Oncology reports*. – 2005. – Vol. 13. – № 6. – P. 1153-1158.
186. Results of the ADIUVO Study, the First Randomized Trial on Adjuvant Mitotane in Adrenocortical Carcinoma Patients / M. Terzolo, M. Fassnacht, P. Perotti, [et al.] // *Journal of the Endocrine Society*. – 2021. – Vol. 5. – № 1. – P. 166-167.

187. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles / A.M. Newman, C.L. Liu, M.R. Green, [et al.] // *Nature Methods*. – 2015. – Vol. 12. – № 5. – P. 453-457.
188. Shen, C. Ferroptosis Biomarkers for Predicting Prognosis and Immunotherapy Efficacy in Adrenocortical Carcinoma / C. Shen, Y. Wang // *Archives of medical research*. – 2023. – Vol. 54. – № 1. – P. 45-55.
189. Small adrenal incidentaloma becoming an aggressive adrenocortical carcinoma in a patient carrying a germline APC variant / N. Gagnon, P. Boily, C. Alguire, [et al.] // *Endocrine*. – 2020. – Vol. 68. – № 1. – P. 203-209.
190. Smoking is associated with adrenal adenomas and adrenocortical carcinomas: a nationwide multicenter analysis / A. Yousaf, J. Patterson, G. Hobbs, [et al.] // *Cancer treatment and research communications*. – 2020. – Vol. 25. – P. 100206.
191. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival / T.J. Curiel, G. Coukos, L. Zou, [et al.] // *Nature medicine*. – 2004. – Vol. 10. – № 9. – P. 942-949.
192. Stephen, B. Overview of Basic Immunology for Clinical Investigators / B. Stephen, J. Hajjar // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2017. – Vol. 995. – P. 1-31.
193. Surgical treatment of adrenal carcinoma / S. Gaujoux, M. Weinandt, S. Bonnet, [et al.] // *Journal of visceral surgery*. – 2017. – Vol. 154. – № 5. – P. 335-343.
194. Targeting the microenvironment in solid tumors / C. Belli, D. Trapani, G. Viale, [et al.] // *Cancer treatment reviews*. – 2018. – Vol. 65. – P. 22-32.
195. Tay, C. Tumor-infiltrating regulatory T cells as targets of cancer immunotherapy / C. Tay, A. Tanaka, S. Sakaguchi // *Cancer cell*. – 2023. – Vol. 41. – № 3. – P. 450-465.
196. Terzolo, M. ENDOCRINE TUMOURS: Our experience with the management of patients with non-metastatic adrenocortical carcinoma / M. Terzolo, M. Fassnacht // *European journal of endocrinology*. – 2022. – Vol. 187. – № 3. – P. R27-R40.
197. Th17 Cells and IL-17 As Novel Immune Targets in Ovarian Cancer Therapy / M. Bilska, A. Pawłowska, E. Zakrzewska [et al.] // *Journal of oncology*. – 2020. – P. 8797683.
198. The Characteristics and Trends in Adrenocortical Carcinoma: A United States Population Based Study / E. Sharma, S. Dahal, P. Sharma, [et al.] // *Journal of clinical medicine research*. – 2018. – Vol. 10. – № 8. – P. 636-640.
199. The construction and analysis of tumor-infiltrating immune cells and ceRNA networks in metastatic adrenal cortical carcinoma / R. Huang, Z. Liu, T. Tian, [et al.] // *Bioscience reports*. – 2020. – Vol. 40. – № 3.

200. The Efficacy of Mitotane in Human Primary Adrenocortical Carcinoma Cultures / P.M. van Koetsveld, S.G. Creemers, F. Dogan, [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2020. – Vol. 105. – № 2. – P. 407-417.
201. The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: a North American validation. / G. Lughezzani, M. Sun, P. Perrotte, [et al.] // *European journal of cancer*. – 2010. – Vol. 46. – № 4. – P. 713-719.
202. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome / W.H. Fridman, F. Pagès, C. Sautès-Fridman, [et al.] // *Nature Reviews Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – № 4. – P. 298-306.
203. The Immune Landscape of Cancer / V. Thorsson, D.L. Gibbs, S. D. Brown [et al.] // *Immunity*. – 2018. – Vol. 48. – № 4. – P. 812-830.e14.
204. The new histological system for the diagnosis of adrenocortical cancer / L. Urusova, E. Porubayeva, N. Pachuashvili, [et al.] // *Front. Endocrinol.* – 2023. – Vol. 14.
205. The Prognostic Implications of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / G.E. Idos, J. Kwok, N. Bonthala, [et al.] // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 3360.
206. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis / M.J.M. Gooden, G.H. de Bock, N. Leffers, [et al.] // *British journal of cancer*. – 2011. – Vol. 105. – № 1. – P. 93-103.
207. The Prognostic Role of CD8(+) T Lymphocytes in Childhood Adrenocortical Carcinomas Compared to Ki-67, PD-1, PD-L1, and the Weiss Score / I.Z.S. Parise, G.A. Parise, L. Noronha, [et al.] // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11. – № 11.
208. The Prognostic Value of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Hepatocellular Carcinoma: a Systematic Review and Meta-analysis / W. Yao, J.C. He, Y. Yang, [et al.] // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 7525.
209. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in cholangiocarcinoma / D. Liu, L.R. Heij, Z. Czigany [et al.] // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2022. – Vol. 41. – № 1. – P. 127.
210. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) / E.E.W. Cohen, R.B. Bell, C.B. Bifulco [et al.] // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2019. – Vol. 7. – № 1. – P. 184.
211. Time Until Partial Response in Metastatic Adrenocortical Carcinoma Long-Term Survivors / D. Vezzosi, C. Do Cao, S. Hescot, [et al.] // *Hormones & cancer*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 62-69.

212. Tumor heterogeneity reshapes the tumor microenvironment to influence drug resistance / A. Zhang, K. Miao, H. Sun, [et al.] // *International journal of biological sciences*. – 2022. – Vol. 18. – № 7. – P. 3019-3033.
213. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity / Y. Pan, Y. Yu, X. Wang, [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 583084.
214. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer / C. Li, X. Xu, S. Wei, [et al.] // *Journal for immunotherapy of cancer*. – 2021. – Vol. 9. – № 1.
215. Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Crohn's-Like Lymphoid Reaction, and Survival From Colorectal Cancer / L.S. Rozek, S.L. Schmit, J.K. Greenon, [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2016. – Vol. 108. – № 8.
216. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy / C. Denkert, G. von Minckwitz, S. Darb-Esfahani, [et al.] // *The Lancet. Oncology*. – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 40-50.
217. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome / J. Galon, A. Costes, F. Sanchez-Cabo, [et al.] // *Science*. – 2006. – Vol. 313. – № 5795. – P. 1960-1964.
218. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy / M. Binnewies, E.W. Roberts, K. Kersten, [et al.] // *Nature medicine*. – 2018. – Vol. 24. – № 5. – P. 541-550.
219. Unwanted Hormonal and Metabolic Effects of Postoperative Adjuvant Mitotane Treatment for Adrenocortical Cancer / V. Basile, S. Puglisi, A. Calabrese, [et al.] // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12. – № 9.
220. Validation of the prognostic role of the 'Helsinki Score' in 225 cases of adrenocortical carcinoma / E. Duregon, R. Cappellesso, V. Maffei, [et al.] // *Human pathology*. – 2017. – Vol. 62. – P. 1-7.
221. Visser, K.E. de. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth / K.E. de Visser, J.A. Joyce // *Cancer cell*. – 2023. – Vol. 41. – № 3. – P. 374-403.
222. Weiss, L.M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors / L.M. Weiss // *The American journal of surgical pathology*. – 1984. – Vol. 8. – № 3. – P. 163-169.
223. Weiss, L.M. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma / L.M. Weiss, L.J. Medeiros, A.L.J. Vickery // *The American journal of surgical pathology*. – 1989. – Vol. 13. – № 3. – P. 202-206.

224. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs: a systematic review and meta-analysis / J. Shou, Z. Zhang, Y. Lai, [et al.] // BMC cancer. – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 687.
225. Wozniakova, M. The Role of Tumor Microenvironment and Immune Response in Colorectal Cancer Development and Prognosis / M. Wozniakova, J. Skarda, M. Raska // Pathology oncology research: POR. – 2022. – Vol. 28. – P. 1610502.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Индивидуальный прогностический алгоритм риска летального исхода и развития рецидива аденокортикального рака на основании иммунного инфильтрата опухоли

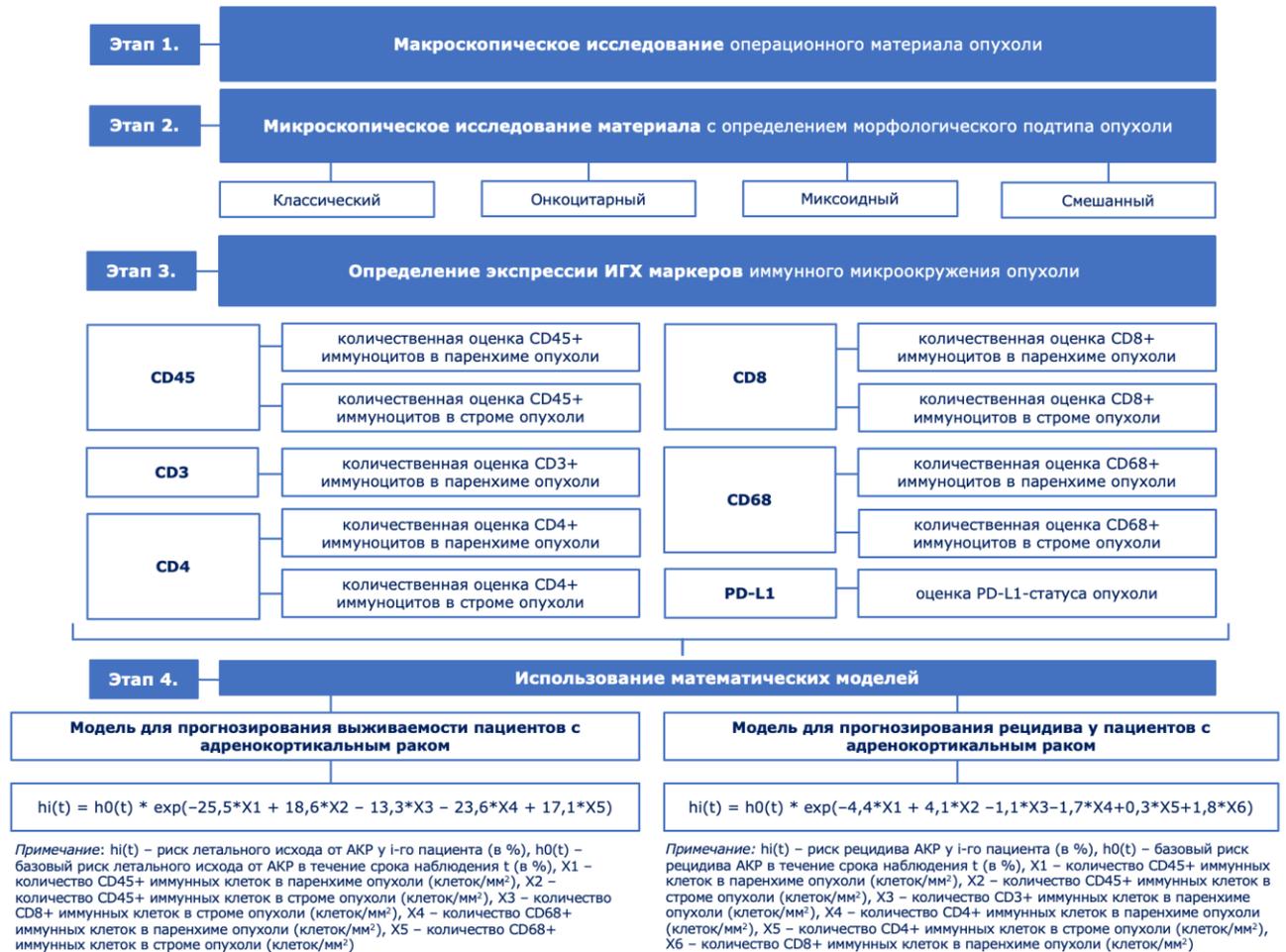


Схема А.1 – Индивидуальный прогностический алгоритм риска летального исхода и развития рецидива аденокортикального рака на основании иммунного инфильтрата опухоли