

## ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ СЕМЕЙНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Аронов Д.А.<sup>1</sup>, Семушина С.Г.<sup>1</sup>, Моисеева Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, e-mail: [evmoise@gmail.com](mailto:evmoise@gmail.com)

Индивидуальное предсказание времени возникновения рака молочной железы (РМЖ) необходимо для ранней диагностики и успешной терапии. Учитывая ключевую роль иммунной системы на всех этапах заболевания: от зарождения раковой клетки до терминальных стадий роста, мы предположили, что некоторые показатели иммунитета могут изменяться ещё до обнаружения опухоли, по крайней мере в популяции мышей с высокой частотой естественно проявляющегося РМЖ. Цель данного исследования: оценить изменения показателей иммунной системы крови у стареющих предраковых самок в зависимости от возраста и исхода. У интактных самок мышей BLRB и BYRB (n=81) в возрасте от 27 до 99 недель с помощью проточной цитометрии прижизненно измерили 12 показателей клеточного иммунитета в крови. В течение 28 недель регистрировали проявление РМЖ и выживание реципиентов. Данные были стратифицированы в зависимости от исхода: группа 1 – самки с обнаруженными РМЖ; группа 2 – самки погибали по мере старения без симптомов РМЖ; группа 3 – были живы без симптомов РМЖ. Мы установили зависимость для 11 иммунологических показателей от возраста самки на момент забора крови. Показано, что ряд особенностей проявления иммунологического старения у мышей используемых линий сходен с таковыми у человека. У стареющих (до 55 нед.) и более старых самок (старше 56 нед.) прогностической ценностью для диагностики РМЖ обладают разные иммунологические показатели: низкий уровень NK-клеток для стареющих самок и сочетание высокого уровня Т-хелперов и низкого уровня В-лимфоцитов для исходно более старых самок. Таким образом, показатели иммунной системы изменяются задолго до возникновения опухоли в изучаемой мышинной модели. Это может служить основой для построения статистических моделей индивидуального прогноза возникновения РМЖ как в эксперименте, так и в клинике.

Ключевые слова: рак молочной железы, иммунная система, прогноз, спонтанная мышинная модель.

## PROGNOSTIC VALUE OF IMMUNOLOGICAL BLOOD PARAMETERS IN THE MOUSE MODEL OF FAMILIAL BREAST CANCER

Aronov D.A.<sup>1</sup>, Semushina S.G.<sup>1</sup>, Moiseeva E.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, e-mail: [evmoise@gmail.com](mailto:evmoise@gmail.com)

Individual prediction of the breast cancer (BC) occurrence time is necessary for early diagnosis and successful treatment. Considering the key role of the immune system at all stages of the disease: from the cancer cell initiation to the terminal stages of growth, we hypothesized that some immunological parameters may change even before tumor manifestation, at least in a population of mice with high incidence of naturally occurring (spontaneous) mammary cancer (MC). The purpose of this study was to evaluate changes in the cellular immunological blood parameters of aging pre-cancerous mice, depending on their age and outcome. 12 cellular immunological parameters were measured by flow cytometry in blood of intact BLRB and BYRB females (n=81) aged from 27 to 99 weeks. Within 28 weeks, we recorded the MC occurrence and the survival of recipients. The data were stratified according to the outcome: group 1 - females with detected MC; group 2 –females that died due to ageing without any symptoms of MC; group 3 – alive females without any symptoms of MC. We established the association of 11 immunological parameters with the age of the female at the time of blood sampling. We showed that a number of features of the immunological aging in used mouse strains are similar to those in humans. In elderly (up to 55 weeks) and older females (over 56 weeks), the different immunological parameters had prognostic value for the diagnosis of breast cancer: a low level of NK-cells for elderly females and a combination of a high level of T-helpers and a low level of B-lymphocytes for initially older females. Conclusion. Thus, the parameters of the immune system change long before the MC manifestation in the mouse model used. This can serve as a basis for developing statistical models for individual prognosis of the of BC occurrence both in the experiment and in the clinic.

Keywords: breast cancer, immune system, prognosis, spontaneous mouse model.

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным онкологическим заболеванием женщин. Ранняя диагностика РМЖ необходима для выбора наиболее оптимального плана лечения, позволяющего увеличить продолжительность и качество жизни пациента [1]. В настоящее время маммография является наиболее распространенной процедурой массового скрининга женского населения для выявления РМЖ. Женщинам старше 40 лет во многих странах рекомендуется проходить тестирование ежегодно [2]. Однако, несмотря на значительный вклад проведения маммографии в снижение смертности от РМЖ, эта процедура часто приводит к передиагностике вне зависимости от возраста, в результате чего женщины получают избыточное лечение с массой побочных эффектов [2]. Более того, В. Ден Оттер показал, что частые маммографии сами по себе могут спровоцировать раннее проявление опухоли у женщин, особенно с предрасположенностью к РМЖ [3]. Поэтому мы считаем, что маммография должна быть показана только для подтверждения диагноза, в то время как в основе ранней диагностики должны лежать инструментально измеренные параметры состояния здоровья женщины, позволяющие с достаточно высокой точностью предсказать скорое возникновение РМЖ (по крайней мере, у женщин с семейной предрасположенностью).

Поиск подходов к предсказанию возникновения РМЖ был начат ещё во второй половине XX века. По мере сбора и накопления информации об анамнезе жизни пациентов с РМЖ М. Гейлу удалось обнаружить факторы риска и построить модель индивидуального прогноза вероятности возникновения РМЖ. В данной модели учитывается время менархе, возраст рождения первого ребенка, семейная история РМЖ и другие факторы [4]. В настоящее время модель Гейла является по сути единственной прогностической моделью для РМЖ, она широко используется в клинике и регулярно модифицируется (обсуждается в [4]). Тем не менее главный недостаток всех современных моделей прогноза заключается в невозможности даже примерно предсказать возраст возникновения опухоли у данной женщины. За последние десятилетия были выявлены изменения целого ряда интегральных параметров, характерных для РМЖ, как в эксперименте, так и в клинике: например, гематологических и биохимических показателей в крови лабораторных животных [5; 6] и пациентов с РМЖ [7]. Иммунологические параметры пациента коррелируют с типом РМЖ [8], что неудивительно, поскольку РМЖ возникает в результате сложного многокомпонентного взаимодействия зарождающегося опухолевого ростка с иммунной системой организма [9]. Логично предположить, что некоторые основные иммунологические показатели крови могут изменяться в организме задолго до клинической манифестации РМЖ.

На данный момент выявить процесс инициации опухоли у человека не представляется возможным, поэтому приходится использовать модельные системы, по возможности адекватно описывающие этот процесс. Стандартные мышинные модели РМЖ (как перевиваемые, так и генномодифицированные) не воспроизводят естественный дисбаланс иммунной системы, предшествующий возникновению рака у человека [10]. Ранее мы показали, что самки линии BLRB-Rb(8.17)1<sup>Нem</sup> характеризуются высокой частотой естественно возникающих (спонтанных) опухолей молочной железы (ОМЖ) по мере старения, аналогично тому, как это происходит у женщин с семейной предрасположенностью к РМЖ [9]. Патоморфологический анализ таких опухолей мыши показал наличие многих основных типов РМЖ человека в ходе естественной прогрессии заболевания: от гиперплазии до карциномы *in situ* и инвазивного рака. Проведение цитометрического исследования инфильтратов ОМЖ в параллели с изучением морфологических особенностей этих опухолей не только показало наличие лимфоцитарных инфильтратов, сходных по составу с наблюдающимися в клинике РМЖ, но и позволило выявить у самок мышей с РМЖ прогностическое значение локализации инфильтрата в опухоли, его количественного и популяционного состава [11]. Мы полагаем, что данная спонтанная мышинная модель адекватно отражает ключевые патогенетические механизмы возникновения РМЖ у женщин с семейной предрасположенностью, особенно в отношении взаимодействия иммунной системы и опухоли по мере зарождения и проявления РМЖ. Цель данного исследования: оценить изменения клеточных показателей иммунной системы крови у стареющих самок мышей до проявления у них опухолей молочной железы в спонтанной мышинной модели семейного РМЖ человека.

### **Материалы и методы**

Самки генетически близкородственных авторских линий мышей BLRB-Rb(8.17)1<sup>Нem</sup> и BYRB-Rb(8.17)1<sup>Нem</sup> (далее BYRB и BLRB) [11] с высокой частотой естественно проявляющихся (спонтанных) опухолей молочной железы (ОМЖ) содержались в конвенциональных условиях вивария Института биоорганической химии РАН. Каждой самке на момент регистрации помета в племенном журнале присваивали индивидуальную метку и рассматривали как ветеринарного пациента. После окончания разведения самок содержали группами по 10-15 голов, они составили исходную популяцию интактных стареющих самок (n=81) BLRB и BYRB в возрасте от 27 до 99 недель (средний возраст 55,2±2,0 нед.).

На день начала эксперимента (день 0) у всех мышей были прижизненно взяты образцы крови из ретроорбитального синуса в объеме 200±10 мкл. Эритроциты крови лизировали в растворе хлористого аммония (150 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 10 мМ KHCO<sub>3</sub>, 0.1 мМ

Na<sub>2</sub>EDTA) в течение трех минут, затем пробы осаждали, к осадку добавляли 100 мкл буфера для проточной цитометрии (1% бычьего сывороточного альбумина, 0,1% азида натрия в PBS) и культивировали в течение 30 минут при температуре 4 °C с моноклональными антителами (Biolegend, США): CD4 (FITC), CD8 (FITC), CD3 (FITC), F4/80 (FITC), CD25 (PE), NK1.1 (PE), CD19 (PE), CD11b (PE), CD45 (PerCP). На проточном цитометре FACScan (BD, США) измеряли уровень 12 основных клеточных показателей иммунной системы крови: лимфоцитов (CD45<sup>high</sup>SSC<sup>low</sup>), моноцитов (F4/80<sup>+</sup>SSC<sup>int</sup>), нейтрофилов (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>neg</sup>SSC<sup>int</sup>), эозинофилов (F4/80<sup>+</sup>SSC<sup>high</sup>), Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> Т-хелперов, CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов, NK1.1<sup>+</sup> НК-лимфоцитов, NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> НК-Т лимфоцитов, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> активированных (акт.) Т-хелперов, CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> акт. ЦТЛ. Анализ полученных данных проводили в программе Flowing Software 2.5.1 (Turku Centre for Biotechnology, Финляндия).

Далее в течение 28 недель ежедневно оценивали состояние здоровья и выживание стареющих самок, еженедельно проводили пальпацию молочной железы, регистрируя появление новых ОМЖ. Полученные данные были стратифицированы в зависимости от исхода: группа 1 (n=21) – ОМЖ возникли у самок в среднем возрасте 71±2 нед.; группа 2 (n=37) – самки погибали по мере старения без симптомов ОМЖ, средний возраст гибели 66±4 нед.; группа 3 (n=23) – самки были живы и не имели симптомов ОМЖ, средний возраст 81±3 нед.

Данные хранили в программном пакете MS Office (Microsoft, США). Статистическую значимость различий оценивали в программе STATISTICA 10 (StatSoft, США) по U-критерию Манна-Уитни, связь между параметрами оценивали по коэффициенту корреляции Спирмена. Данные приводили как среднее значение ± стандартная ошибка среднего.

Все исследования с использованием лабораторных животных были одобрены Институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных.

### **Результаты и обсуждение**

На первом этапе анализа полученных данных мы провели сравнение изначальных иммунологических показателей крови, измеренных у интактных самок мышей на день 0 эксперимента, стратифицируя самок в зависимости от их исхода спустя 7 месяцев наблюдений (группы 1, 2 и 3).

У самок группы 1 (ОМЖ были обнаружены в ходе наблюдения) исходный уровень моноцитов был на 33% выше, чем у самок группы 3 без проявления ОМЖ (4,3±0,4% и 3,2±0,2% соответственно, p=0,04). У самок группы 3 уровень лимфоцитов был выше на 9% (p=0,02), уровень моноцитов – ниже на 30% (p=0,02), а уровень нейтрофилов – ниже на 15%

( $p=0,049$ ) по сравнению с показателями самок группы 2, которые погибали по мере наблюдения без проявления ОМЖ. Таким образом, были выявлены достоверные различия по ряду иммунологических показателей самок группы 1 по сравнению с показателями самок группы 3, но не с показателями самок группы 2. Таким образом, сравнение иммунологических параметров для изучаемых трех групп в исходной популяции самок не позволило выявить достоверных различий по уровню иммунологических показателей между самками, погибшими с обнаруженными ОМЖ, и самками, погибшими без обнаружения ОМЖ.

Далее мы предположили, что некоторые показатели иммунной системы могут изменяться противоположным образом по мере естественного старения мышей. Мы использовали коэффициент корреляции Спирмена для оценки зависимости иммунологических показателей крови от исходного возраста реципиентов. Мы обнаружили достоверную связь 11 из 12 измеренных показателей с возрастом самки на момент забора крови: уровень лимфоцитов, эозинофилов,  $CD3^+$  Т-лимфоцитов,  $CD4^+$  Т-хелперов,  $CD4^+CD25^+$  акт. Т-хелперов, НК и НК-Т лимфоцитов снижался, а уровень нейтрофилов,  $CD8^+$  ЦТЛ,  $CD8^+CD25^+$  акт. ЦТЛ и  $CD19^+$  В-лимфоцитов повышался с возрастом (таблица). Полученные данные указывают на то, что с возрастом у интактных самок BLRB и BYRB нарастал иммунологический дисбаланс ещё до возникновения у них опухолей.

Зависимость иммунологических показателей самок BLRB и BYRB от возраста на момент забора крови

Показатель	Тип связи (значение R)	Изменение с возрастом	Уровень значимости
Лимфоциты	Слабая обратная ( $R=-0,3$ )	Снижался	$p=0,0037$
Моноциты	Отсутствует	Не изменялся	-
Нейтрофилы	Слабая прямая ( $R=0,3$ )	Повышался	$p=0,0045$
Эозинофилы	Слабая обратная ( $R=-0,2$ )	Снижался	$p=0,028$
$CD3^+$ Т-лимфоциты	Умеренная обратная ( $R=-0,4$ )	Снижался	$p=0,0005$
$CD4^+$ Т-хелперы	Сильная обратная ( $R=-0,8$ )	Снижался	$p<0,0001$
$CD8^+$ ЦТЛ	Умеренная прямая ( $R=0,5$ )	Повышался	$p<0,0001$
$CD4^+CD25^+$ акт. Т-хелперы	Слабая обратная ( $R=-0,3$ )	Снижался	$p=0,0111$
$CD8^+CD25^+$ акт. ЦТЛ	Умеренная прямая ( $R=0,6$ )	Повышался	$p<0,0001$
$CD19^+$ В-лимфоциты	Умеренная прямая ( $R=0,4$ )	Повышался	$p=0,0002$

NK1.1 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> NK-лимфоциты	Умеренная обратная (R=-0,6)	Снижался	p<0,0001
NK1.1 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> NK-T лимфоциты	Слабая обратная (R=-0,2)	Снижался	p=0,0265

Феномен «иммуносенесценции», т.е. «старения» иммунной системы, описан для человека. Например, Sansoni с соавторами приводят данные о снижении числа CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup> Т-хелперов у пожилых лиц (обсуждается в [12]), что соответствует полученным нами результатам в мышинной модели. При этом у пожилых людей уровень CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-лимфоцитов повышался, а уровень CD8<sup>+</sup> ЦТЛ и CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов снижался уже после 70 лет. Однако у стареющих самок мышей (в исследуемом временном диапазоне возраст в неделях у мыши приблизительно соответствует возрасту человека в годах) мы наблюдали противоположную зависимость. По-видимому, эти различия обусловлены высокой предрасположенностью мышей линий BLRB и BYRB к возникновению спонтанных ОМЖ: противоопухолевый иммунитет, который может быть обусловлен ЦТЛ и В-лимфоцитами (см. далее), оставался активным на всём протяжении латентного периода до возникновения опухоли.

Ранее мы предложили персонализированную 3С-парадигму биомедицинского исследования [6; 13]. Согласно одной из трех составляющих нашей концепции, стратификация реципиентов на этапе анализа полученных данных по параметру, способному изменяться по ходу эксперимента разнонаправленно и повлиять на изучаемый процесс противоположным образом, дает возможность выявить эти разнонаправленные закономерности в более однородных группах. В настоящем исследовании мы выявили достоверные разнонаправленные изменения показателей ИС в зависимости от возраста мышей, что стало основанием для деления исходной популяции мышей на более молодых (n=45, 42±1 нед.) и более старых (n=36, 72±2 нед.), чтобы далее рассматривать зависимость иммунологических показателей от возраста в этих двух независимых выборках.

Спустя 28 недель ОМЖ возникли у более молодых самок в возрасте 62±3 нед. (n=8, группа 1). Погибли без симптомов ОМЖ самки в возрасте 48±3 нед. (n=21, группа 2). Были живы без симптомов ОМЖ самки в возрасте 74±2 нед. (n=16, группа 3). Изучив иммунологические показатели у популяции исходно более молодых самок, мы обнаружили, что низкий уровень НК-клеток изначально было характерен для самок группы 1, у которых впоследствии были обнаружены ОМЖ (1,1±0,1% против 1,6±0,1% группы 2, p=0,009; и 1,5±0,1% группы 3, p=0,03; рис. 1). Снижение уровня натуральных киллеров с возрастом может говорить о понижении одного из звеньев врожденного противоопухолевого

иммунитета у самок высокоразовых линий мышей. Уменьшение числа NK-клеток в периферической крови пациентов с РМЖ по сравнению со здоровыми донорами было показано и в клинике [14].

В подгруппе более старых самок исходной популяции ОМЖ возникли у мышей в возрасте  $76 \pm 2$  нед. ( $n=13$ , группа 1), погибли без признаков ОМЖ самки в возрасте  $89 \pm 5$  нед. ( $n=16$ , группа 2), и остались живы спустя 28 недель наблюдения самки в возрасте  $97 \pm 3$  нед. ( $n=7$ , группа 3). Исходный уровень В-лимфоцитов у самок группы 1 был ниже, чем у самок группы 3 ( $18,0 \pm 1,2\%$  против  $23,4 \pm 1,5\%$ ,  $p=0,01$ ), а исходный уровень Т-хелперов был выше, чем у самок группы 2 ( $18,1 \pm 1,2\%$  против  $12,8 \pm 1,4\%$ ,  $p=0,02$ ). Таким образом, сочетание двух параметров, а именно: исходно низкого уровня В-лимфоцитов и высокого уровня Т-хелперов, было характерно для более старых самок с обнаруженными впоследствии ОМЖ (рис. 2). В подгруппе более старых самок различий по исходному уровню NK-клеток между мышами группы 1 и остальными не наблюдалось, по-видимому, из-за характерного для данной популяции самок с предрасположенностью к ОМЖ естественного снижения NK-клеток с возрастом (таблица).

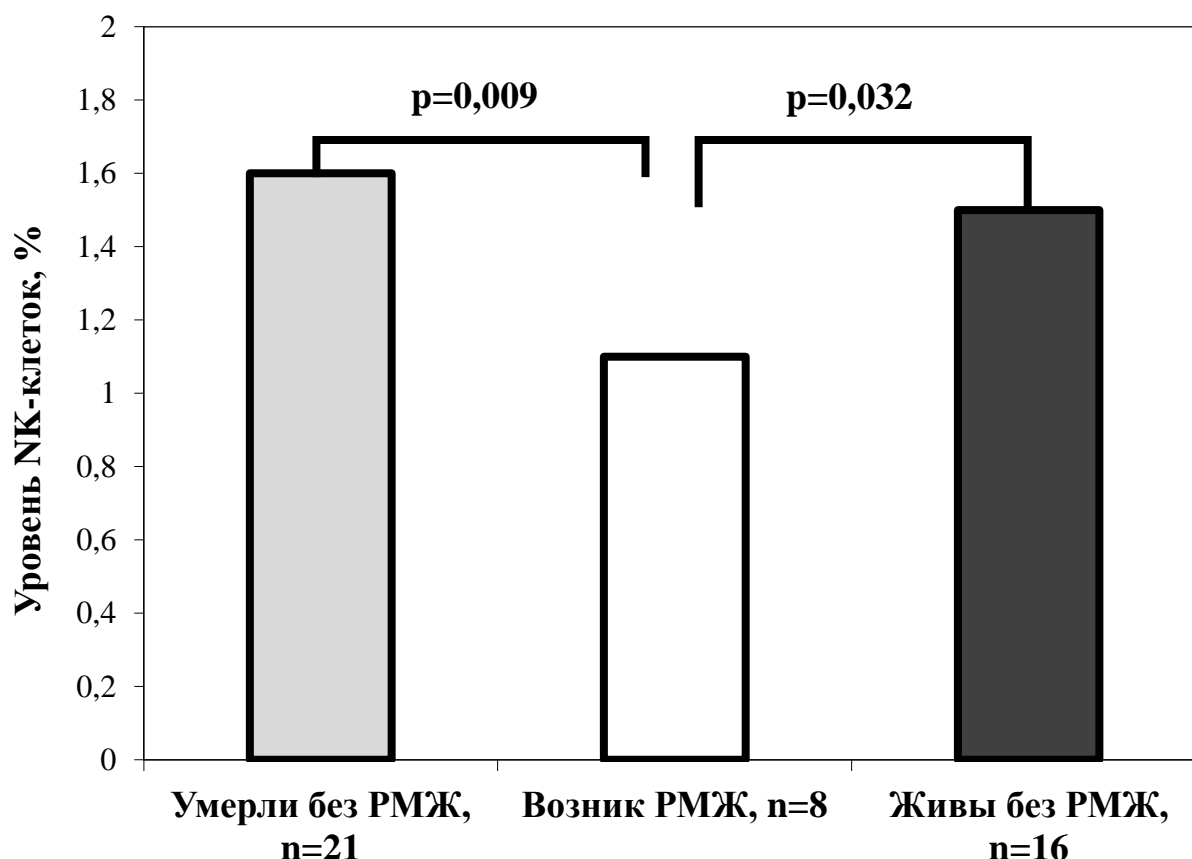


Рис. 1. Исходный уровень NK-клеток в крови более молодых самок

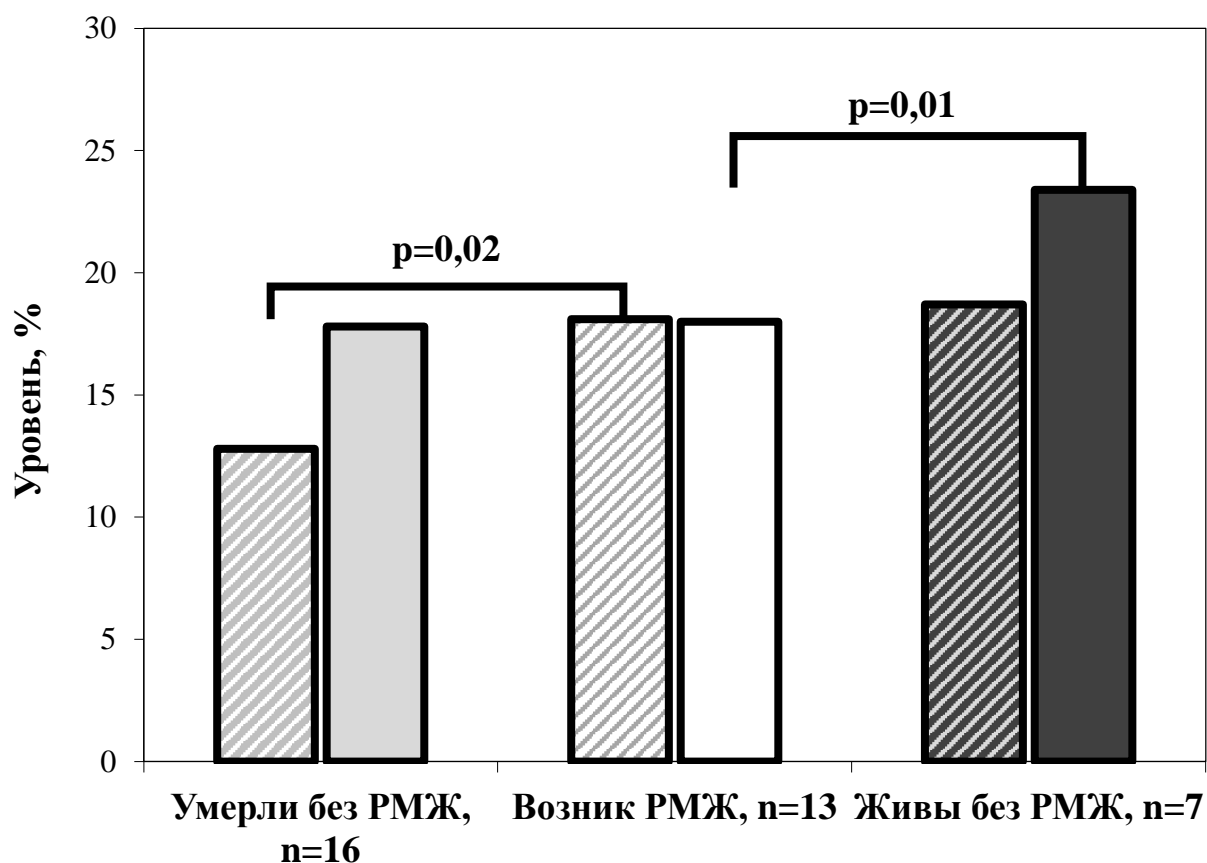


Рис. 2. Изначальные уровни Т-хелперов (заштрихованные столбцы) и В-лимфоцитов (столбцы без штриховки) в крови более старых самок

В настоящее время известны данные (как экспериментальные, так и клинические) в пользу предположения о наличии как про-, так и противоопухолевой активности В-лимфоцитов (обсуждается в [15]). Полученные нами данные наводят на мысль, что у более старых самок со сниженной функцией NK-опосредованного врожденного иммунного ответа, возможно, преобладала В-клеточная регуляция противоопухолевого иммунитета, так как только самки с высоким исходным уровнем В-лимфоцитов (равно как и Т-хелперов) остались живы без признаков опухоли на конец наблюдения.

### Заключение

В данном исследовании мы обнаружили, что самки генетически близкородственных линий BLRB и BYRB с высокой частотой естественно возникающих опухолей молочной железы в целом воспроизводят возрастной иммунологический дисбаланс (то есть феномен иммуносенесценции), характерный для человека. Мы показали, что в данной мышинной модели рака молочной железы человека иммунологические показатели крови изменяются задолго до обнаружения опухоли. Только стратифицируя мышей по возрасту, удалось обнаружить, что предопределял возникновение опухолей у исходно более молодых и более



старых самок дисбаланс разных звеньев иммунной системы. Таким образом, показатели иммунной системы, очевидно, обладают прогностическим потенциалом для предсказания времени возникновения рака молочной железы. Применяемые нами методы (стратификация популяции реципиентов по возрасту) и полученные результаты (выявление разнонаправленных закономерностей в более молодом и более пожилом возрасте) могут послужить основанием для построения статистических моделей индивидуального прогноза времени возникновения ОМЖ как в эксперименте, так и у пациентов с РМЖ в клинике. Следует обратить внимание на фундаментальное значение полученных данных, которые вносят очевидный вклад в процесс дальнейшего изучения роли субпопуляций НК-клеток, Т-хелперов и В-лимфоцитов в канцерогенезе.

### Список литературы

1. Walters S., Maringe C., Butler J. et al. ICBP Module 1 Working Group. Breast cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK, 2000-2007: a population-based study // *Br. J. Cancer*, 2013, vol. 108, pp. 1195-1208.
2. Løberg M., Lousdal M.L., Bretthauer M., Kalager M. Benefits and harms of mammography screening // *Breast Cancer Res.*, 2015, vol. 17, p. 63.
3. Den Otter W., Merchant T.E., Beijerinck D., Koten J.W. Breast cancer induction due to mammographic screening in hereditarily affected women // *Anticancer Res.*, 1996, vol. 16, no. 5B, pp. 3173-3175.
4. Gail M.H. Twenty-five Years of Breast Cancer Risk Models and Their Applications // *J. Natl. Cancer Inst.*, 2015, vol. 107, no. 5, p. djv042.
5. Иммуноterapia перевиваемого рака молочных желез интерлейкином-2: зависимость продолжительности жизни от изначального гематологического статуса / Е.В. Моисеева [и др.] // *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России*. - 2012. - Т. 4. - № 12. - С. 27.
6. Преимущества новой парадигмы экспериментальной онкологии: индивидуальный прогноз иммунотерапии на основании анализа суррогатных биомаркеров / Е.В. Моисеева [и др.] // *Молекулярная медицина*. - 2014. - № 2. - С. 47-50.
7. Zelig U., Barlev E., Bar O. et al. Early detection of breast cancer using total biochemical analysis of peripheral blood components: a preliminary study // *BMC Cancer*, 2015, vol. 15, p. 408.
8. Herrera A.C., Panis C., Victorino V.J. et al. Molecular subtype is determinant on inflammatory status and immunological profile from invasive breast cancer patients // *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, vol. 61, no. 11, pp. 2193-2201.

9. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The three Es of cancer immunoediting // *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, vol. 22, pp. 329-360.
10. Vargo-Gogola T., Rosen J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all // *Nat. Rev. Cancer*, 2007, vol. 7, no. 9, pp. 659-672.
11. Moiseeva E.V. *Anti-breast Cancer Drug Testing. Original Approaches. Novel Set of Mouse Models.* Saarbrücken, Germany: Lambert academic publishing, 2009, p. 210.
12. Sansoni P., Vescovini R., Fagnoni F. et al. The immune system in extreme longevity // *Exp. Gerontol.*, 2008, vol. 43, no. 2, pp. 61-65.
13. Moiseeva E. Towards personalized paradigm of experimental anticancer research with “3S” concept // *EPMA J.*, 2011, vol. 2, suppl. 1, pp. S114-S115.
14. Muraro E., Comaro E., Talamini R. et al. Improved Natural Killer cell activity and retained anti-tumor CD8(+) T cell responses contribute to the induction of a pathological complete response in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy // *J. Transl. Med.*, 2015, vol. 13, p. 204.
15. Fremd C., Schuetz F., Sohn C. et al. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology*, 2013, vol. 2, no. 7, p. e25443.