

Цитирование: М.В. Хорошилов, Е.И. Коваленко, Е.В. Артамонова, Т.Н. Заботина, И.С. Стилиди, Я.А. Жуликов и соавт. Субпопуляционный состав опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов при раннем и местнораспространенном тройном негативном раке молочной железы и его влияние на эффективность неоадъювантной химиотерапии. Злокачественные опухоли 2023

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАННЕМ И МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННОМ ТРОЙНОМ НЕГАТИВНОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

М.В. Хорошилов, Е.И. Коваленко, Е.В. Артамонова, Т.Н. Заботина, И.С. Стилиди, Я.А. Жуликов, Е.В. Евдокимова, А.В. Петровский, Д.А. Денчик, И.К. Воротников, В.Н. Шолохов, С.Н. Бердников, Э.К. Шоуа, Э.Г. Кадагидзе

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Исследования последних лет показали, что тройной-негативный рак молочной железы (ТН РМЖ) характеризуется наибольшей мутационной нагрузкой и иммуногенностью по сравнению с другими молекулярно-генетическими подтипами, а также более высокой степенью инфильтрации опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (tumor-infiltrating lymphocytes — TILs), которые играют важнейшую роль в формировании противоопухолевого иммунитета и реализации ответа на лечение. Существенным недостатком стандартного иммуногистохимического метода определения TILs является невозможность полноценной оценки субпопуляционного состава иммунного инфильтрата, в том числе его минорных популяций.

Целью данного исследования было изучение субпопуляционного состава лимфоидного инфильтрата при ТН РМЖ у пациентов, получавших неоадъювантную химиотерапию (НАХТ), и его влияние на достижение полного патоморфологического ответа на лечение (pCR = RCB 0).

Материалы и методы: В исследование включено 90 пациенток с первично-операбельным (40%) и неоперабельным местнораспространенным (60%) ТН РМЖ, получавших НАХТ по схеме: АС 1 раз в 2 недели, далее 12 еженедельных введений паклитаксел 80 мг/м² + карбоплатин АUC2. Субпопуляционный состав TILs оценивался в образцах core-биопсии до начала НАХТ у всех больных. Анализ осуществлялся методом проточной цитофлуориметрии. Проведена клинико-иммунологическая оценка по следующим девяти субпопуляциям лимфоцитов: CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD4+CD25^{high}CD127^{-low}, CD3-CD19+, CD3-CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD4+CD25+, CD8+CD279+, CD4+CD279+.

Результаты: Частота pCR составила 51,1%. Общее содержание TILs в группах с полным и неполным патоморфозом (RCB 0 против RCB I–III) статистически не различалось (p = 0,271). При анализе субпопуляционного состава для популяций CD3+CD8+, CD3-CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD3+CD4+, CD3-CD19+, CD4+CD25+, CD4+CD25^{high}CD127^{-low} и CD4+CD279+ не было выявлено статистически значимых различий между медианными значениями в группах с полным и неполным патоморфозом. При исследовании популяции CD8+CD279+ выявлен более высокий уровень данных клеток у пациентов, достигших pCR/RCB 0 (медиана 18,6% против 12,3% при RCB I–III) (p = 0,033). При уровне CD8+CD279+ выше медианы (high) частота pCR составила 61,1% против 35% в подгруппе с содержанием CD8+CD279+ менее или равно медианы (low). Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в содержании CD3+CD16+CD56+ (NKT-клеток) в группах с полным и неполным патоморфозом (p = 0,091), были выявлены численные различия в медианах: 9,9% и 8,3% соответственно. При уровне CD3+CD16+CD56+(NKT) выше медианы (high) частота pCR составила 63% против 35,7% в подгруппе с содержанием CD3+CD16+CD56+ менее или равно медианы (low). При выделении узкой подгруппы (CD8+CD279+ high и CD3+CD16+CD56+ high) частота полных патоморфологических регрессий в ней составила 87,5% против 27,3% при низких обоих показателях.

Вывод: Таким образом, исходное высокое содержание CD8+CD279+ и CD3+CD16+CD56+ в опухоли явилось предиктором высокой чувствительности к НАХТ и ассоциировалось с большей частотой полных патоморфологических ответов.

Ключевые слова: рак молочной железы, неоадъювантная химиотерапия, системный иммунитет, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, CD8+PD-1+, NKT, RCB.

ВВЕДЕНИЕ

Тройной негативный рак молочной железы (ТН РМЖ) составляет 15–20% от всех случаев рака молочной железы (РМЖ) и определяется отсутствием экспрессии рецепторов эстрогенов (РЭ), прогестерона (РП) и HER2 (1,2). Данный подтип характеризуется ранним возрастом манифестации, агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом. Неoadъювантная химиотерапия (НАХТ) является стандартом лечения при размере первичной опухоли > 2 см (T2) и/или поражении регионарных лимфоузлов (3). Достижение полного патоморфологического ответа (pCR) ассоциируется с увеличением как бессобытийной, так и общей выживаемости при раннем и местнораспространенном ТН РМЖ (4).

По сравнению с другими подтипами ТН РМЖ характеризуется наибольшей мутационной нагрузкой и иммуногенностью, а также степенью инфильтрации опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (tumor-infiltrating lymphocytes — TILs), играющими важнейшую роль в прогнозе и реализации ответа на противоопухолевое лечение (5,6). В ретроспективном анализе, включившем 13100 пациентов, продемонстрирована положительная корреляция высокого уровня TILs с отсутствием экспрессии РЭ и РП ($p = 0,001$) и высокой степенью злокачественности ($p < 0,001$) (7). Высокий уровень TILs является важным прогностическим фактором, начиная с ранних стадий ТН РМЖ. В крупном ретроспективном исследовании, опубликованном Kos и соавторами, было показано, что уровень TILs $\geq 75\%$ ассоциирован с впечатляющими отдаленными результатами после радикального лечения даже при отсутствии системной терапии: 15-летняя общая выживаемость составила 98% против 59% в подгруппе с TILs < 30% в популяции пациенток с первично-операбельным ТН РМЖ, подавляющая часть которых (98%) имела размер опухоли менее 5 см и N0 (8). Кроме того, высокий уровень TILs является предиктором достижения pCR при ТН РМЖ. Крупный мета-анализ, включивший данные 6 проспективных клинических исследований с 3771 больной РМЖ, получивших НАХТ, продемонстрировал, что высокий уровень TILs $\geq 60\%$ был ассоциирован с достоверным увеличением частоты pCR: 50% против 31% в группе с низким уровнем TILs, что транслировалось в улучшение как безрецидивной, так и общей выживаемости в этой подгруппе пациентов (9). По результатам однофакторного регрессионного анализа, увеличение TILs на каждые 10% достоверно снижает риск рецидива инвазивного рака на 13% и смерти — на 17% (10). Известно, что различные субпопуляции TILs оказывают противоположное влияние на прогноз и частоту pCR после проведения НАХТ. Так, высокое соотношение цитотоксических Т-лимфоцитов CD8+ к регуляторным Т-лимфоцитам (T-reg) при ТН РМЖ ассоциировано с 90% частотой pCR (11). Таким образом, важное предиктивное значение имеет не только общее содержание TILs, но и их субпопуляционный состав.

Определение уровня TILs стандартизировано международной рабочей группой и является обязательной частью гистологического заключения, однако существенным недостатком применяемого иммуногистохимического метода является невозможность полноценной оценки субпопуляционного состава TILs, в том числе минорных популяций.

Целью данного исследования было изучение субпопуляционного состава лимфоидного инфильтрата при ТН РМЖ у пациентов, получавших НАХТ, и его влияние на достижение pCR.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данное поисковое исследование с проспективным набором было включено 90 пациенток с ранним и местнораспространенным ТН РМЖ, получавших НАХТ по схеме 4 курса AC в дозоуплотненном режиме (доксорубин 60 мг/м² в 1-й день, циклофосфамид 600 мг/м² в 1-й день с поддержкой Г-КСФ, цикл 14 дней), затем — 12 еженедельных введений паклитаксела 80 мг/м² и карбоплатина AUC2 еженедельно в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Проспективный набор проходил с октября 2018 по сентябрь 2022 г.

У всех пациенток был гистологически и иммуногистохимически подтвержденный с помощью core-биопсии первичной опухоли или регионарных лимфоузлов диагноз ТН РМЖ. Перед началом лечения проводили комплексное обследование с целью стадирования и исключения наличия отдаленных метастазов, а также полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для определения наиболее часто встречаемых мутаций в генах BRCA1/2 в европейской популяции; при наличии семейного анамнеза и отрицательном результате ПЦР выполняли секвенирование нового поколения (NGS) генов BRCA1/2.

Всем пациенткам перед началом лечения выполнялась дополнительная core-биопсия опухоли молочной железы с целью оценки состава TILs. Перед процедурой пациентки подписывали информированное согласие на дополнительную биопсию. Образцы ткани помещали в 2,0 мл охлажденного 0,9% раствора натрия хлорида, фрагментацию и анализ проводили в тот же день или хранили образец опухоли при +4°C не более 12 часов. Лимфоциты выделяли из опухолевой ткани клеточной суспензии по параметрам светорассеяния и экспрессии CD45. Анализ субпопуляционного состава TILs осуществлялся методом проточной цитофлуориметрии на 5-параметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur производства компании Becton Dickinson (США). Достоинством данного метода является его доступность и относительная простота с методологической точки зрения, а также возможность определения не только общего содержания TILs в клеточной взвеси, но и субпопуляций, в том числе и минорных, определение которых затруднено при применении традиционных методик (микроскопия, иммуногистохимия). Определяли

процентное содержание в клеточной взвеси следующих популяций лимфоцитов: CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3–CD8+, CD8+, CD3–CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD3–CD19+, CD3+ HLA-Dr+, CD4+CD25+, CD25+, CD8+CD16+, CD16+ Perforin+, active CD16, CD8+ Perforin+, active CD8, CD4+CD25^{high}CD127^{-low}, CD8+11b+CD28–, CD8+CD11b+CD28+, CD8+CD11b–CD28–, CD8+CD11b–CD28+, CD8+CD279+, CD4+CD279+.

В нашем исследовании мы проводили клинко-иммунологическую оценку по следующим девяти субпопуляциям: CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD4+CD25^{high}CD127^{-low}, CD3–CD19+, CD3–CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD4+CD25+, CD8+CD279+, CD4+CD279+.

Эффективность проведенной НАХТ оценивали по результатам гистологического исследования послеоперационного материала по системе RCB и достижению pCR (RCB 0).

Статистический анализ

Статистическая обработка материала и расчеты проведены с использованием статистического пакета программ IBM SPSS Statistics v. 26. Достоверность различий между количественными показателями вычисляли с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Вилкоксона, Краскела–Уоллеса. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Взаимосвязь признаков оценивали с помощью логистической регрессии. Для определения предиктивных маркеров достижения pCR проведен подгрупповой анализ с 95% доверительным интервалом (ДИ).

Результаты

Всего в исследование включено 90 пациенток. Характеристика пациенток представлена в табл. 1. Медиана возраста составила 49 лет (29–71). У 54 (60%) пациенток был местнораспространенный рак (Т3–4 или N2/N3), у 36 (40%) — первично операбельный. Частота герминальных мутаций в генах BRCA1/2 составила 16,7% ($n = 15$).

Эффективность лечения

Хирургическое лечение было выполнено у всех 90 пациенток, в том числе в 1 случае радикальная операция проведена на фоне прогрессирования (табл. 2). Органо-сохраняющее вмешательство выполнено 32 пациенткам (35,5%), мастэктомия — 58 (64,5%).

Полный патоморфологический ответ (RCB 0) достигнут в 46 случаях (51,1%), RCB I в 13 (14,4%) (табл. 3).

Субпопуляционный состав TILs перед началом лечения

Субпопуляционный состав TILs до лечения был доступен для анализа в следующих популяциях, однако с разной частотой: CD3+CD8+, CD3–CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+ были оценены в 55 образцах, CD3+CD4+ — в 51 образце,

Таблица 1. Характеристика пациентов.

Характеристика	N = 90	%
Возраст		
Средний 49,2 (29–71)		
≤ 50	52	57,8
> 50	38	42,2
Распространенность		
Операбельный	36	40
Местно-распространенный	54	60
cT		
T1–2	44	48,9
T3–4	46	51,1
cN		
0	31	34
1	23	26
2	18	20
3	18	20
Гистологический подтип		
Инвазивный протоковый	89	98,9
Метапластический	1	1,1
Степень злокачественности (G)		
1–2	46	51,1
3	44	48,9
BRCA1/2-статус		
BRCA1/2 дикий тип	75	83,3
BRCA1/2 мутация	15	16,7

Таблица 2. Патоморфологический ответ после завершения химиотерапии.

Ответ на лечение	N	%
RCB 0	46	51,1
RCB 1	13	14,4
RCB 2	20	22,2
RCB 3	10	11,1
Прогрессирование*	1	1,1

* У 1 пациентки с операбельным раком выполнено хирургическое лечение на фоне местного прогрессирования

CD3–CD19+ — в 51 образце, CD4+CD25+ — в 37 образцах, CD4+CD25^{high}CD127^{-low} — в 33 образцах, CD4+CD279+ и CD8+CD279+ — в 39 образцах. С учетом разного характера распределения переменных в сравниваемых группах, все данные представлены в виде медианы (Me), и 25-го и 75-го перцентилей (квартилей).

Общее процентное содержание TILs в опухоли оценено у 70 (77,7%) пациенток и составило 3% (мин — 0, max — 27,6%, медиана — 0,8%). Общее содержание TILs в груп-

Таблица 3. Особенности субпопуляционного состава TILs в первичной опухоли при различной степени выраженности лекарственного патоморфоза.

Популяция лимфоцитов	Общий уровень во всей популяции, Ме (квартили), %	RCB 0, Ме (квартили), %	RCB 1–3, Ме (квартили), %	P (U)
CD3+CD4+(Т-хелперы)	46,7 (37,8–51,6)	45,6 (34,6–50,9)	47,7 (41,6–52,7)	0,169
CD3+CD8+(Т-цитотоксические)	40,5 (32,7–50,3)	42,4 (32,4–52,3)	40,5 (33,1–48,3)	0,485
CD4+CD25 ^{high} CD127 ^{-low} (Т-регуляторные)	13,2 (5,8–19,0)	12,7 (32,4–52,3)	14,4 (5,9–17,0)	0,901
CD3–CD19+(В-лимфоциты)	2,1 (0,8–4,6)	1,6 (0,8–4,5)	2,4 (0,6–7,2)	0,634
CD3–CD16+CD56+(NK-клетки)	4,5 (2,1–9,8)	4,7 (2,8–9,8)	3,8 (1,8–9,2)	0,341
CD3+CD16+CD56+(NKT-клетки)	9,3 (5,7–12,7)	9,9 (7,1–16,9)	8,3 (4,6–11,9)	0,091
CD4+CD25+(активированные CD4 лимфоциты)	9,9 (7,9–13,3)	10,9 (7,6–13,4)	9,7 (8,3–11,6)	0,730
CD4+CD279+(CD4+PD1+)	12,9 (10,3–22,7)	13,7 (10,6–27,1)	11,8 (10,1–17,1)	0,167
CD8+CD279+(CD8+PD1+)	14,2 (7,9–20,8)	18,6 (10,5–29,1)	12,3 (6,2–14,6)	0,033

NK — естественные киллеры

NKT — естественные киллеры (субпопуляция лимфоцитов, экспрессирующих как маркеры NK-клеток, так и Т-клеточные дифференцировочные антигены).

Ме — медиана

пах с полным и неполным патоморфозом статистически не различались ($p = 0,271$).

С учетом возможного различного содержания TILs в опухоли при операбельном и местнораспространенном РМЖ, был проведен анализ TILs в зависимости от распространенности опухоли. Достоверных различий ни в общем процентном содержании TILs, ни среди изучаемых субпопуляций при операбельном и местнораспространенном неоперабельном РМЖ не выявлено (табл. 4).

При анализе субпопуляционного состава для популяций CD3+CD8+, CD3–CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD3+CD4+, CD3–CD19+, CD4+CD25+, CD4+CD25^{high}CD127^{-low} и CD4+CD279+ также не было выявлено статистически значимых различий в группах с полным и неполным патоморфозом.

Однако для субпопуляции CD8+CD279+ было выявлено достоверное различие в группах RCB 0 vs RCB I–III ($p = 0,033$, критерий Манна–Уитни): так, при полном патоморфологическом ответе медиана CD8+CD279+ составила 18,6% против 12,3% при неполном ($p = 0,033$). При уровне CD8+CD279+ выше медианы (high) частота pCR составила 61,1% против 35% в подгруппе с содержанием CD8+CD279+ менее или равно медиане (low) (табл. 5).

Несмотря на отсутствие статистически достоверных различий в содержании CD3+CD16+CD56+(NKT-клеток) в группах с полным и неполным патоморфозом ($p = 0,091$), наше внимание привлекли численные различия в медианах: 9,9% и 8,3%, что является значимым для данной минорной популяции. При дальнейшем анализе установлено, что при уровне CD3+CD16+CD56+ выше медианы (high)

Таблица 4. Особенности субпопуляционного состава TILs в первичной опухоли при различной степени распространенности опухолевого процесса.

Популяция лимфоцитов	Первично-операбельный, Ме (квартили), %	Местно-распространенный, Ме (квартили), %	P (U)
Общее содержание TILs	0,8 (0,1–5,2)	0,9 (0,4–2,9)	0,650
CD3+CD4+(Т-хелперы)	46,9 (43,4–56,0)	46,5 (36,0–51,1)	0,281
CD3+CD8+(Т-цитотоксические)	38,5 (28,0–50,7)	41,9 (34,2–50,0)	0,344
CD4+CD25 ^{high} CD127 ^{-low} (Т-регуляторные)	13,2 (5,8–19,4)	12,9 (5,8–19,1)	0,845
CD3–CD19+(В-лимфоциты)	1,8 (0,5–5,0)	2,2 (0,9–5,8)	0,430
CD3–CD16+CD56+(NK-клетки)	4,0 (1,8–10,0)	4,7 (2,5–8,8)	0,665
CD3+CD16+CD56+(NKT-клетки)	9,2 (6,1–12,3)	9,4 (5,3–13,9)	0,905
CD4+CD25+(активированные CD4 лимфоциты)	10,3 (8,2–14,9)	9,3 (7,7–12,8)	0,298
CD4+CD279+(CD4+PD1+)	13,3 (10,5–21,3)	12,5 (9,6–23,2)	0,878
CD8+CD279+(CD8+PD1+)	13,3 (7,9–21,0)	14,5 (7,7–21,6)	0,945

NK — естественные киллеры

NKT — естественные киллеры (субпопуляция лимфоцитов, экспрессирующих как маркеры NK-клеток, так и Т-клеточные дифференцировочные антигены).

Ме — медиана

Таблица 5. Частота pCR в зависимости от уровня CD8+CD279+.

≤ Me		> Me	
pCR, n (%)	Non pCR, n (%)	pCR, n (%)	Non pCR, n (%)
7 (35%)	13 (65%)	11 (61,1%)	7 (38,9%)

Me — медиана

Таблица 6. Частота pCR в зависимости от уровня CD3+CD16+CD56+(NKT-клетки)

≤ Me		> Me	
pCR, n (%)	Non pCR, n (%)	pCR, n (%)	Non pCR, n (%)
10 (35,7%)	18 (64,3%)	17 (63%)	10 (37%)

Me — медиана

частота pCR составила 63% против 35,7% в подгруппе с содержанием CD3+CD16+CD56+ менее или равно медианы (low) (табл. 6).

При выделении узкой и очень небольшой подгруппы CD8+CD279+ high и CD3+CD16+CD56+ high (n=8) оказалось, что частота полных патоморфологических регрессий в ней составила 87,5% против 27,3% при низких (low) обоих показателях (табл. 7)

Учитывая взаимодействия между NK и NKT-клетками, был проведен анализ частоты морфологических регрессий в зависимости от их уровня (табл. 8). Выявлено, что высокий уровень NKT-клеток ассоциировался с частотой полных морфологических регрессий более 60% независимо от уровня NK, однако различия не достигли статистической значимости (возможно, в связи с небольшим числом наблюдений в сравниваемых подгруппах).

Таким образом, высокий уровень CD8+CD279+PD1+ лимфоцитов (выше медианы) ассоциировался с большей частотой полных патоморфологических регрессий,

Таблица 9. Предикторы полного ответа на НАХТ.

Однофакторный анализ				
Фактор	OP	95% ДИ		p
T1-2	2,904	1,226	6,879	0,015
T3-4				
N0	2,538	1,015	6,349	0,046
N+				
G1-2	0,955	0,416	2,193	0,913
G3				
≤ 50 лет	1,628	0,699	3,795	0,259
> 50 лет				
Ki67 ≤ 40	0,199	0,040	0,997	0,050
Ki67 > 40				
CD3+CD16+CD56+ > Me CD8+CD279+ > Me	0,071	0,006	0,881	0,039
CD3+CD16+CD56+ < Me CD8+CD279+ < Me				

Таблица 7. Частота pCR в зависимости от уровня CD3+CD16+CD56+/CD8+CD279+(CD8+ PD1+).

Популяции	Уровень CD8+CD279+(CD8+PD1+)		
		> Me	≤ Me
	Уровень CD3+CD16+CD56+(NKT)		
	> Me	7/8 (87,5%)	4/9 (44,4%)
	≤ Me	3/9 (33,3%)	3/11 (27,3%)

Me — медиана

Таблица 8. Частота pCR в зависимости от уровня CD3+CD16+CD56+(NK)/CD3+CD16+CD56+(NKT)

Популяции	Уровень CD3-CD16+CD56+(NK)		
		> Me	≤ Me
	Уровень CD3+CD16+CD56+(NKT)		
	> Me	10/16 (62,5%)	7/11 (63,6%)
	≤ Me	4/11 (36,4%)	6/17 (35,3%)

Me — медиана

а в сравнительно небольшой подгруппе с высоким содержанием CD8+CD279+(high) и CD3+CD16+CD56+(high) полный ответ отмечен в 87,5% случаев.

В однофакторном анализе такие критерии, как стадия T1-2, N0 и CD8+CD279+(high) в комбинации с CD3+CD16+CD56+(high) явились предикторами полного патоморфоза (табл. 9). Многофакторный анализ из-за небольшого числа таких наблюдений провести не удалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было изучено влияние различных субпопуляций TILs на достижение полного патоморфологического ответа на НАХТ по поводу ТН РМЖ. Согласно литературным данным, высокий уровень TILs является одним из важнейших предикторов эффективности системной терапии ТН РМЖ (7). В нашем исследовании общее процентное содержание TILs в клеточной взвеси, полученной при биопсии опухоли, не влияло на частоту полных патоморфологических регрессий. По всей видимости, это связано с особенностями используемого нами метода оценки, принципиально отличающегося от стандартной методики. Применение цитофлуориметрии позволило оценить минорные популяции и их влияние на результаты НАХТ. Высокая гетерогенность клеток иммунного микроокружения опухоли, межклеточные взаимодействия, в том числе на уровне минорных популяций, обуславливает большое число работ с противоположными результатами при изучении влияния той или иной субпопуляции на прогноз и эффективность лечения. Так, четко не определена прогностическая роль CD8+CD279+PD1+ — лимфоцитов при различных солидных опухолях ввиду крайне небольшого числа научных работ. Было показано, что CD279 PD1+ — протеин, экспрессируемый на Т-лимфоцитах, является одним из ключевых регуляторов, ингибирующих активацию CD8+ Т-клеток, а антитела против CD279 усиливают

опосредованную Т-клетками цитотоксическую функцию (12). Однако остается неясным, выполняет ли CD279 другие функции в гомеостазе Т-клеток или в опосредовании взаимодействий Т-клеток с антигенпрезентирующими клетками. В работе Ну У. с соавторами было показано, что CD8+CD279+ клетки положительно ассоциируются с безрецидивной выживаемостью у пациентов с ранним колоректальным раком и являются независимым прогностическим фактором (13). В другой ранее опубликованной работе по изучению взаимосвязи субпопуляций TILs и результатов лечения раннего РМЖ различий в уровне CD8+CD279+ в опухоли у пациентов с различной степенью лечебного патоморфоза не выявлено, в том числе при разных подтипах РМЖ (14). В нашем исследовании высокое содержание CD8+CD279+(high) ассоциировалось с увеличением частоты pCR до 61,1% по сравнению с 35% при их низком содержании. Возможно, проведение дозо-интенсивной НАХТ при ТН РМЖ оказывает не только прямое цитотоксическое действие, но и способствует изменению иммунного регулирования за счет «обнажения» опухолеассоциированных антигенов.

НКТ-клетки являются редкой малоизученной субпопуляцией лимфоидного инфильтрата опухоли и участвуют в сложном механизме межклеточных взаимодействий. НКТ-клетки обеспечивают взаимодействие между врожденной и адаптивной иммунной системой, активируют антигенпрезентирующие клетки, вызывают продукцию интерлейкина-12 зрелыми дендритными клетками, способствуя, таким образом, активации Т-лимфоцитов и реализации клеточного иммунного ответа (15). Роль этой субпопуляции в реализа-

ции ответа на лечение четко не определена. В нашем исследовании показано, что высокий уровень CD3+CD16+CD56+ ассоциировался с высокой частотой pCR (63%) против 35,7% в подгруппе с низким содержанием CD3+CD16+CD56+. На частоту полных регрессий при CD3+CD16+CD56+(high) не влияло содержание NK-клеток.

Для популяций CD3+CD8+, CD3-CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD3+CD4+, CD3-CD19+, CD4+CD25+, CD4+CD25^{high}CD127^{-/low} и CD4+CD279+ в нашей работе не было выявлено значимых различий в группах с полным и неполным патоморфозом.

При выделении небольшой подгруппы с высоким содержанием CD8+CD279+(high), и CD3+CD16+CD56+(high) pCR отмечен в 87,5% случаев. В доступной литературе нами не найдено данных о клинической значимости взаимодействия данных минорных популяций, что требует дальнейшего изучения, в том числе и при других подтипах РМЖ.

В нашей работе впервые продемонстрирована роль минорных и малоизученных субпопуляций иммунного инфильтрата опухоли ТН РМЖ у пациентов, получивших дозо-интенсивную НАХТ. Представленные данные свидетельствуют о необходимости анализа профиля местных иммунных реакций и субпопуляционного состава TILs в зависимости от молекулярно-генетического подтипа раннего и местно-распространенного РМЖ, так как, по-видимому, именно подтип является определяющим в контексте анализа взаимодействий опухоли и иммунной системы. Для оценки воспроизводимости полученных результатов необходимо дальнейшее изучение и накопление клинического материала.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Максим В. Хорошилов, врач-онколог отделения химиотерапии №1, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия, e-mail: maximkhoroshilov@gmail.com

Елена И. Коваленко, к. м. н., старший научный сотрудник отделения химиотерапии №1, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Елена В. Артамонова, д. м. н., профессор, заведующая отделением химиотерапии №1, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, кафедра онкологии ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

Татьяна Н. Заботина, д. б. н., заведующая отделом клинико-лабораторной диагностики, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Иван С. Стилиди, д. м. н. профессор, академик РАН, директор ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Ярослав А. Жуликов, врач-онколог отделения химиотерапии №1, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Екатерина В. Евдокимова, врач-онколог отделения химиотерапии №1, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Александр В. Петровский, к. м. н., заместитель директора по образовательной деятельности, заведующий онкологическим отделением хирургических методов лечения №15, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, доцент кафедры онкологии Института клинической медицины ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Данила А. Денчик, к. м. н., научный сотрудник онкологического отделения хирургических методов лечения №15 (комбинированного лечения опухолей молочной железы), ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Игорь К. Воротников, д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник хирургического отделения №15 (комбинированного лечения опухолей молочной железы), ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Владимир Н. Шолохов, д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник отделения ультразвуковой диагностики, ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Сергей Н. Бердников, к. м. н., заведующий отделением ультразвуковой диагностики, ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Эсма К. Шоуа, врач-онколог лаборатории клинической иммунологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Заира Г. Кадагидзе, д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

For citation: Khoroshilov M. V., Kovalenko E. I., Artamonova E. V., Zabolina T. N., Stilidi I. S., Zhulikov Ya. A. et al. Subpopulation structure of tumor-infiltrating lymphocytes in early and locally advanced triple negative breast cancer and its effect on the efficiency of neoadjuvant chemotherapy. *Malignant Tumors*. 2023

SUBPOPULATION STRUCTURE OF TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES IN EARLY AND LOCALLY ADVANCED TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER AND ITS EFFECT ON THE EFFICIENCY OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

M. V. Khoroshilov, E. I. Kovalenko, E. V. Artamonova, T. N. Zabolina, I. S. Stilidi, Ya. A. Zhulikov, E. V. Evdokimova, A. V. Petrovsky, D. A. Denchik, I. K. Vorotnikov, V. N. Sholokhov, S. N. Berdnikov, E. K. Showa, Z. G. Kadagidze

N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Recent studies have shown that triple-negative breast cancer (TN BC) is characterized by the highest mutational load and immunogenicity compared to other subtypes, as well as the degree of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) infiltration, which play an important role in the development of antitumor immunity and treatment response. A significant disadvantage of the standard immunohistochemical method for determining TILs is the inability to fully assess the subpopulation structure of the immune infiltration, including minor populations.

Aim: The evaluation of the subpopulations of breast cancer lymphoid infiltration in patients receiving neoadjuvant chemotherapy (NACT) and its influence on achieving a complete pathomorphological response (pCR = RCB 0).

Materials and methods: The study included 90 patients who received NACT in following regimen: AC (doxorubicin 60 mg/m² + cyclophosphamide 600 mg/m²) every 2 weeks, followed by 12 weekly infusions of paclitaxel 80 mg/m² + carboplatin AUC2. The TILs subpopulations were evaluated in core-biopsy samples prior to the NACT in all patients. The analysis performed by flow cytometry. Clinical and immunological analysis was performed for the following 9 lymphocyte subpopulations: CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD4+CD25^{high}CD127^{-/low}, CD3-CD19+, CD3-CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD4+CD25+, CD8+CD279+, CD4+CD279+.

Results: The frequency of pCR was 51,1%. The total TILs content in groups with pCR and non-pCR (RCB 0 vs RCB I-III) did not differ statistically (p = 0.271). The subpopulations analysis for CD3+CD8+, CD3-CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD3+CD4+, CD3-CD19+, CD4+CD25+, CD4+CD25^{high}CD127^{-/low} and CD4+CD279+ revealed no statistically significant differences between the median values in the groups with pCR and non-pCR. A study of the CD8+CD279+ population showed a higher level of these cells in patients achieved pCR/RCB 0 (median 18,6% vs 12,3% with RCB I-III) (p = 0.033).

With CD8+CD279+ above the median (high, > Me), the pCR frequency was 61% vs 35% in the subgroup with CD8+CD279+ less than or equal to the median (low, ≤Me). Despite the absence of statistically significant differences in the content of CD3+CD16+CD56+(NKT-cells) in groups with pCR and non-pCR ($p = 0.091$), numerical differences in medians were revealed: 9,9% and 8,3%, respectively. At the same time, with CD3+CD16+CD56+(NKT) > Me (high), the pCR frequency was 63% vs 36% in the subgroup with CD3+CD16+CD56+ ≤Me (low). When selecting a narrow subgroup (CD8+CD279+ high and CD3+CD16+CD56+ high), the frequency of pCR was 87,5% vs 27,3% in the group with both low indicators.

Conclusion: The high content of CD8+CD279+ and CD3+CD16+CD56+ in the tumor sample before the treatment start was a predictor of high sensitivity to NACT and is associated with a higher frequency of pCR.

Keywords: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, systemic immunity, tumor-infiltrating lymphocytes, CD8+ PD-1+, NKT, RCB.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Maksim V. Khoroshilov, Oncologist, Chemotherapy Department No. 1, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia, e-mail: maximkhoroshilov@gmail.com

Elena I. Kovalenko, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Chemotherapy No. 1, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Elena V. Artamonova, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Chemotherapy No. 1, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Department of Oncology, Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov, Moscow, Russia

Tatyana N. Zabolina, MD, PhD, DSc Biol, Head of the Department of Clinical and Laboratory Diagnostics, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Ivan S. Stilidi, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, Professor, Director, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Yaroslav A. Zhulikov, Oncologist, Chemotherapy Department No. 1, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Ekaterina V. Evdokimova, Oncologist, Chemotherapy Department No. 1, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Aleksandr V. Petrovsky, MD, PhD, Deputy Director, The Head of the Breast Cancer Surgical Department N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Associate professor in oncology I. M. Sechenov Moscow Medical State University, Moscow, Russia

Danila A. Denchik, MD, PhD, Researcher, Oncology Department of Surgical Treatment Methods №15, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Igor K. Vorotnikov, MD, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Oncology Department of Surgical Treatment Methods №15, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Vladimir N. Sholokhov, MD, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Department of Ultrasound Diagnostics, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Sergey N. Berdnikov, MD, PhD, Head of the Department of Ultrasound Diagnostics, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Esma K. Showa, Oncologist, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Zaira G. Kadagidze, MD, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 11;98 (19):10869-74.

2. Castrellon AB, Pidhorecky I, Valero V et al. The Role of Carboplatin in the Neoadjuvant Chemotherapy Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Oncol Rev.* 2017 Mar 17;11 (1):324.
3. Sikov WM, Berry DA, Perou CM et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol.* 2015 Jan 1;33 (1):13-21.
4. Spring LM, Fell G, Arfe A et al. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2020 Jun 15;26 (12):2838-2848.
5. O'Meara T. A., Tolaney S. M. Tumor mutational burden as a predictor of immunotherapy response in breast cancer. *Oncotarget.* 2021; 12: 394-400.
6. Артамонова Е. В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы. Автореферат докт. дисс. – Москва. – 2003.
7. Wang, K. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: A meta-analysis / K. Wang, J. Xu, T. Zhang et al. // *Oncotarget.* –2016. – Vol. 7, N 28. – P. 44288-44298.
8. Park JH, et al. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes in patients with early-stage triple-negative breast cancers (TNBC) who did not receive adjuvant chemotherapy. *Ann. Oncol.* 2019; 30:1941–1949.
9. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018;19 (1):40-50.
10. Loi, S. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: A pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers / S. Loi, D. Drubay, S. Adams et al. // *J. Clin. Oncol.* 2019. – Vol. 37, N 7. – P. 559-569.
11. Goda N, Sasada S, Shigematsu H, Masumoto N, Arihiro K, Nishikawa H, Sakaguchi S, Okada M, Kadoya T. The ratio of CD8+ lymphocytes to tumor-infiltrating suppressive FOXP3 + effector regulatory T cells is associated with treatment response in invasive breast cancer. *Discov Oncol.* 2022 Apr 19;13 (1):27.
12. Liu Y, Gao Y, Hao H, Hou T. CD279 mediates the homeostasis and survival of regulatory T cells by enhancing T cell and macrophage interactions. *FEBS Open Bio.* 2020 Jun;10 (6):1162-1170.
13. Hu Y, Zhao J, Shen Y, Zhang C, Xia Q, Zhang G, Wang B, Wei B, Yu R, Ma J, Guo Y. Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes detected by flow cytometry in colorectal cancer. *Int Immunopharmacol.* 2022 Dec;113 (Pt A): 109286.
14. Заботина Т. Н., Черткова А. И., Борунова А. А., Захарова Е. Н., Шоа Э. К., Артамонова Е. В., Коваленко Е. И., Хорошилов М. В., Кадагидзе Э. Г. Взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов больных раком молочной железы с результатами лечения. *Российский биотерапевтический журнал.* 2021;20 (3):25-33.
15. Hermans IF, Silk JD, Gileadi U, Salio M, Mathew B, Ritter G, Schmidt R, Harris AL, Old L, Cerundolo V. NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *J Immunol.* 2003 Nov 15;171 (10):5140-7.