

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-3-25-33>

Взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов больных раком молочной железы с результатами лечения

Т.Н. Заботина, А.И. Черткова, А.А. Борунова, Е.Н. Захарова, Э.К. Шоуа, Е.В. Артамонова,
Е.И. Коваленко, М.В. Хорошилов, З.Г. Кадагидзе

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Татьяна Николаевна Заботина tatzabotina@yandex.ru

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) относится к гетерогенным заболеваниям. В последние годы стало очевидным, что РМЖ является иммуногенной опухолью. В достаточном числе случаев обнаруживается выраженная инфильтрация опухолевой ткани иммунными клетками, присутствие которых может влиять на клиническое течение заболевания. Иммуногенность РМЖ варьирует в зависимости от молекулярного подтипа.

Цель исследования – изучение основных показателей системного и локального иммунитета у больных РМЖ до лечения и определение их взаимосвязи с непосредственными результатами неoadъювантной химиотерапии.

Материалы и методы. В исследование были включены пациентки со II–III стадиями РМЖ, которые получали стандартную неoadъювантную химиотерапию в соответствии с молекулярными подтипами РМЖ. Методом проточной цитофлуориметрии до лечения определяли процентное содержание основных эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов системного и локального иммунитета.

Результаты. Обнаруженное в опухолевой ткани снижение уровня эффекторных CD8- и CD4-популяций лимфоцитов и повышение уровня клеток супрессорных популяций по сравнению с периферической кровью указывает на иммуносупрессивное состояние локального иммунитета у больных РМЖ. В опухолевой ткани высокий уровень CD8⁺PD-1⁺- и CD4⁺PD-1⁺-клеток ассоциировался с высоким уровнем регуляторных CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low}- и CD8⁺CD11b⁺CD28⁻-лимфоцитов. Были выявлены различия в значимости отдельных популяций лимфоцитов для непосредственных результатов лечения между больными с разными подтипами РМЖ.

Заключение. Определение субпопуляций лимфоцитов, коррелирующих с уровнем PD-1-клеток, а также с результатами проведенного лечения у больных с разными молекулярными подтипами РМЖ поможет более четко понимать особенности противоопухолевого иммунного ответа при данной патологии, а также послужит основой для установления иммунных биомаркеров, которые смогут использоваться в качестве дополнительных предиктивных факторов при различных вариантах лечения больных РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, неoadъювантная химиотерапия, системный и локальный иммунитет, CD8⁺PD-1⁺- и CD4⁺PD-1⁺-лимфоциты, степень лечебного патоморфоза опухоли

Для цитирования: Заботина Т.Н., Черткова А.И., Борунова А.А. и др. Взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов больных раком молочной железы с результатами лечения. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3): 25–33. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25-33.

Relationship of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients with treatment results

Tatiana N. Zabolina, Antonina I. Chertkova, Anna A. Borunova, Elena N. Zakharova, Esma K. Shoua, Elena V. Artamonova,
Elena I. Kovalenko, Maksim V. Horoshilov, Zaira G. Kadagidze

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Shosse,
Moscow 115478, Russia

Contacts: Tatiana Nikolayevna Zabolina tatzabotina@yandex.ru

Introduction. Breast cancer (BC) is an immunogenic tumor. Immune cells infiltration of tumor tissue can affect the clinical course of the disease. The immunogenicity of breast cancer varies depending on the molecular subtype.

The aim of this work was to study the main indicators of systemic and local immunity before patient's treatment and to determine their relationship with the immediate neoadjuvant chemotherapy results.

Materials and methods. Patients with stage II–III BC received standard neoadjuvant chemotherapy in accordance with the molecular subtypes. The percentage of the main effector and regulatory lymphocytes populations of systemic and local immunity was determined by flow cytometry.

Results. A decrease in the level of effector CD8 and CD4 lymphocyte populations and an increase in the level suppressor populations in tumor tissue in comparison with peripheral blood indicate an immunosuppressive state of local immunity in BC patients. In tumor tissue, a high level of CD8⁺PD-1⁺ and CD4⁺PD-1⁺ cells were associated with a high level of regulatory CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} and CD8⁺CD11b⁻CD28⁻ lymphocytes. Differences were found in the significance of individual lymphocyte populations for the immediate results of treatment between patients with different subtypes of breast cancer.

Conclusion. Determination of lymphocyte subpopulations correlating with the level of PD-1 cells, and the results of treatment in patients with different molecular BC subtypes, will help a clearer understanding of the antitumor immune response in this pathology, and will also serve as a basis for identifying immune biomarkers that can be used as additional predictive factors in various treatment options for BC patients.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, systemic and local immunity, CD8⁺PD-1⁺ and CD4⁺PD-1⁺ lymphocytes, tumor pathomorphosis

For citation: Zabotina T.N., Chertkova A.I., Borunova A.A. et al. Relationship of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients with treatment results. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(3):25–33. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25-33.

Введение

Рак молочной железы (PMЖ) является наиболее частым злокачественным новообразованием у женщин и на молекулярном уровне определяется как гетерогенное заболевание. В последние годы стало очевидным, что PMЖ – иммуногенная опухоль [1, 2], и иммуногенность варьирует в зависимости от молекулярного подтипа опухоли [1, 3]. В последнее время в клинике при лечении многих типов рака, включая PMЖ [4, 5], широко используются моноклональные антитела, направленные против коингибиторных рецепторов Т-клеток и их лигандов, таких как PD-1/PD-L1 (ингибиторы контрольных точек иммунитета) [6, 7]. PD-1 – один из ключевых коингибиторных рецепторов, экспрессируемых на Т-клетках при их активации. Взаимодействие рецептора PD-1 с лигандами (PD-L1/PD-L2) в конечном итоге приводит к гибели активированных Т-клеток. Опухолевые клетки используют эти ингибиторные механизмы для ускользания от иммунологического надзора [7, 8]. Взаимодействие PD-1/PD-L1 является важным, однако не единственным фактором, который может определять клинический исход заболевания. Значительное влияние на клинический ответ, как на иммунотерапию, так и на другие методы лечения, включая химиотерапию, обеспечивает функционирование всех клеток иммунной системы, в первую очередь лимфоцитов системного и локального иммунитета, тесно взаимодействующих друг с другом. В то же время реализация PD-1/PD-L1-пути может воздействовать на различные популяции иммунных клеток, в том числе на их уровень в периферической крови (ПК)

и в составе лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (ЛИО) [9–11].

В связи с этим исследование значения основных популяций лимфоцитов системного и локального иммунитета для результатов лечения больных PMЖ, а также взаимосвязи CD8⁺PD-1⁺- и CD4⁺PD-1⁺-клеток с другими популяциями лимфоцитов представляется актуальным и может внести вклад в понимание функционирования иммунной системы при PMЖ.

Цель исследования – изучение основных показателей системного и локального иммунитета больных PMЖ до лечения и определение их взаимосвязи с непосредственными результатами неoadъювантной химиотерапии (степенью лечебного патоморфоза опухоли (ЛПО)).

Материалы и методы

В исследование были включены 65 пациенток со II–III стадиями PMЖ, со следующими подтипами опухоли: трижды негативный (ТН PMЖ) ($n = 23$) – PЭ⁻, РП⁻, HER2⁻; люминальный В HER2-негативный (ЛВ HER2⁻) PMЖ ($n = 23$) – PЭ⁺ и/или РП⁺, HER2⁻, Ki-67 ≥ 20 %; люминальный В HER2-позитивный (ЛВ HER2⁺) PMЖ ($n = 11$) – PЭ⁺ и/или РП⁺, HER2⁺; HER2-позитивный (HER2⁺) PMЖ ($n = 8$) – PЭ⁻, РП⁻, HER2⁺*. Медиана возраста пациенток составила 47 лет (28–69 лет). Все пациентки получали неoadъювантную химиотерапию с последовательным применением химиопрепаратов антрациклинового и таксанового ряда в стандартном режиме. При наличии гиперэкспрессии HER2 использовались стандартные

*PЭ – рецепторы эстрогенов; РП – рецепторы прогестерона; HER2 (ErbB-2) – рецептор эпидермального фактора роста, тип 2.

таксановые режимы с добавлением таргетных анти-HER2-препаратов (трастузумаб и пертузумаб). В операционном материале у всех пациенток определяли степень ЛПО. Оценка степени ЛПО проводилась по схеме Г.А. Лавниковой [12].

Иммунологическое исследование. Кровь и образцы опухолевой ткани (Core-биопсия) для исследования брали непосредственно перед началом химиотерапии. Лимфоциты выделяли из ПК (лимфоциты периферической крови (ЛПК)) и полученной из опухолевой ткани клеточной суспензии (ЛИО) по параметрам светорассеяния и экспрессии CD45. Для исследования субпопуляционного состава ЛПК и ЛИО проводили 2-, 3- и 4-цветное окрашивание клеток с использованием панели моноклональных антител к поверхностным и внутриклеточным (Perforin) маркерам лимфоцитов. Методом проточной цитофлуориметрии на 5-параметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur производства компании Becton Dickinson (США) определяли процентное содержание следующих популяций лимфоцитов: Т-клеток ($CD3^+CD19^-$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$), активированных Т-клеток ($CD4^+CD25^+$, $CD3^+HLA-DR^+$), В-клеток ($CD3^-CD19^+$), активированных $CD25^-$, $HLA-DR^-$, $CD3^-HLA-DR^+$ -лимфоцитов, регуляторных (T_{reg}) $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}$ -Т-лимфоцитов ($CD4 T_{reg}$), $CD3^+CD16^+CD56^-$ -НКТ- и $CD3^-CD16^+CD56^+$ -НК-клеток, $CD8^+$ Perforin $^+$ - и $CD16^+$ Perforin $^+$ -клеток, $CD8^+CD279^-$ - и $CD4^+CD279^-$ -лимфоцитов. С помощью дополнительного гейтирования $CD45^+CD8^+$ -клеток в составе $CD8^-$ популяции определяли процентное содержание $CD8^+CD11b^-CD28^-$, $CD8^+CD11b^+CD28^-$, $CD8^+CD11b^+CD28^+$ - и $CD8^+CD11b^-CD28^+$ -лимфоцитов. Цитотоксический потенциал $CD16^-$ и $CD8^-$ -лимфоцитов оценивался как процент Perforin-позитивных клеток в составе соответствующей популяции.

Статистический анализ данных проводили с помощью программного пакета для статистического анализа Statistica 7. Характер распределения иммунологических показателей устанавливали с использованием критерия Колмогорова—Смирнова (для $n > 50$) и Шапиро—Уилка (для $n < 50$). В связи с разным характером распределения переменных в сравниваемых группах все данные представлены в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го перцентилей (квартилей). Определение различий между показателями 2 независимых групп проводилось с использованием двустороннего U-критерия Манна—Уитни (U) и критерия Вальда—Вулфовица. Для выявления различий между несколькими группами показателей использовали критерий Краскела—Уоллиса. Для оценки корреляционной взаимосвязи между переменными определяли коэффициенты корреляции Спирмена (ρ) и Гамма (γ), рассчитывали 95 % доверительный интервал для ко-

эффициентов корреляции. Уровень значимости во всех исследованиях был принят равным 0,05.

Результаты и обсуждение

При сравнении уровней всех определявшихся в работе популяций ЛПК и ЛИО у пациенток с разными подтипами РМЖ выявлено только 1 различие в процентном содержании $CD3^-CD16^+CD56^-$ -НК-клеток ПК между больными с ЛВ HER2 $^-$ РМЖ и с HER2 $^+$ РМЖ: 14,5 (11,5–20,4) % и 8,9 (6,5–11,7) % соответственно, $p = 0,043$ (критерий Краскела—Уоллиса). В дальнейших исследованиях пациентки с ЛВ HER2 $^+$ РМЖ и HER2 $^+$ РМЖ были объединены в 1 группу. В некоторых случаях пациентки с разными подтипами РМЖ исследовались вместе.

Определение субпопуляционного состава ЛПК и ЛИО показало значительные различия между ними (табл. 1). С одной стороны, в составе ЛИО отмечался более высокий процент $CD3^-$, $CD3^+CD8^+$ -Т-клеток, $CD8^+CD11b^+CD28^+$ -Т-клеток памяти по сравнению с ПК и сходный с ПК уровень $CD3^+CD4^+$ -Т-клеток, что может указывать на привлечение в опухолевую ткань основных популяций адаптивного иммунитета. Преобладание в составе ЛИО Т-клеток было продемонстрировано у больных и с другими злокачественными новообразованиями [13, 14]. С другой стороны, в составе ЛИО был повышен по сравнению с ПК уровень регуляторных (супрессорных) Т-лимфоцитов: $CD4 T_{reg}$ ($CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}$) и $CD8-T_{reg}$ ($CD8^+CD11b^-CD28^-$). При этом в составе $CD4^-$ популяции ПК помимо $CD4 T_{reg}$ обнаруживались и активированные нерегуляторные $CD4^+CD25^+$ -Т-клетки, а в опухолевой ткани все $CD4^+CD25^+$ -Т-клетки являлись $CD4 T_{reg}$. Следует отметить, что значительным по сравнению с ПК было повышение уровня $CD8-T_{reg}$, которые оказались преобладающей популяцией в составе $CD8$ ЛИО (44,1 %), в отличие от $CD8$ ЛПК, где основной популяцией были цитотоксические $CD8^+CD11b^+CD28^-$ -Т-клетки (46,6 %). Выраженное снижение уровня таких эффекторных популяций лимфоцитов, как цитотоксические $CD8^+CD11b^+CD28^-$ -Т-клетки, в том числе $CD8^+$ Perforin $^+$ -лимфоциты, а также активированные $CD4^+CD25^+$ -Т-клетки, наряду с повышением уровня супрессорных популяций может указывать на иммуносупрессивное состояние локального иммунитета у больных РМЖ. Преобладание в составе ЛИО Т-клеток закономерно сочеталось также со сниженным по сравнению с ПК уровнем $CD3^-CD16^+CD56^-$ - и $CD16^+$ Perforin $^+$ -НК-клеток. Уровень $CD8^+PD-1^+$ - и $CD4^+PD-1^+$ -лимфоцитов также был намного выше в опухоли, чем в ПК, — почти в 8 и 2,7 раза соответственно. Полученные данные согласуются с утверждением, что в процессе взаимодействия растущей опухоли с иммунной системой формируется сложное, в основном

Таблица 1. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у больных раком молочной железы

Table 1. Subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer patients

Популяция лимфоцитов Lymphocyte population	Периферическая кровь, Ме (квартили), % Peripheral blood, Me (quartiles), %	Опухоль, Ме (квартили), % Tumor, Me (quartiles), %	<i>p</i> (U)
CD3 ⁺ CD19 ⁻	78,9 (73,7–83,8)	86,3 (80,4–90,3)	0,000
CD3 ⁺ CD4 ⁺	42,2 (35,5–48,3)	44,1 (38,2–50,5)	0,531
CD3 ⁺ CD8 ⁺	28,5 (23,4–32,1)	40,8 (33,0–48,0)	0,000
CD3 ⁻ CD8 ⁺	5,5 (4,1–8,4)	2,1 (1,1–3,4)	0,015
CD3 ⁻ CD19 ⁺	4,9 (1,3–7,3)	3,7 (2,2–7,7)	0,762
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	9,1 (6,6–13,4)	11,5 (6,2–25,5)	0,079
HLA-DR	14,3 (10,2–19,8)	21,1 (11,8–31,4)	0,011
CD3 ⁻ HLA-DR ⁺	4,8 (2,5–8,3)	4,6 (2,5–8,5)	0,922
CD25	18,8 (14,4–25,5)	17,3 (12,0–21,4)	0,104
CD4 ⁺ CD25 ⁺	13,6 (10,2–17,0)	8,3 (6,8–11,6)	0,000
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{-/low}	6,5 (5,1–8,2)	10,6 (5,7–17,0)	0,000
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	13,2 (8,5–16,5)	5,1 (2,9–11,0)	0,000
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	11,7 (8,0–16,5)	8,5 (6,2–14,1)	0,078
CD8 ⁺ CD11b ⁺ CD28 ⁻	46,6 (35,8–54,7)	18,4 (12,8–27,4)	0,000
CD8 ⁺ CD11b ⁺ CD28 ⁺	7,8 (6,0–12,1)	11,8 (7,1–15,0)	0,008
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD28 ⁻	7,5 (4,5–11,3)	44,1 (31,7–52,6)	0,000
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD28 ⁺	33,2 (24,3–45,2)	24,8 (16,1–30,0)	0,000
CD16 ⁺ Perforin ⁺	14,0 (9,5–18,4)	3,4 (1,4–4,6)	0,000
CD8 ⁺ Perforin ⁺	16,4 (10,2–20,6)	3,4 (1,9–5,6)	0,000
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,2 (0,9–1,5)	1,0 (0,75–1,36)	0,000
CD8 ⁺ CD279 ⁺ (PD-1)	1,7 (0,9–4,2)	13,4 (6,5–23,2)	0,000
CD4 ⁺ CD279 ⁺ (PD-1)	4,5 (2,6–6,5)	12,2 (8,4–18,50)	0,000

Примечание. Здесь и в табл. 2, 4: U – U-критерий Манна–Уитни.

Note. Here and in tables 2, 4: U – Mann–Whitney U-criterion.

иммуносупрессивное, микроокружение, обеспечивающее ее ускользание от иммунологического надзора [5]. Было также обнаружено, что различия в уровне клеток некоторых популяций ЛПК и ЛИО у пациенток в настоящем исследовании зависели от конкретного подтипа РМЖ. Так, процентное содержание CD4 T_{per} было статистически значимо выше в опухолевой ткани, чем в ПК, только у больных с ЛВ HER2⁻ подтипом; CD3⁺HLA-DR⁺- и HLA-DR-лимфоцитов – у больных с ЛВ HER2⁺ и HER2⁺ подтипами, а CD8⁺CD11b⁺CD28⁺ – только при ТН РМЖ (данные не представлены). Возможно, полученные результаты связаны с различиями в иммуногенности разных молекулярных подтипов РМЖ, что следует

учитывать при исследовании иммунитета у больных с этой формой опухоли [1, 3].

Важную роль в опухолевом микроокружении играют популяции регуляторных (супрессорных) лимфоцитов. Показано, что регуляторные CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-Т-клетки могут вносить свой вклад в результаты анти-PD-1/PD-L1-терапии, а ось PD-1/PD-L1 может влиять на дифференцировку и функцию CD4 T_{per}. Однако сложная взаимосвязь между взаимодействием PD-1/PD-L1 и CD4 T_{per} изучена не полностью [15]. При исследовании взаимосвязи уровня CD8⁺PD-1⁺- и CD4⁺PD-1⁺-клеток с процентным содержанием клеток других популяций ЛИО (табл. 2) было выявлено, что их высокий уровень

сочетался с высоким уровнем регуляторных лимфоцитов, причем не только $CD4 T_{per}^+$: $CD8^+PD-1^+$ – с $CD4 T_{per}$ и $CD8 T_{per}$, а $CD4^+PD-1^+$ – с $CD8 T_{per}$. В свою очередь, повышенное процентное содержание $CD4 T_{per}$ ($\geq Me$) ассоциировалось с более высоким уровнем $CD8^+CD279^+$ по сравнению с уровнем этих клеток при $CD4 T_{per} < Me$: 19,8 (11,8–27,5) % ($n = 21$) и 11,4 (5,3–15,5) % ($n = 21$) соответственно; $p = 0,015$. В ПК процентное содержание клеток, экспрессирующих рецептор PD-1, не имело значения для уровня регуляторных популяций лимфоцитов. Полученные результаты указывают на наличие в опухолевом микроокружении у больных РМЖ положительной ассоциации между уровнем CD8- и CD4-лимфоцитов, экспрессирующих ингибиторный рецептор PD-1, и уровнем супрессорных клеток, участвующих в подавлении противоопухолевого иммунного ответа.

Определение значения исходного уровня ЛПК и ЛИО для непосредственных результатов лечения больных РМЖ у всей группы пациенток выявило ассоциацию повышенного процентного содержания НК-клеток, как в ПК ($CD3^+CD16^+CD56^+$ и $CD3^+CD8^+$), так и в составе ЛИО ($CD3^+CD16^+CD56^+$), с более низкой степенью ЛПО (табл. 3). У пациенток с I–III степенью ЛПО процент $CD3^+CD16^+CD56^+$ -НК-клеток и в ПК, и в опухоли был статистически значимо выше по сравнению с пациентками с высокой IV степенью ЛПО: в ПК – 14,6 (9,9–18,6) % и 9,2 (8,2–13,4) % соответственно ($p = 0,007$, U), в опухоли – 9,2 (3,3–13,7) % и 4,4 (2,5–6,5) % соответственно ($p = 0,045$, U).

Исследование взаимосвязи исходного уровня ЛПК и ЛИО с непосредственными результатами лечения позволило выявить различия в значимости отдельных популяций лимфоцитов у больных с разными

Таблица 2. Взаимосвязь процентного содержания $CD8^+PD-1^+$ - и $CD4^+PD-1^+$ -лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, с уровнем клеток других популяций

Table 2. Relationship between the percentage of $CD8^+PD-1^+$ and $CD4^+PD-1^+$ tumor infiltrating lymphocytes with the level of cells of other populations

Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (%) Tumor infiltrating lymphocytes (%)	CD8 ⁺ PD-1 ⁺ , Me = 13,4				p (U)
	≥Me		<Me		
	n	Медиана (квартили) Median (quartiles)	n	Медиана (квартили) Median (quartiles)	
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low}	22	12,5 (10,1–18,9)	21	6,7 (3,95–13,45)	0,014
CD8 ⁺ CD11b–CD28 [–]	22	50,2 (44,0–57,1)	21	38,8 (29,5–47,1)	0,009
CD4 ⁺ CD279 ⁺	25	18,0 (12,0–22,2)	25	10,3 (5,6–12,7)	0,000
	CD4 ⁺ PD-1 ⁺ , Me = 12,2				
	≥Me		<Me		
CD8 ⁺ CD11b–CD28 [–]	22	52,7 (38,8–58,3)	21	40,2 (29,5–49,4)	0,004
CD8 ⁺ CD279 ⁺	25	20,3 (11,7–26,4)	25	7,9 (4,9–16,3)	0,000

Примечание. n – число пациенток.
Note. n – number of patients.

Таблица 3. Корреляционная взаимосвязь процентного содержания лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, до лечения со степенью лечебного патоморфоза опухоли у больных со всеми подтипами РМЖ

Table 3. Correlation between the percentage of tumor infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes before treatment with the degree of tumor pathomorphosis in patients with all subtypes of breast cancer

Популяция лимфоцитов Lymphocyte population		ρ (95 % ДИ) ρ (95 % CI)	p
Периферическая кровь (n = 65) Peripheral blood (n = 65)	CD3–CD16 ⁺ CD56 ⁺	–0,325 (–0,531; –0,083)	0,008
	CD3–CD8 ⁺	–0,290 (–0,502; –0,045)	0,019
Опухоль (n = 48) Tumor (n = 48)	CD3–CD16 ⁺ CD56 ⁺	–0,315 (–0,558; –0,023)	0,031

Примечание. Здесь и в табл. 4: ρ – коэффициент корреляции Спирмена; ДИ – доверительный интервал.
Note. Here and in table 4: ρ – Spearman's correlation coefficient; CI – confidence interval.

Таблица 4. Взаимосвязь процентного содержания лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, до лечения со степенью лечебного патоморфоза опухоли (ЛПО) в зависимости от подтипа рака молочной железы (РМЖ)

Table 4. Relationship between the percentage of tumor infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes before treatment with the degree of tumor pathomorphosis, depending on the subtype of breast cancer (BC)

Подтип РМЖ, популяция лимфоцитов Subtype of BC, lymphocyte populations	Содержание лимфоцитов, Ме (квартили), % Percentage of lymphocytes, Me (quartiles), %		p (U)	ρ (95 % ДИ) ρ (95 % CI)	p
	I–III степень ЛПО I–III tumor pathomorphosis	IV степень ЛПО IV tumor pathomorphosis			
Лимфоциты периферической крови Peripheral blood lymphocytes					
ТН РМЖ TN BC	n = 7	n = 16		n = 23	
CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺	15,2 (13,8–19,8)	8,5 (7,9–13,2)	0,022	–0,530 (–0,783; –0,125)	0,009
CD16 ⁺ Perforin ⁺	20,1 (13,5–24,5)	10,9 (8,6–15,6)	0,039	–0,442 (–0,734; –0,011)	0,035
CD8 ⁺ CD11b-CD28 ⁻	2,5 (1,6–7,7)	8,5 (5,4–11,8)	0,012	0,548 (0,151; 0,793)	0,007
HER2 ⁺ (ЛВ HER2 ⁺ и HER2 ⁺) РМЖ HER2 ⁺ (LB HER2 ⁺ & HER2 ⁺) BC	n = 9	n = 10		n = 19	
CD8 ⁺ CD11b-CD28 ⁺	45,2 (38,0–49,3)	28,5 (24,5–33,2)	0,001	–0,601 (–0,839; –0,168)	0,006
CD8 ⁺ CD11b ⁺ CD28 ⁻	34,9 (33,7–42,6)	52,2 (42,9–54,7)	0,006	0,512 (0,040; 0,797)	0,025
CD8 ⁺ Perforin ⁺	10,1 (8,7–13,8)	19,2 (16,4–20,3)	0,001	0,619 (0,196; 0,848)	0,006
ЦТП CD8 ⁺ Cytotoxic potential CD8 ⁺	40,8 (31,0–46,5)	55,8 (50,0–69,4)	0,011	0,535 (0,072; 0,808)	0,027
ЛВ HER2 ⁻ РМЖ LB HER2 ⁻ BC	n = 18	n = 5		n = 23	
ЦТП CD8 ⁺ Cytotoxic potential CD8 ⁺	45,7 (28,2–63,7)	66,7 (52,0–72,1)	0,166	0,494 (0,077; 0,764)	0,019
CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺	15,8 (13,9–22,9)	11,5 (10,2–13,1)	0,019	–0,262 (–0,624; 0,193)	0,228
Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль Tumor infiltrating lymphocytes					
ТН РМЖ TN BC	n = 12	n = 5		n = 17	
CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺	13,4 (12,6–18,4)	4,45 (3,0–6,0)	0,005, W–W	–0,684 (–0,886; –0,264)	0,035, GC
HER2 ⁺ (ЛВ HER2 ⁺ и HER2 ⁺) РМЖ HER2 ⁺ (LB HER2 ⁺ & HER2 ⁺) BC	n = 16, p > 0,05			p > 0,05	
ЛВ HER2 ⁻ РМЖ LB HER2 ⁻ BC	–				
HLA-DR (n = 11)	–	–	–	0,673 (0,028; 0,922)	0,023
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{-/low} (n = 16)	–	–	–	0,597 (0,084; 0,860)	0,014

Примечание. ТН РМЖ – трижды негативный подтип РМЖ; ЛВ HER2⁺ – люминальный В HER2-позитивный подтип РМЖ; ЛВ HER2⁻ – люминальный В HER2-негативный подтип РМЖ; HER2⁺ – HER2-позитивный подтип РМЖ; ЦТП – цитотоксический потенциал; n – число пациенток; W–W – критерий Вальда–Вулфовица; GC – коэффициент корреляции гамма; p – уровень статистической значимости.

Note. TN BC – triple negative BC; LB HER2⁺ – luminal B HER2-positive BC; LB HER2⁻ – luminal B HER2-negative BC; HER2⁺ – HER2-positive BC; n – number of patients; W–W – Wald–Wolfowitz criterion; GC – Gamma correlation; p – level of statistical significance.

подтипами РМЖ (табл. 4). Оказалось, что повышенный уровень CD3⁺CD16⁺CD56⁺-NK-клеток и в ПК, и в опухоли имел отрицательное значение для степени ЛПО, главным образом при ТН РМЖ. Ранее мы обнаружили взаимосвязь исходно повышенного процентного содержания NK-клеток со снижением безрецидивной и общей выживаемости пациенток с ТН РМЖ [16, 17]. В данном исследовании повышенный уровень натуральных киллеров у больных с низкой степенью ЛПО был отмечен и у больных с ЛВ HER2⁻ РМЖ, однако корреляция между этими показателями была статистически незначимой (см. табл. 4), в связи с чем роль этих клеток при данном подтипе РМЖ требует дальнейшего изучения. Показано, что NK-клетки являются гетерогенной популяцией и могут дифференцироваться не только в цитотоксические, но и в регуляторные популяции, а повторное взаимодействие их с опухолевыми клетками в конечном итоге может приводить к дисфункции NK-клеток и потере ими эффекторных реакций [18]. Было продемонстрировано положительное прогностическое значение CD8-лимфоцитов при разных подтипах РМЖ [19, 20]. В данном исследовании только у больных с HER2-позитивными подтипами РМЖ (ЛВ HER2⁺ и HER2⁺) повышение процентного содержания в ПК эффекторных лимфоцитов CD8⁺CD11b⁺CD28⁻, CD8⁺Perforin⁺ и их цитотоксического потенциала оказалось благоприятным фактором для непосредственных результатов лечения. Ассоциация повышенного уровня наивных CD8⁺CD11b⁻CD28⁻-Т-клеток с низкой степенью ЛПО, возможно, связана с нарушением их дальнейшей дифференцировки в клетки-эффекторы у данной группы больных. При ЛВ HER2⁻ подтипе РМЖ высокая степень ЛПО ассоциировалась с высоким уровнем клеток двух популяций ЛИО — активированных HLA-DR-лимфоцитов и CD4 T_{рег}⁺, указывая в данном случае на их благоприятное значение для непосредственных результатов лечения. В предыдущих исследованиях мы обнару-

жили отрицательную ассоциацию исходного уровня HLA-DR-лимфоцитов с выживаемостью пациенток с ТН РМЖ. Как указывалось ранее, только у больных с ЛВ HER2⁻ подтипом РМЖ было обнаружено повышение в опухолевой ткани процентного содержания CD4 T_{рег}⁺ по сравнению с ПК. Прогностическая значимость CD4 T_{рег}⁺ при различных вариантах злокачественных новообразований, включая РМЖ, описывается как отрицательная, положительная или отсутствующая [21, 22]. Вероятно, эта особенность может касаться и другой супрессорной популяции Т-клеток, такой как CD8⁺CD11b⁻CD28⁻. В данном исследовании исходный уровень клеток этой популяции положительно ассоциировался со степенью ЛПО только у больных с ТН РМЖ. Различий в уровне CD8⁺CD279⁻ и CD4⁺CD279⁺-лимфоцитов в ПК и в опухоли между больными с разной степенью ЛПО ни в целом по группе, ни при разных подтипах РМЖ не наблюдалось.

Заключение

В процессе развития РМЖ в опухоли формируется иммуносупрессивное микроокружение, на что указывает повышение в составе ЛИО супрессорных и снижение эффекторных популяций лимфоцитов. Идентификация популяций лимфоцитов, коррелирующих с уровнем PD-1⁺-клеток, послужит основой для определения дополнительных биомаркеров, которые смогут использоваться для отбора пациентов, чувствительных к иммунотерапии ингибиторами контрольных точек иммунитета. Результаты определения взаимосвязи исходного уровня ЛПК и ЛИО с непосредственными результатами лечения показали, что раздельное исследование циркулирующих и инфильтрирующих опухоль эффекторных и супрессорных лимфоидных популяций у больных с разными молекулярными подтипами РМЖ поможет более четкому пониманию особенностей противоопухолевого иммунного ответа у больных с данной патологией.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J. et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2019;5(1):66. DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2.
- Zhang L., Wang X.I., Ding J. et al. The predictive and prognostic value of Foxp3⁺/CD25⁺ regulatory T cells and PD-L1 expression in triple negative breast cancer. *Ann Diagn Pathol* 2019;40:143–51. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2019.04.004.
- Hammerl D., Smid M., Timmermans A.M. et al. Breast cancer genomics and immuno-oncological markers to guide immune therapies. *Semin Cancer Biol* 2018;52(Pt 2):178–88. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.11.003.
- Planes-Laine G., Rochigneux P., Bertucci F. et al. PD-1/PD-L1 Targeting in Breast Cancer: The First Clinical Evidences Are Emerging. A Literature Review. *Cancers (Basel)* 2019;11(7):1033. DOI: 10.3390/cancers11071033.
- Emens L.A. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res* 2018;24(3):511–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3001.
- Akinleye A., Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol* 2019;12(1):92. DOI: 10.1186/s13045-019-0779-5.
- Han Y., Liu D., Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 2020;10(3):727–42. Available at: <http://ajcr.us/files/ajcr0108072.pdf>.
- Ai L., Xu A., Xu J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond.

- Adv Exp Med Biol 2020;1248:33–59.
DOI: 10.1007/978-981-15-3266-5_3.
9. Pajens S.T., Vledder A., de Bruyn M., Nijman H.W. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cell Mol Immunol* 2021;18(4):842–59.
DOI: 10.1038/s41423-020-00565-9.
 10. Lotfinejad P., Kazemi T., Mokhtarzadeh A. et al. PD-1/PD-L1 axis importance and tumor microenvironment immune cells. *Life Sci* 2020;259:118297.
DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118297.
 11. Schnell A., Schmid C., Herr W., Siska P.J. The Peripheral and Intratumoral Immune Cell Landscape in Cancer Patients: A Proxy for Tumor Biology and a Tool for Outcome Prediction. *Biomedicines* 2018;6(1):25.
DOI: 10.3390/biomedicines6010025.
 12. Лавникова Г.А. Гистологический метод количественной оценки терапевтического повреждения опухоли. М.: Методические рекомендации, 1979. 13 с. [Lavnikova G.A. Histological method for quantifying therapeutic tumor damage. Moscow: Metodicheskiye rekomendatsii, 1979. 13 p. (In Russ.)].
 13. Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А. и др. Многопараметровое исследование иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль у онкологических больных. *Российский онкологический журнал* 2016;21(1–2):51–4. [Zabotina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A. et al. Multiparameter study of the immunophenotype of lymphocytes infiltrating a tumor in cancer patients. *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal = Russian Journal of Oncology* 2016;21(1–2):51–4. (In Russ.)].
 14. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Циклаури В.Т. и др. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и инфильтрирующих опухоль у больных плоскоклеточным раком головы и шеи. *Иммунология* 2019;40(3):10–9. [Zabotina T.N., Chertkova A.I., Tsiklauri V.T. et al. Features of peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes subpopulations in patients with squamous cell head and neck cancer. *Immunologiya = Immunology* 2019;40(3):10–9. (In Russ.)].
DOI: 10.24411/0206-4952-2019-13002.
 15. Cai J., Wang D., Zhang G., Guo X. The Role of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy. *Oncotargets Ther* 2019;12:8437–45.
DOI: 10.2147/OTTS221340.
 16. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н. и др. Взаимосвязь маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов с эффективностью неoadъювантной химиотерапии больных трижды негативным раком молочной железы. *Иммунология* 2021;42(2):112–24. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zabotina T.N. et al. The relationship of markers of early and late lymphocytes activation with the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in patients with triple negative breast cancer with the efficiency of neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer patients. *Immunologiya = Immunology* 2021;42(2):112–24. (In Russ.)].
DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-2-112-124.
 17. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Кадагидзе З.Г. и др. Популяция CD8⁺-лимфоцитов периферической крови и ее значение для непосредственных и отдаленных результатов лечения больных трижды негативным раком молочной железы. *Иммунология* 2020;41(4):326–36. [Zabotina T.N., Chertkova A.I., Kadagidze Z.G. et al. Peripheral blood CD8⁺-lymphocytes populations and its value for direct and outlying treatment results in triple negative breast cancer patients. *Immunologiya = Immunology* 2020;41(4):326–36. (In Russ.)].
DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-326-336.
 18. Wu S.Y., Fu T., Jiang Y.Z., Shao Z.M. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer* 2020;19(1):120.
DOI: 10.1186/s12943-020-01238-x.
 19. Vihervuori H., Autere T.A., Repo H. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8⁽⁺⁾ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019;145(12):3105–14.
DOI: 10.1007/s00432-019-03036-5.
 20. 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.
DOI: 10.1093/annonc/mdu191.
 21. deLeeuw R.J., Kost S.E., Kakal J.A., Nelson B.H. The prognostic value of FoxP3⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clin Cancer Res* 2012;18(11):3022–9.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3216.
 22. Shang B., Liu Y., Jiang S.J., Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2015;5:15179.
DOI: 10.1038/srep15179.

Вклад авторов

Т.Н. Заботина: разработка плана исследования, написание текста рукописи;
 А.И. Черткова: анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;
 А.А. Борунова: статистическая обработка данных;
 Е.Н. Захарова: подготовка полученных данных к анализу;
 Э.К. Шоуа: создание базы клинических данных;
 Е.В. Артамонова: клинические исследования, обработка клинических данных;
 Е.И. Коваленко: клинические исследования, сбор и обработка клинических данных;
 М.В. Хорошилов: получение данных для анализа;
 З.Г. Кадагидзе: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и научное редактирование рукописи.

Authors contributions

T.N. Zabotina: development of a research plan, writing the text of the manuscript;
 A.I. Chertkova: analysis and interpretation of data, writing the text of the manuscript;
 A.A. Borunova: statistical data processing;
 E.N. Zakharova: preparation of the obtained data for analysis;
 E.K. Shoua: creation of a clinical database;
 E.V. Artamonova: clinical trials, processing of clinical data;
 E.I. Kovalenko: clinical trials, collection and processing of clinical data;
 M.V. Khoroshilov: obtaining data for analysis;
 Z.G. Kadagidze: review of publications on the topic of the article, discussion and scientific editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.Н. Заботина / T.N. Zabolina: <http://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

А.И. Черткова / A.I. Chertkova: <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>

А.А. Борунова / A.A. Borunova: <http://orcid.org/0000-0002-1854-3455>

Е.Н. Захарова / E.N. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>

Э.К. Шоуа / E.K. Shoua: <https://orcid.org/0000-0003-3937-474X>

Е.В. Артамонова / E.V. Artamonova: <http://orcid.org/0000-0001-7728-9533>

Е.И. Коваленко / E.I. Kovalenko: <http://orcid.org/0000-0003-4763-7992>

М.В. Хорошилов / M.V. Khoroshilov: <https://orcid.org/0000-0002-3770-5173>

З.Г. Кадагидзе / Z.G. Kadagidze: <https://orcid.org/0000-0002-0058-0987>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках темы НИР № ААА-А-А19-119022090028-6.

Funding. The study was performed with the financial support of the Ministry of Health of Russian Federation in the framework of research No ААА-А-А19-119022090028-6.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All the patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 14.07.2021. Принята к публикации: 20.08.2021.

Article submitted: 14.07.2021. Accepted for publication: 20.08.2021.