

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 616-006.04-078.33-076.5

Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А., Табаков Д.В., Бокин И.И., Паниченко И.В., Савостикова М.В., Самойленко И.В., Циклаури В.Т., Хакимова Ш.Г., Кадагидзе З.Г.

МНОГОПАРАМЕТРОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ, У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия

Впервые в России проведено многопараметровое исследование иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, с помощью количественного метода проточной цитометрии. Исследованы образцы опухолевой ткани 104 больных с солидными опухолями (рак молочной железы, рак яичников, рак слизистой оболочки полости рта, меланома). В отличие от цитоморфологического исследования, метод проточной цитометрии выявляет лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (ТИЛ), в 100% случаев. В структуре CD3+ T-лимфоцитов соотношение CD4/CD8 составляет 1,1±0,1. Стратегия последовательного гейтирования позволила оценить минорные субпопуляции регуляторных T-лимфоцитов CD45+CD4+CD127^{low/neg} и CD45+CD8+CD28^{CD11b}. Независимо от нозологической формы заболевания в генерации иммунных реакций на тканевом уровне у больных с солидными новообразованиями преобладают регуляторные механизмы иммунологического ответа с участием CD8 T-клеток.

Ключевые слова: лимфоциты, инфильтрирующая опухоль; проточная цитометрия; иммунофенотип; онкология.

Для цитирования: Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А., Табаков Д.В., Бокин И.И., Паниченко И.В., Савостикова М.В., Самойленко И.В., Циклаури В.Т., Хакимова Ш.Г., Кадагидзе З.Г. Многопараметровое исследование иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у онкологических больных. *Российский онкологический журнал*. 2016; 21 (1–2): 51–54. DOI: 10.18821/1028-9984-2016-21-1-51-54

Для корреспонденции: Заботина Татьяна Николаевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей НИИ клинической онкологии; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, e-mail: tatzabotina@yandex.ru.

Zabotina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A., Tabakov D.V., Bokin I.I., Panichenko I.V., Savostikova M.V., Samoylenko I.V., Tsiklauri V.T., Khakimova Sh.G., Kadagidze Z.G.

MULTIPARAMETER STUDY OF THE IMMUNOPHENOTYPE OF TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES, IN CANCER PATIENTS

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, 115478, Russian Federation

For the first time in Russia the immunophenotype of tumor infiltrated lymphocytes (TIL) was investigated with the use of a method of quantitative flow cytometry. Samples from 104 patients, suffering from solid tumors (such as breast cancer, ovarian cancer, melanoma and oral cavity squamous carcinoma), were analyzed in this investigation. In the difference of cytomorphological analysis, the method of flow cytometry identified TIL in 100% of cases. In the structure of CD3+T- lymphocytes the ratio CD4/CD8 was equal to 1,1±0,1. Serial gating strategy allowed to assess minor subpopulations of regulatory T-lymphocytes CD45+CD4+CD127^{low/neg} and CD45+CD8+CD28-CD11b-. Regulatory mechanisms with involvement of CD8 T-cells played the main role in the generation of immune responses at the tissue level of patients, suffering from solid tumors, independent of nosological form of disease.

Key words: tumor infiltrating lymphocytes; flow cytometry; immunophenotype; oncology.

For citation: Zabotina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A., Tabakov D.V., Bokin I.I., Panichenko I.V., Savostikova M.V., Samoylenko I.V., Tsiklauri V.T., Khakimova Sh.G., Kadagidze Z.G. Multiparameter study of the immunophenotype of tumor infiltrating lymphocytes, in cancer patients. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal (Russian Journal of Oncology)*. 2016; 21 (1–2): 51–54. (In Russ.). DOI: 10.18821/1028-9984-2016-21-1-51-54

For correspondence: Tat'yana N. Zabotina, MD, Phd, DSc, leading researcher of the Laboratory of Clinical immunology of tumors of the Research Institute of Clinical Oncology, Moscow, 115478, Russian Federation, E-mail: tatzabotina@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 02 November 2015
Accepted 19 November 2015

Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (ТИЛ), являются объектом возрастающего внимания исследователей во всем мире, однако понимание их роли в патогенезе рака до сих пор неизвестно. В то же время убедительно показано, что степень инфильтрации

опухоли лимфоцитами определяет прогноз течения заболевания и выживаемость больных с различными нозологическими формами онкологических заболеваний [1–5]. Большинство этих исследований проведено с использованием иммуногистохимического

анализа фиксированных блоков, которое позволяет сопоставить лабораторные и клинические результаты. Однако данный методический подход дает информацию только о наличии инфильтрации и ее степени выраженности (низкая/высокая) [6]. Использование проточной цитометрии позволяет оценить субпопуляционную структуру лимфоцитов опухоли и достоверно определить направление генерации иммунного ответа на тканевом уровне, а также оценить фенотипическую гетерогенность популяционного состава иммунокомпетентных клеток. Сегодня высокотехнологичные иммунологические исследования являются крайне актуальными, поскольку в клиническую практику активно внедряются новые подходы лечения онкологических больных, в том числе с применением таргетной иммунотерапии. Все это указывает на актуальность данной работы.

Цель – провести изучение иммунологической структуры лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у онкологических больных.

Материал и методы

Образцы опухолевой ткани больных

Исследовали образцы опухолевой ткани 104 больных с солидными опухолями, полученные интраоперационно или с помощью сог-биопсии. Образцы ткани помещали в 2 мл охлажденного раствора PBS, фрагментацию и анализ проводили в тот же день или хранили образцы при 4°C не более 12 ч. В исследовании вошли пациентки с раком яичников ($n = 11$); меланомой ($n = 37$); раком слизистой оболочки полости рта ($n = 9$); раком молочной железы ($n = 47$).

Получение суспензии клеток

С целью получения клеточных суспензий фрагментацию ткани опухолей проводили с использованием системы Medimachine (BD Biosciences). Сначала опухоль гомогенизировали в нестерильных контейнерах (Medicons) для одноразового использования, затем фильтровали через фильтры Filcons с диаметром пор не более 50 мкм.

Цитоморфологический анализ

Все полученные образцы подвергались цитоморфологическому контролю в лаборатории клинической цитологии НИИ клинической онкологии с применением метода жидкостной цитологии. Для приготовления монослойных стандартных цитопрепаратов использовали систему Cytospin-3 в режиме 1000 оборотов в течение 5 мин. Препараты окрашивали по Лейшману, анализировали при увеличении в 200 и 400 раз. При цитоморфологическом анализе оценивали количество и качество опухолевых клеток, наличие лимфоидных элементов.

Реакция иммунофлуоресценции

Для многопараметрового анализа поверхностных антигенов использовали коммерческие моноклональные антитела (МКА) (Beckman Coulter, BD Biosciences), конъюгированные FITC, PE, PE-Cy5, APC к антигенам CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD28, CD11b, CD25, CD127, HLA-Dr, CD19, CD45. Для оценки цитотоксического потенциала клеток-эффекторов применяли внутриклеточное окрашивание белка Perforin с помощью коммерческой тест-системы (BD Biosciences).

Проточно-цитометрический анализ

Структуру субпопуляций клеток оценивали по связыванию с МКА различной специфичности методом 4-цветного многопараметрового количественного анализа на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences). Накапливали $0,1-2 \times 10^6$ событий для каждого образца, анализировали не менее 500–5000 клеток в CD45⁺-гейте. Использовали DotPlot-анализ цитограмм с коммерческим программным обеспечением BD CellQuest PRO software (BD Biosciences). Дальнейшую обработку FSC-файлов первичных цитометрических данных проводили с использованием программного пакета WinMDI, версия 2.8.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0 for Windows. Достоверность различий в исследовании оценивали по *t*-критерию Стьюдента и непараметрическим критериям Вилкоксона–Манна–Уитни и Фишера в зависимости от характера распределения значений выборки. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Все результаты представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки.

Результаты

На первом этапе работы было проведено исследование количества лимфоидных клеток в полученных суспензиях, отражающих степень инфильтрации лимфоцитами опухолевой ткани различных локализаций. С этой целью образцы анализировали методом проточной цитометрии с учетом малоуглового светорассеяния SSC в сочетании с окрашиванием МКА анти-CD45, а также с помощью цитоморфологического метода жидкостной цитологии. Иммунологический анализ цитограмм SSC против CD45 образцов опухолевых клеток методом проточной цитометрии показал, что лимфоидные клетки (TIL) с фенотипом CD45⁺ выявлялись в 100% случаев и это не зависело от объема опухолевой ткани и способа ее получения (интраоперационно или путем сог-биопсии). Однако содержание TIL с фенотипом CD45⁺ в полученных суспензиях значительно варьировало от 0,4 до 35%, среднее значение составило $4,9 \pm 1,3\%$. В то же время при цитоморфологическом исследовании в ряде случаев лимфоидные элементы не обнаружены. Так, по данным иммунологического анализа, у больных И. и Н. с диагнозом рака молочной железы было выявлено 2,1 и 11,8% соответственно CD45⁺-лимфоцитов, в то время как при морфологическом исследовании образцы оказались отрицательными. Аналогичным образом у 2 больных злокачественной меланомой количество CD45⁺-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, составило 0,1 и 0,2%, а по данным морфологии, образцы были негативными (рис. 1 и 2, см. вклейку).

Исследование субпопуляционной структуры CD45⁺-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, проводили с помощью метода многопараметровой проточной цитометрии. Прежде всего оценивали количество линейных (T-B-NK) популяций лимфоцитов. Было обнаружено, что в структуре TIL значительно преобладают CD45⁺CD3⁺CD19⁺ T-клетки, их уровень составил $91 \pm 1,3\%$, количество NK-клеток с фенотипом CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺ среди лимфоцитов,

инфильтрирующих опухоль, составило $3,7 \pm 0,2\%$, а $CD45^+CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов – $2 \pm 0,6\%$. Соотношение CD4/CD8-клеток, характеризующее субпопуляционную структуру CD3-лимфоцитов, оказалось практически равным $1,1 \pm 0,1$, при этом популяция CD8-лимфоцитов на $96,4\%$ была представлена $CD45^+CD3^+CD8^+$ -специфическими цитотоксическими лимфоцитами (ЦТЛ), а уровень неспецифических CD8-эффекторных клеток с фенотипом $CD45^+CD3^+CD8^+$ составил $1,6 \pm 0,4\%$. Количество клеток с экспрессией антигенов поздней и ранней активации HLA-Dr+ и CD25+ составил $2,8 \pm 0,9$ и $14,4 \pm 2,6\%$ соответственно. Не было выявлено активированных $CD3^+HLA-Dr^+$ Т-клеток, однако обнаружены активированные CD4-лимфоциты с коэкспрессией CD25+ ($11,0 \pm 2,1\%$).

Исследование цитотоксического потенциала NK-клеток и Т-клеток, оцениваемого по содержанию внутриклеточного перфорина, показало, что в структуре ТИЛ только $46,8 \pm 7,5\%$ NK-клеток являются функционально активными и имеют фенотип $CD45^+CD3^+CD16^+Perforin^+$. Среди CD8-клеток-эффекторов перфорин-позитивные клетки составили лишь $3,3 \pm 0,8\%$.

Для анализа CD4- и CD8-клеток, осуществляющих негативную регуляцию иммунных реакций, был использован прием последовательного гейтирования. Уровень регуляторных клеток с фенотипом $CD45^+CD4^+CD127^{low/neg}$ составил $10,4 \pm 2,2\%$ среди CD4 Т-лимфоцитов, однако в структуре CD8 количество регуляторных клеток с фенотипом $CD45^+CD8^+CD28^+CD11b^+$ составило $54,5 \pm 6,9\%$.

Особо следует отметить, что субпопуляционная структура лимфоцитов в исследуемых опухолях различных локализаций оказалась аналогичной, что позволило нам проводить анализ всей группы пациентов.

Полученные результаты анализа иммунофенотипа ТИЛ представлены в таблице.

Обсуждение

В данной работе впервые в России проведено многопараметровое исследование иммунофенотипа ТИЛ с помощью количественного метода проточной цитометрии. В отличие от иммуногистохимического анализа, который широко используется за рубежом, данный методический подход позволяет идентифицировать единичные события по определенному критерию. Так, в качестве маркера для выделения «гейта» лимфоцитов были использованы МКА к общелейкоцитарному антигену CD45 с одновременным учетом гранулярности клеток. В нашем исследовании во всех анализируемых образцах опухолевой ткани были обнаружены $CD45^+$ -лимфоциты, однако их количество сильно варьировало. В некоторых случаях при низком содержании $CD45^+$ -клеток анализу подвергалось до 2×10^6 клеток, при этом параллельное цитоморфологическое исследование фиксировало отрицательный результат. Следует заметить, что степень инфильтрации опухоли лимфоцитами сегодня рассматривается как благоприятный прогностический фактор эффективного ответа на проводимое лечение и общую выживаемость больных раком молочной железы, раком яичников, колоректальным раком, раком слизистой оболочки полости рта, раком мочевого пузыря, меланомой и другими нозологиче-

Иммунофенотип ТИЛ ($M \pm m$)

Показатель	Значение, %
CD45+	$4,9 \pm 1,3$
CD3+	$91,0 \pm 1,3$
CD3+CD4+	$47,1 \pm 2,2$
CD3+CD8+	$43,5 \pm 2,7$
CD3-CD8+	$1,6 \pm 0,4$
CD8+	$45,1 \pm 2,8$
CD3+HLA-DR+	$1,8 \pm 0,3$
HLA-DR	$2,8 \pm 0,9$
CD3-CD16+CD56+	$3,7 \pm 0,2$
CD3+CD16+CD56+	$3,2 \pm 0,9$
CD3-CD19+	$2,0 \pm 0,6$
CD4+CD25+	$11,0 \pm 2,1$
CD25+	$14,4 \pm 2,6$
CD8+CD16+	$4,5 \pm 0,9$
CD16+Perforin+	$5,2 \pm 1,4$
active CD16	$46,8 \pm 7,5$
CD8+Perforin+	$3,3 \pm 0,8$
active CD8	$8,7 \pm 2,0$
CD4/CD8	$1,1 \pm 0,1$
CD4+CD127+CD25+	$10,4 \pm 2,2$
CD8+11b+CD28-	$8,9 \pm 2,1$
CD8+CD11b+CD28+	$14,9 \pm 4,5$
CD8+CD11b-CD28-	$54,5 \pm 6,9$
CD8+CD11b-CD28+	$16,7 \pm 4,8$

скими формами опухолевых заболеваний [7, 8]. Также одним из преимуществ используемого в исследовании методического подхода является возможность одновременного анализа коэкспрессии нескольких антигенов на/в единственной лимфоидной клетке в пределах многокомпонентной клеточной системы, что позволило нам идентифицировать различные линейные популяции и их субпопуляции, включая минорные, и выявить некоторые закономерности.

Так, в линейной структуре лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, преобладают Т-клетки, их количество составляет почти 90%, следовательно, на долю В- и NK-клеток приходится около 10%. Аналогичные результаты по структурной организации лимфоцитов опухолевой ткани были получены А. Rathore и соавт. [9], но с использованием иммуногистохимического исследования. Проведенный анализ соотношения субпопуляций Т-клеток CD4/CD8 оказался практически равным и составил $1,1 \pm 0,1$, что свидетельствует о равнозначности функционирования данных клеточных популяций в опухолевой ткани. О позитивной роли инфильтрации опухоли CD3-, CD4-, CD8-лимфоцитами указывают в своих работах S. Han и соавт., P. Sermáková и соавт. [10, 11]. Однако данные результаты получены при иммуногистохимическом исследовании, возможности которого не позволяют проводить анализ фенотипической гетерогенности субпопуляционной структуры CD4- и CD8-лимфоидных клеток.

Нами замечено, что в опухолевой ткани среди CD3-клеток отсутствуют активированные CD3⁺HLA-DR⁺ T-лимфоциты, однако, как видно из таблицы, антиген ранней активации CD25 в основном представлен на поверхности CD4-клеток с одновременной коэкспрессией антигена CD127. Данный фенотип характерен для популяции CD4 T-регуляторных клеток, однако их количество составило лишь 10,4±2,2%, что, по нашему мнению, не может оказывать существенного влияния на иммунный ответ. В то же время, согласно данным литературы, популяция CD4 T_{reg} - лимфоцитов коррелирует с неблагоприятным прогнозом при злокачественных опухолях различных локализаций [12, 13].

Значимые результаты получены при анализе фенотипической структуры CD8-лимфоцитов, в состав которых входят активированные, наивные, цитотоксические и регуляторные клетки, оцениваемые по сочетанию коэкспрессии антигенов CD11b и CD28. Оказалось, что среди популяции CD8-клеток преобладают лимфоциты с фенотипом CD8⁺CD11b⁻CD28⁻, который соответствует CD8 T-лимфоцитам с негативной регуляцией иммунного ответа и составляют 54,5±6,9%. При анализе источников литературы не обнаружены подобные результаты, вероятно, обусловлено это именно ограниченными методическими возможностями иммуногистохимических исследований. В то же время отмечается прогностическое значение инфильтрации опухоли CD8- клетками независимо от гистологического варианта, локализации в строме или опухолевой ткани, пола, возраста пациентов [14, 15].

Таким образом, исследование фенотипа TIL выявило структурные особенности распределения субпопуляций лимфоидных клеток и позволяет заключить, что в генерации иммунных реакций на тканевом уровне у больных солидными новообразованиями преобладают регуляторные механизмы иммунологического ответа с участием CD8 T-клеток.

Выводы

1. С помощью метода проточной цитометрии TIL выявляются в 100% случаев.
2. Иммунофенотип TIL опухолей различных локализаций имеет сходный характер.
3. В линейной структуре TIL преобладают CD3⁺ T-лимфоциты (91±1,3%).
4. В структуре CD3⁺ T-лимфоцитов соотношение CD4/CD8 составляет 1,1±0,1.
5. Эффекторное звено TIL представлено специфическими цитотоксическими CD3⁺CD8⁺ ЦТЛ (96,4%).
6. Уровень регуляторных T-лимфоцитов CD45⁺CD4⁺CD127^{low/neg} и CD45⁺CD8⁺CD28⁻CD11b⁻ составил 10,4±2,2 и 54,5±6,9% соответственно
7. Независимо от нозологической формы заболевания в генерации иммунных реакций на тканевом уровне у больных солидными новообразованиями преобладают регуляторные механизмы иммунологического ответа.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Donizy P., Kaczorowski M., Halon A., Leskiewicz M., Kozyra C., Matkowski R. Paucity of tumor-infiltrating lymphocytes is an unfavorable prognosticator and predicts lymph node metastases in cutaneous melanoma patients. *Anticancer Res.* 2015; 35 (1): 351–8.
2. Wolf G.T., Chepeha D.B., Bellile E., Nguyen A., Thomas D., McHugh J. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study.; University of Michigan Head and Neck SPORE Program. *Oral Oncol.* 2015; 51 (1): 90–5.
3. Ibrahim E.M., Al-Foheidi M.E., Al-Mansour M.M., Kazkaz G.A. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2014; 148 (3): 467–76.
4. Santoiemma P.P., Powell D.J. Jr. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biol. Ther.* 2015; 16 (9): 807–20.
5. Schatton T., Scolyer R.A., Thompson J.F., Mihm M.C. Jr. Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1102: 287–324.
6. Walayat Shah, Xiaofei Yan, Li Jing, Yi Zhou, Hongwei Chen, Yili Wang. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD41FOXP31 regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell. Mol. Immunol.* 2011; 8: 59–66.
7. Balermipas P., Michel Y., Wagenblast J., Seitz O., Weiss C., Rödel F., Rödel C. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Br. J. Cancer.* 2014; 110 (2): 501–9.
8. Dieci M.V., Criscitello C., Goubar A. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann. Oncol.* 2014; 25 (3): 611–8.
9. Rathore A.S., Kumar S., Konwar R., Makker A., Negi M.P., Goel M.M. CD3⁺, CD4⁺ & CD8⁺ tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are predictors of favourable survival outcome in infiltrating ductal carcinoma of breast. *Indian J. Med. Res.* 2014; 140 (3): 361–9.
10. Han S., Zhang C., Li Q., Dong J., Liu Y., Huang Y. et al. Tumour-infiltrating CD4 (+) and CD8 (+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br. J. Cancer.* 2014; 110 (10): 2560–8.
11. Čermáková P., Melichar B., Tomšová M., Zoul Z., Kalábová H., Spaček J., Doležel M. Prognostic significance of CD3⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with endometrial carcinoma. *Anticancer Res.* 2014; 34 (10): 5555–61.
12. Kim K.J., Lee K.S., Cho H.J., Kim Y.H., Yang H.K., Kim W.H., Kang G.H. Prognostic implications of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells and CD8⁺ cytotoxic T cells in microsatellite-unstable gastric cancers. *Hum. Pathol.* 2014; 45 (2): 285–93.
13. Sayour E.J., McLendon P., McLendon R. et al. Increased proportion of FoxP3⁺ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 2015; 64 (4): 419–27.
14. Ali H.R., Provenzano E., Dawson S.J. et al. Association between CD8⁺ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann. Oncol.* 2014; 25 (8): 1536–43.
15. Schalper K.A., Brown J., Carvajal-Hausdorf D. et al. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2015; 107 (3): doi: 10.1093/jnci/dju435.

К ст. Т.Н. Заботиной и соавт.

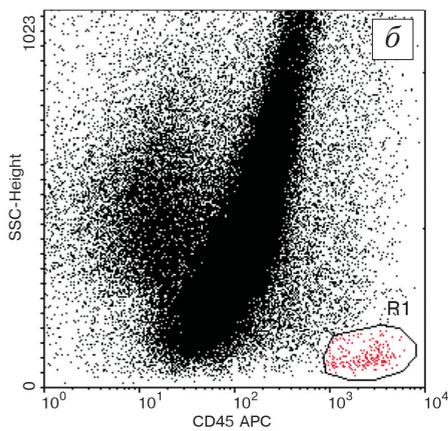
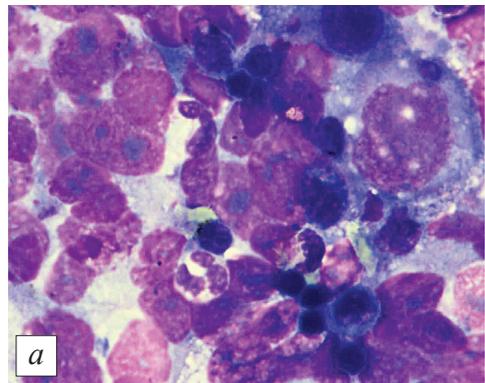
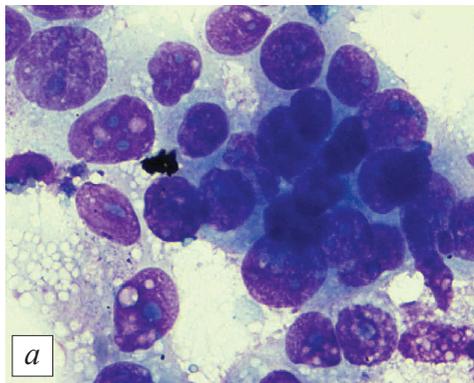


Рис. 1. Варианты слабой (проточная цитометрия) и отсутствие инфильтрации (жидкостная цитология) ТП в опухолевой ткани молочной железы больной Н.

a – цитоморфологическое исследование. Цитопрепарат Cytopsin, окраска по Лейшману, х 400; *б* – проточная цитометрия

CD45 APC (7) vs SSC-Height (2)

Region	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
R0	101,0	463,9	100 110	100,00	100,00
R1	2267,2	87,1	220	0,22	0,22

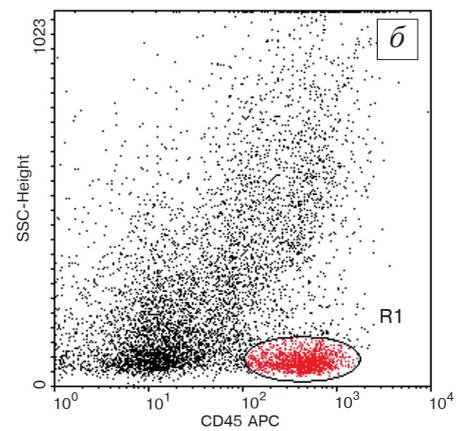


Рис. 2. Варианты сильной инфильтрации ТП в опухолевой ткани молочной железы больной С.

a – цитоморфологическое исследование. Цитопрепарат Cytopsin, окраска по Лейшману, х 400; *б* – проточная цитометрия

CD45 APC (7) vs SSC-Height (2)

Region	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
R0	54,7	248,7	7530	100,00	100,00
R1	410,5	69,1	1373	18,23	18,23

К ст. Г.М. Манихаса и соавт.

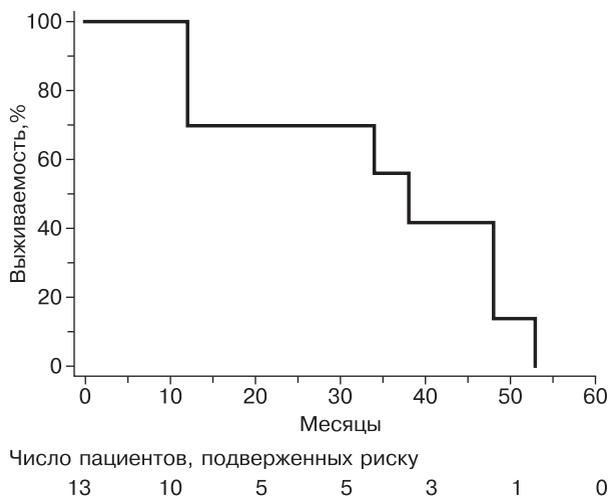


Рис. 2. Общая выживаемость пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи.

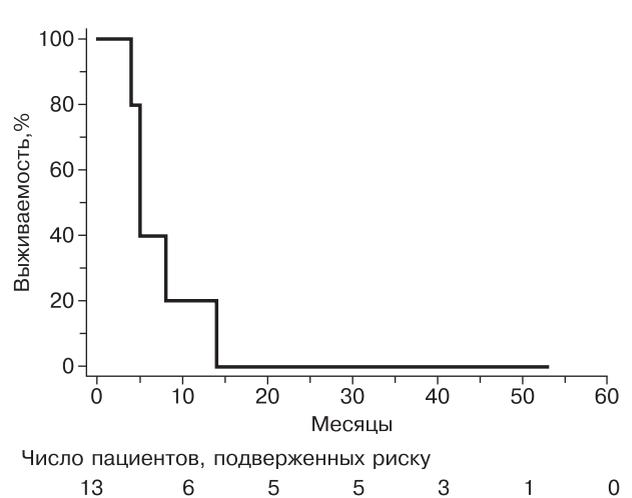


Рис. 3. Безрецидивная выживаемость пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи.