

Субпопуляционный состав опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов при люминальном раке молочной железы и его влияние на эффективность неoadъювантной химиотерапии

Е. И. Коваленко, к.м.н., с.н.с. отделения химиотерапии № 1¹
Е. В. Артамонова, д.м.н., проф., зав. отделением химиотерапии № 1¹, кафедра онкологии²
Т. Н. Заботина, д.б.н., зав. отделом клинко-лабораторной диагностики¹
З. Г. Кадагидзе, д.м.н., проф., в.н.с. лаборатории клинической иммунологии¹
С. Г. Багрова, к.м.н., н.с. отделения химиотерапии № 1¹
М. В. Киселевский, д.м.н., проф., зав. лабораторией клеточного иммунитета¹
И. К. Воротников, д.м.н., проф., в.н.с. хирургического отделения № 15¹
Д. А. Денчик, к.м.н., н.с. хирургического отделения № 15¹
В. И. Кузьмина, ст. лаборант кафедры онкологии²
Е. Н. Захарова, к.м.н., н.с.²
Э. К. Шоуа, врач-онколог лаборатории клинической иммунологии¹
Я. А. Жуликов, ординатор отделения химиотерапии № 1¹
М. В. Хорошилов, ординатор отделения химиотерапии № 1¹
А. В. Егорова, к.м.н., доцент кафедры онкологии и лучевой терапии²
В. А. Хайленко, д.м.н., проф., акад. РАЕН, заслуженный врач России, зав. кафедрой онкологии²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва

²ФДПО ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

Subpopulation composition of tumor-infiltrating lymphocytes in luminal breast cancer and its effect on effectiveness of neoadjuvant chemotherapy

E. I. Kovalenko, E. V. Artamonova, T. N. Zabolina, Z. G. Kadagidze, S. G. Bagrova, M. V. Kiselevsky, I. K. Vortnikov, D. A. Denchik, V. I. Kuzmina, E. N. Zakharova, E. K. Shoua, M. V. Khoroshilov, A. V. Egorova, V. A. Haylenko

National Medical Research Centre of Oncology n.a. N. N. Blokhin, Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov; Moscow, Russia

Резюме

Опухоль (тumor)-инфильтрирующие лимфоциты (ТИЛ) играют ключевую роль в формировании противоопухолевого иммунитета и, как показали исследования, могут являться одним из маркеров эффективности лечения и прогноза течения онкологического заболевания. Целью нашего исследования было изучение субпопуляционного состава лимфоидного инфильтрата при раннем люминальном раке молочной железы у пациентов, получавших неoadъювантную химиотерапию (НАХТ), и его влияние на достижение полного ответа на лечение. Материалы и методы. В исследование были включены 24 пациентки, получавшие антрациклин-таксансодержащую предоперационную химиотерапию. Субпопуляционный состав ТИЛ оценивался в образцах кор-биопсии до начала НАХТ у всех больных, после лечения оценка производилась на послеоперационном материале. Анализ осуществлялся методом проточной цитофлуориметрии. Проведена клинко-иммунологическая оценка по следующим семи субпопуляциям лимфоцитов: CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD127⁺CD25⁺, CD3⁺CD19⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺. Результаты. Частота полного патоморфоза составила 16,7%. Выявлено, что исходный уровень до лечения CD45⁺, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD8⁺, CD8⁺CD3⁺, CD19⁺, CD4⁺CD25⁺CD127⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ – лимфоцитов не различался в зависимости от стадии заболевания (II или III), подтипа опухоли (люминальный А/В) и уровня Ki-67 (до 20, 20–39, 40 и более). Корреляций между Ki-67 и содержанием ТИЛ также не обнаружено. При проведении регрессионного анализа выявлено, что только уровень CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ и CD19⁺ являлся значимым фактором достижения полной патоморфологической регрессии ($p = 0,005$). При выделении эмпирической узкой

Summary

Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) play a key role in the formation of anti-tumor immunity and, as studies have shown, can be one of the markers of treatment effectiveness and cancer prognosis. The aim was to study the subpopulation composition of the lymphoid infiltrate in early luminal breast cancer in patients receiving neoadjuvant chemotherapy (NACT) and its effect on achieving a pathological complete response (pCR). Materials and methods. We included 24 patients who received anthracycline-taxane-containing preoperative chemotherapy. The subpopulation composition of TIL was assessed in core-biopsy samples before starting NACT in all patients; after treatment, the assessment was made on postoperative material. The analysis was carried out by flow cytometry. Clinical and immunological assessment was carried out for the following seven subpopulations of lymphocytes: CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD127⁺CD25⁺, CD3⁺CD19⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺. Results. The incidence pCR was 16.7%. It was revealed that the initial level before treatment of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD127⁺CD25⁺, CD3⁺CD19⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ lymphocytes did not differ depending on the stage of the disease (II or III), tumor subtype (luminal A/B) and Ki-67 level (up to 20, 20–39, 40 and more). No correlations were found between Ki-67 and TIL content. When conducting regression analysis, it was revealed that only the level of CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ and CD19⁺ was a significant factor in achieving a pCR ($p = 0.005$). When an empirical subgroup was

подгруппы, которая характеризовалась высоким содержанием (выше или равно медиане) CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ и низким (ниже медианы) – CD19⁺ (четыре наблюдения) частота полного патоморфоза достигла 75%. Вывод. Таким образом, исходное содержание в опухоли Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD3⁺CD8⁺) и В-лимфоцитов (CD19⁺), не зависящее от стадии заболевания, подтипа опухоли, индекса пролиферативной активности, явилось предиктором высокой чувствительности к неoadъювантной химиотерапии и связанной с этим большей частотой полного патоморфоза.

Ключевые слова: рак молочной железы, неoadъювантная химиотерапия, опухоль (тumor)-инфильтрирующие лимфоциты, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, полный патоморфоз.

identified, which was characterized by a high content (above or equal to the median) of CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ and low (below the median) CD19⁺ (four observations), the frequency of pCR reached 75%. Conclusion. Thus, the initial level of T-lymphocytes (CD3⁺, CD3⁺CD8⁺) and B-lymphocytes (CD19⁺) in the tumor, regardless of the stage of the disease, tumor subtype, ki-67 index, was a predictor of high sensitivity to neoadjuvant chemotherapy of luminal breast cancer and was associated with higher frequency of pCR.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, tumor infiltrating lymphocytes, T-lymphocytes, B-lymphocytes, pathologic complete response.

Иммунная система играет центральную роль в надзоре и контроле за злокачественными новообразованиями. В последние годы взаимоотношения между опухолью и инфильтрирующими ее клетками иммунной системы являются предметом активного изучения. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (тumor-инфильтрирующие лимфоциты, ТИЛ) занимают ключевую позицию в концепции противоопухолевого иммунитета и могут являться одним из потенциальных биомаркеров прогноза течения онкологического заболевания и эффективности лечения. Субпопуляционный состав ТИЛ весьма разнообразен, что объясняет тот факт, что они могут не только подавлять рост опухоли, но и способствовать прогрессированию путем селекции иммунорезистентных клонов или посредством создания в микроокружении опухоли условий, способствующих ее росту [1]. Гетерогенная популяция ТИЛ включает в основном Т-лимфоциты и, в меньшей степени, В-лимфоциты и натуральные киллерные клетки (НК) [2]. С развитием иммуногистохимии исследуется все большее количество субпопуляций ТИЛ. Так, CD3 – биомаркер Т-лимфоцитов – экспрессируется почти на всех Т-лимфоцитах. В соответствии с поверхностными маркерами Т-лимфоциты в основном включают следующие подтипы: CD8⁺ – цитотоксические Т-лимфоциты, CD4⁺ – Т-хелперные лимфоциты, CD45RO⁺ – Т-клетки памяти, регуляторные клетки FOXP3⁺ и т.д. CD8⁺ – цитотоксические Т-лимфоциты особенно известны своей цитолитической активностью в отношении раковых клеток. Напротив, CD4⁺ – Т-хелперные клетки второго типа, включая FOXP3⁺ (регуляторные Т-лимфоциты), подавляют противоопухолевый иммунный ответ, нарушая представление антигена, активность и цитотоксичность других иммунных клеток, тем самым способствуя росту опухоли и развитию иммунной толерантности [3]. Точная роль В-лимфоцитов и НК-клеток до сих пор четко не определена и противоречива [4, 5]. Клинические исследования продемонстрировали значительную связь между наличием определенных субпопуляций иммунных клеток и ответом на лечение у пациентов с различными солидными опухолями [6]. При раннем раке молочной железы (РМЖ) при HER 2-положительном и тройном-негативном (ТН) подтипах иммунные инфильтраты обнаруживаются в 75 % опухолей, причем до 20 % опухолей имеют особенно плотный инфильтрат, меньшее количество ТИЛ определяется при люминальных подтипах [7]. В исследованиях было продемонстри-

ровано, что уровень ТИЛ является прогностическим для ответа на неoadъювантную химиотерапию (НАХТ) при ТН и HER 2-положительном раке молочной железы, но их роль при люминальном подтипе и влияние на прогноз менее ясны [8–12]. Так, по данным объединенного анализа, включившего данные 3771 пациента, повышение уровня ТИЛ ассоциируется с повышением уровня полных патоморфологических регрессий после проведенной НАХТ при всех подтипах РМЖ. При ТН и HER2-положительном РМЖ высокий уровень ТИЛ был связан с увеличением выживаемости; при люминальных опухолях, напротив, являлся фактором неблагоприятного прогноза, что, возможно, связано с разным субпопуляционным составом лимфоидного инфильтрата [9]. Следует отметить, что ни в одном исследовании прицельно не проводился анализ зависимости эффективности НАХТ от уровня и композиции ТИЛ исключительно при люминальном подтипе РМЖ.

Целью исследования было изучение субпопуляционного состава лимфоидного инфильтрата при люминальном раке молочной железы у пациентов, получавших неoadъювантную химиотерапию (НАХТ), и его влияние на достижение полного ответа на лечение. Оценка проведена на материале кор-биопсии опухоли и на послеоперационном материале после проведенного лечения. Оценено количество иммунных клеток и их процентное содержание в ассоциированных с опухолью иммунных инфильтратах.

Материалы и методы

В исследование были включены 24 пациентки с ранним и местнораспространенным люминальным РМЖ, получавшие предоперационную терапию. Средний возраст составил 42,2 ± 9,0 (минимум 25, максимум 61) года, на момент начала лечения только 4 (16,7 %) пациентки находились в менопаузе. По данным предоперационного обследования, II стадия выявлена у 5 (20,8 %) пациенток, III стадия – у 19 (79,2 %). Показания к предоперационной ХТ при II стадии чаще всего определялись невозможностью выполнения органосохранной операции. Большая часть включенных пациенток имели местнораспространенный процесс: в 50,0 % – ШВ стадию, еще в 20,8 % – ПС. По данным предоперационного гистологического исследования, протоковый рак (неспецифического типа) выявлен у 21 (87,5 %) пациентки, дольковый – у 1 (4,2 %), муцинозный – у 1 (4,2 %), тубулярный – в 1 (4,2 %) на-

Таблица 1
Характеристика пациенток

Характеристика	N	Процент
Стадия		
• IIА	2	8,3
• IIВ	3	12,5
• IIIА	2	8,3
• IIIВ	12	50,0
• IIIС	5	20,8
Гистологический подтип		
• протоковый	21	87,5
• дольковый	1	4,2
• муцинозный	1	4,2
• тубулярный	1	4,2
Степень злокачественности		
• G3	3	12,5
• G2	20	83,3
• G1	1	4,2
Подтип опухоли		
• люминальный А	5	20,8
• люминальный В	19	79,2

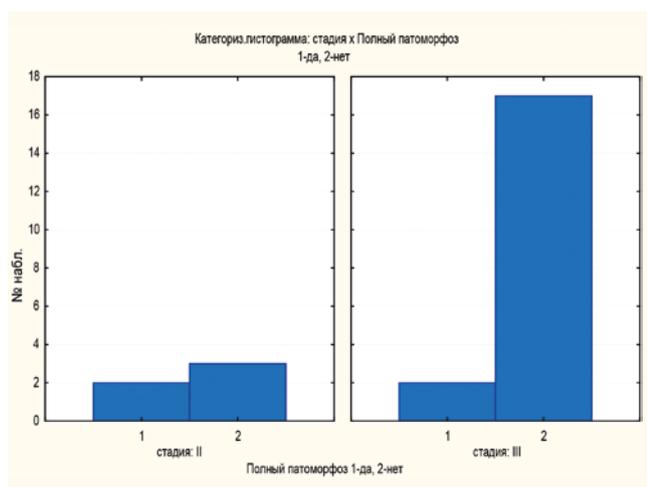


Рисунок 1. Частота патоморфоза в зависимости от стадии заболевания.

Таблица 2
Характеристика режимов ХТ

Режим НАХТ	N	Процент
4 АС раз в 3 недели – 4 доцетаксел 75 мг/м ² раз в 3 недели	8	33,3
4 АС раз в 3 недели – 12 паклитаксел 80 мг/м ² еженедельно	3	12,5
4 АС раз в 2 недели – 4 доцетаксел 75 мг/м ² раз в 3 недели	10	41,7
4 АС раз в 2 недели – 12 паклитаксел 80 мг/м ² еженедельно	2	8,3
4 АС раз в 2 недели – 12 паклитаксел 80 мг/м ² еженедельно + карбоплатин АUC2	1	4,2

блюдении. Большинство пациенток имели опухоли средней степени злокачественности (G2) – 20 (83,3%), низкодифференцированные опухоли (G3) отмечены у 3 (12,5%) пациенток, высокодифференцированные (низкой степени злокачественности, G1) – у 1 (4,2%). В 19 (79,2%) наблюдениях опухоль была представлена люминальным В-подтипом, в 5 (20,8%) – люминальным А-подтипом. Средний уровень пролиферативной

активности (индекс Ki-67) при люминальных опухолях составил $37,6 \pm 19,9\%$ (минимум 2, максимум 85, медиана 40); при люминальном В-подтипе – $43,9 \pm 21,8\%$ (минимум 20, максимум 85, медиана 30); при люминальном А – $13,4 \pm 6,8\%$ (минимум 2, максимум 18, медиана 17). Характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Все пациентки получали НАХТ с последовательным применением антрациклинов и таксанов. В 13 (54,2%) случаях антрациклиновый блок проведен в дозоуплотненном режиме (раз в 2 недели с поддержкой колониестимулирующими факторами), в 11 (45,8%) – в стандартном режиме раз в 3 недели. Таксановые режимы включали: 4 курса доцетаксела 75 мг/м² раз в 3 недели, 12 курсов паклитаксела 80 мг/м² еженедельно, а также 12 курсов паклитаксела 80 мг/м² + карбоплатин АUC2 еженедельно. Характеристика режимов ХТ представлена в табл. 2.

Субпопуляционный состав ТИЛ оценивался в образцах кор-биопсии до начала НАХТ у всех (24) больных, после лечения оценка производилась на послеоперационном материале. Анализ осуществлялся методом проточной цитофлуориметрии по связыванию с моноклональными антителами различной специфичности методом многопараметрового количественного анализа. Для каждого образца анализировали не менее 500–5000 клеток на CD45⁺-гейте. Гейтирование лимфоидных клеток в каждом образце осуществлялось по связыванию с моноклональными антителами антиCD45. Панель исследуемых маркеров на CD45⁺-лимфоцитах: 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/CD8, CD4⁺CD127⁺CD25⁺, CD8⁺11b⁺CD28⁺, CD8⁺CD11b⁺CD28⁺, CD8⁺CD11b⁺CD28⁺.

В нашем исследовании мы проводили клинко-иммунологическую оценку по следующим семи субпопуляциям: CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD127⁺CD25⁺, CD3⁺CD19⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺.

Статистический анализ

Статистическая обработка материала и расчеты проведены с использованием статистического пакета программ Statistica 10.0. 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.

Результаты исследования

В результате проведенной НАХТ все пациентки были оперированы: 20 (83,3%) больным выполнена радикальная мастэктомия, 4 (16,6%) – радикальная резекция молочной железы. По данным послеоперационного исследования, полный патоморфоз (урT0N0) достигнут у 4 пациенток – в 16,7% случаев, в 83,3% сохранялась

резидуальная опухоль. При анализе степени патоморфоза в зависимости от стадии отмечено, что при II стадии частота полного патоморфоза (pCR) составила 40,0% (2/5), при III стадии – 10,5% (2/19) (рис. 1). Частота выявления резидуальной опухоли при III стадии (89,5%) достоверно превосходила таковую при II стадии (60,0%), $p < 0,05$. Интенсивность первого блока НАХТ не влияла на частоту полного патоморфоза, его частота при дозоуплотненных режимах была даже меньше, чем при традиционных.

Для анализа состава ТИЛ после проведенной НАХТ и оперативного лечения было доступно 20 из 24 образцов опухоли. Субпопуляционный состав ИОЛ в опухоли до лечения был доступен для анализа с разной частотой: популяции CD3⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ оценены в 23 наблюдениях, CD19⁺ – в 21, CD4⁺CD127⁺CD25⁺ – в 22, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ – в 22.

Относительное содержание ТИЛ (CD45⁺) в опухоли до лечения составило $2,63 \pm 3,11\%$ (0,04–12,9%), после лечения – $0,60 \pm 0,31\%$ (0,1–1,1%), различия оказались недостоверны. Исходное содержание CD45⁺ в зависимости от подтипа опухоли также не различалось: при люминальном В-подтипе оно составило $2,95 \pm 3,43\%$ (0,3–12,9), при люминальном А – $1,44 \pm 1,06\%$ (0,04–2,90), различия недостоверны. Также было проанализировано исходное содержание CD45⁺ у больных с полным и неполным патоморфозом – достоверных различий не получено (критерий Манна–Уитни).

Содержание CD3⁺ (Т-лимфоцитов) до лечения составило $88,12 \pm 5,70\%$ (минимум 77,3, максимум 97,0, медиана 89,2), что было достоверно ниже, чем после лечения – $93,05 \pm 4,80\%$ (минимум 84, максимум 100), (критерий Вилкоксона $p = 0,012793$) (рис. 2).

Кроме того, было выявлено, что исходное содержание CD3⁺ в опухоли у больных с полным ($94,40 \pm 1,56\%$) и неполным ($92,80 \pm 5,31\%$) патоморфозом достоверно различалось (критерий Манна–Уитни, $p = 0,035$) (рис. 3).

Содержание CD8⁺-лимфоцитов составило $50,11 \pm 18,6\%$ (минимум 0,0, максимум 93,4), достоверных различий у больных с полным ($49,62 \pm 34,84\%$) и неполным ($50,20 \pm 15,13\%$) патоморфозом не получено (критерий Манна–Уитни $p = 0,627$).

Частота встречаемости CD8⁺CD3⁺ (цитотоксических лимфоцитов) до лечения составила $48,24 \pm 13,00\%$, (минимум 29,2, максимум 81,4, медиана 45,1), после – $59,40 \pm 10,70\%$ (минимум 38,9, максимум 70,0), различия недостоверны (критерий Вилкоксона, $p = 0,091$). При этом процентное содержание CD8⁺CD3⁺ в опухоли до лечения у больных с полным ($65,50 \pm 14,00\%$) и неполным ($45,65 \pm 10,99\%$) патоморфозом достоверно различалось (критерий Манна–Уитни, $p = 0,046$) (рис. 4). Таким образом, в опухолях, в ходе лечения достигших полной регрессии, исходно отмечался более высокий уровень CD3⁺ и CD8⁺CD3⁺ – лимфоцитов.

Различия в содержании CD3⁺CD4⁺ до лечения ($40,67 \pm 12,59\%$, минимум 14,3, максимум 66,7) и после лечения ($23,57 \pm 11,96\%$, минимум 0,0, максимум 43,2), были до-

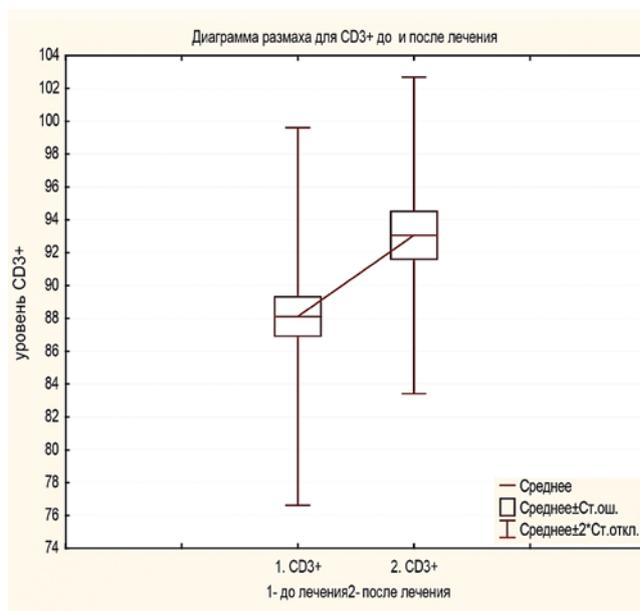


Рисунок 2. Диаграмма содержания (%) CD3⁺ в опухоли до и после лечения.

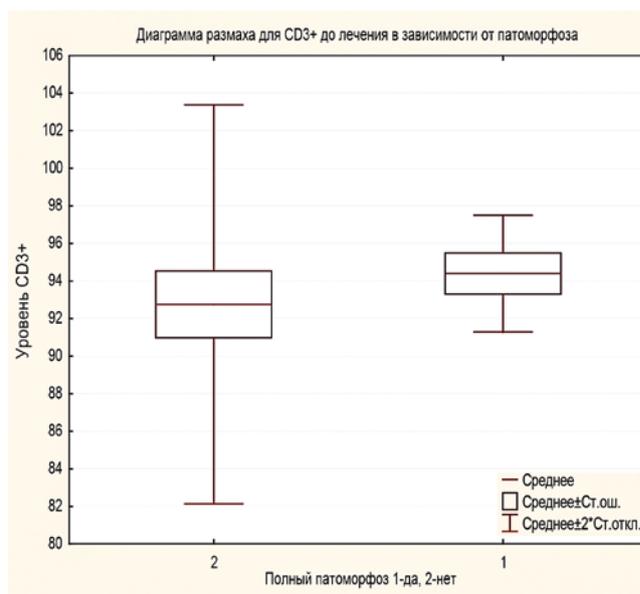


Рисунок 3. Исходное содержание (%) CD3⁺ при полном и неполном патоморфозе.

стостерны (критерий Вилкоксона $p = 0,02$) (рис. 5), а вот различия у пациентов с полным и неполным патоморфозом – нет ($p = 0,11$).

Различий в содержании CD4⁺CD25⁺CD127⁺ (Т-регуляторные, T-reg) до лечения ($9,70 \pm 5,20\%$, минимум 0,0, максимум 19,0), после лечения ($9,40 \pm 6,99\%$, минимум 0,0, максимум 20,0) получено не было, равно как и различий при полном ($12,49 \pm 7,99\%$) и неполном ($15,98 \pm 11,03\%$) патоморфозе (критерий Манна–Уитни, $p = 0,167$).

Что же касается популяции, которой мало уделяется внимания в исследованиях по раку молочной железы – CD19⁺ (В-лимфоциты), то их содержание в общем клеточном пуле до лечения было невелико и составило $4,39 \pm 5,00\%$ (0,00–18,5, медиана 2,8), однако были отмечены достоверные различия у больных с полным ($0,43 \pm 0,75\%$

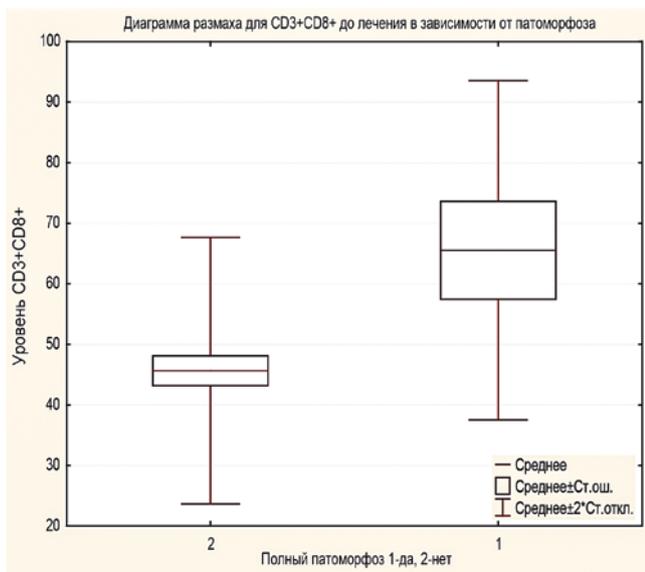


Рисунок 4. Исходное содержание (%) CD3⁺CD8⁺ у больных, достигших и не достигших полного патоморфоза.

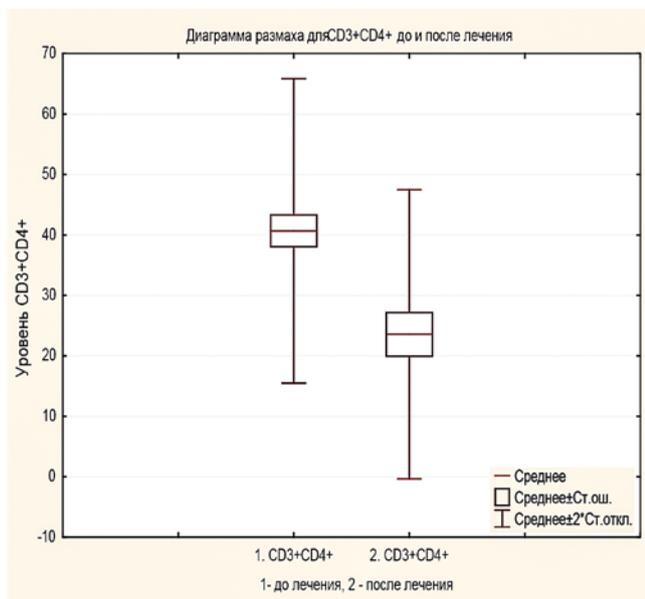


Рисунок 5. Диаграмма содержания (%) CD3⁺CD4⁺ в опухоли до и после лечения.

минимум 0,0, максимум 1,3) и неполным ($5,06 \pm 5,12\%$, минимум 0,2, максимум 18,5) патоморфозом (критерий Манна–Уитни, $p = 0,023$). У больных полным патоморфозом отмечался исходно более низкий удельный вес В-лимфоцитов в опухоли.

В инфильтратах была также оценена еще одна «миорная» популяция – NK (киллеров) – CD3⁺CD16⁺CD56⁺. До лечения их содержание в лимфоцитарном пуле составило $4,60 \pm 4,38\%$, (минимум 0,7, максимум 18,9, медиана 2,7), после лечения – $8,54 \pm 11,32\%$ (минимум 0,0, максимум 40,0), но различия недостоверны ($p = 0,280$). Содержание CD3⁺CD16⁺CD56⁺ у больных с полным и неполным патоморфозом не различалось (критерий Манна–Уитни, $p = 0,590$).

Отсутствие различий до и после лечения, а также, в зависимости от патоморфоза, отмечено и в популяции CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (NKT): до лечения их уровень составил

$11,88 \pm 11,60\%$ (минимум 0,7, максимум 50,9, медиана 8,1), после лечения – $6,51 \pm 4,80\%$ (минимум 0,0, максимум 14,0), различия недостоверны ($p = 0,370$).

При проведении дисперсионного анализа с применением критерия Краскела–Уоллиса исходный уровень CD45⁺, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD8⁺, CD8⁺CD3⁺, CD19⁺, CD4⁺CD25⁺CD127⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ не различался в зависимости от стадии заболевания (II или III), подтипа опухоли (ЛА/ЛВ) и уровня Ki-67 (до 20, 20–39, 40 и более). Корреляций между уровнем Ki-67 и содержанием ТИЛ выявлено не было.

Таким образом, в зависимости от наличия или отсутствия полного патоморфоза нами были отмечены достоверные различия в содержании в первичной опухоли CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ и CD19⁺ – лимфоцитов. Для проведения дальнейшего анализа с целью определения предикторов полного патоморфоза в каждой субпопуляции эмпирически были выделены две группы: high (более и равно медиане) и low (ниже медианы).

При высоком (high) содержании CD3⁺ частота полного патоморфоза достигла 27,3% (3/11), при низком уровне (low) – 0,0%, при CD3⁺CD8⁺ high – 25,0% (3/12). Для CD19⁺ наблюдалась иная зависимость: при низком уровне полный патоморфоз отмечался в 30% (3/10), при высоком – в 0% случаев. Таким образом, при выделении узкой подгруппы, которая характеризовалась высоким содержанием CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ и низким – CD19⁺ (четыре наблюдения) частота полного патоморфоза достигла 75%. При проведении регрессионного анализа выявлено, что исходный уровень CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ и CD19⁺ является значимым фактором достижения полной патоморфологической регрессии ($p = 0,005$).

Таким образом, исходное содержание в опухоли Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD3⁺CD8⁺) и В-лимфоцитов (CD19⁺), не зависящее от стадии заболевания, подтипа опухоли (люминальный А или В), индекса пролиферативной активности, явилось предиктором высокой чувствительности к неoadъювантной химиотерапии и связанной с этим большей частотой полного патоморфоза.

Обсуждение

Проведение НАХТ способствует переводу опухоли в операбельное состояние при исходной неоперабельности, в случае первично операбельного РМЖ позволяет выполнить органосохранную операцию или улучшить ее косметические результаты, оценить эффект лекарственной терапии и, при определенных подтипах, назначить дополнительное лечение при наличии резидуальной опухоли. Полный патоморфологический ответ на НАХТ был определен в качестве суррогатного маркера для прогнозирования отдаленных результатов лечения, так как при всех подтипах РМЖ он ассоциируется с увеличением бессобытийной и общей выживаемости [13]. Частота полного ответа на лечение при люминальных подтипах варьирует от 7,5% при опухолях низкой и средней степени злокачественности (G1-G2) до 16,2% при опухолях высокой степени злокачественности (G3), но достижение полной регрессии в меньшей степени ска-

зывается на прогнозе, чем при других подтипах [13]. В нашем исследовании полный патоморфоз (урT0N0) достигнут в 16,7% наблюдений, в 83,3% сохранялась резидуальная опухоль, при этом при II стадии частота полного патоморфоза составила 40,0%, при III стадии – 10,5%. Общее содержание ТИЛ у больных до и после лечения, а также у больных с полным и неполным патоморфозом не различалось. Кроме того, не было выявлено различий как в общем уровне ТИЛ, так и изученных популяций (Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-регуляторных лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-, НКТ-клеток) в зависимости от стадии заболевания (II или III), подтипа опухоли (ЛА/ЛВ) и уровня Ki-67 (до 20, 20–39, 40 и более). Корреляций между уровнем Ki-67 и содержанием ТИЛ также выявлено не было. Таким образом, иммунологический портрет опухоли, по всей видимости, – самостоятельное свойство, независящее от клинико-морфологических характеристик. Нами были получены достоверные различия в исходном содержании в опухоли Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов у пациентов с полным и неполным патоморфозом. При дальнейшем анализе было выявлено, что при высоком (high) содержании CD3⁺ частота полного патоморфоза была выше, чем в общей группе, и достигла 27,3%, при низком уровне – 0,0%. При CD3⁺CD8⁺ high полные регрессии достигнуты в 25,0% случаев. Для CD19⁺ наблюдалась иная зависимость: при низком уровне полный патоморфоз отмечался в 30,0%, при высоком – в 0,0% случаев. При выделении эмпирической группы, которая характеризовалась высоким содержанием Т-(CD3⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) и низким В-лимфоцитов (CD19⁺), таких наблюдений было всего 4 (16,7%) – частота полного патоморфоза достигла 75,0%. При проведении регрессионного анализа выявлено, что исходный уровень CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ и CD19⁺ является значимым фактором достижения полной патоморфологической регрессии. Таким образом, опухоли с указанной иммунологической характеристикой являются высокохимиочувствительными, а достижение полного патоморфоза может рассматриваться как фактор хорошего прогноза. Это некоторым образом совпадает с данными литературы о том, что инфильтрация опухоли CD3⁺- и CD8⁺-лимфоцитами является независимым признаком ответа на НАХТ и хорошего прогноза при РМЖ [14, 15, 16] Что же касается зависимости эффективности лечения от уровня В-лимфоцитов, то данные литературы скудны и противоречивы. В одном исследовании была продемонстрирована положительная ассоциация между уровнем В-лимфоцитов совместно с CD3⁺CD8⁺ и ответом на НАХТ, в том числе и при гормонозависимых опухолях [17], в другом – нет [12]. В нашем исследовании, включившем только люминальные опухоли, именно низкий уровень В-лимфоцитов ассоциировался

с ответом на лечение. Какой-либо связи между достижением полного патоморфоза и другими субпопуляциями (НК, НКТ, Т-регуляторными лимфоцитами, играющими ключевую роль в уклонении от иммунного надзора) в данном исследовании выявлено не было, возможно, это связано с малым числом наблюдений.

Выводы

Наше исследование является первым, посвященным оценке эффективности НАХТ исключительно при люминальном РМЖ в зависимости от субпопуляционного состава ТИЛ. Полученные данные о высокой чувствительности к НАХТ опухолей с определенным иммунологическим профилем могут привносить дополнительную информацию при принятии решения о назначении того или иного вида лекарственного лечения при гормонозависимом РМЖ. Исследование будет продолжено на большем материале.

Список литературы

- Schreiber R. D., Old L. J., Smyth M. J. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion // *Science* 201. Vol. 331. P. 1565–1570.
- Balch C. M., Riley L. B., Bae Y. J., Salmeron M. A., Platsoucas C. D., von Eschenbach A., Itoh K. Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch Surg.* 1990. Vol. 125. P. 200–205.
- Tan AH, Goh SY, Wong SC, Lam KP. T helper cell-specific regulation of inducible costimulator expression via distinct mechanisms mediated by T-bet and GATA-3. *J Biol Chem.* 2008; 283 (1): 128–36.
- Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC et al. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: 545–553.
- Ankita Singh Rathore, Madhu Mati Goel, Annu Makker, et al. Is the Tumor Infiltrating Natural Killer Cell (NK-TILs) Count in Infiltrating Ductal Carcinoma of Breast Prognostically Significant? *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15 (8): 3757–61.
- Galon J, Angell HK, Bedognetti D et al. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 2013; 39: 11–26.
- S.E. Stanton, S. Adams, M. L. Disis et al. Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. *JAMA Oncol.* 2 (10) (2016). 1354–1360.
- C. Denkert, S. Loibl, A. Noske et al., Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 28 (1) (2010) 105–113.
- Denkert C., von Minckwitz G., Darb-Esfahani S., Lederer B. 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. Vol. 19–P. 40–50.
- Lee HJ, Seo JY, Ahn JH, Ahn SH, Gong G. Tumor-associated lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *J Breast Cancer* 2013; 16: 32–9.
- Ono M, Tsuda H, Shimizu C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: 793–805.
- West NR, Milne K, Truong PT, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R126.
- Cortazar P, Zhang L, Untch M, Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet.* 2014 Jul 12; 384 (9938): 164–72, Spring L., et al. AASR Annual Meeting 2016, abstr.1439.
- Seo AN, Lee HJ, Kim EJ, et al. Tumor-infiltrating CD8⁺ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer* 2013; 109: 2705–13.
- AS Rathore, S Kumar, R Konwar, et al. Presence of CD3+ Tumor Infiltrating Lymphocytes Is Significantly Associated With Good Prognosis in Infiltrating Ductal Carcinoma of Breast. *Indian J Cancer.* Jul–Sep 2013; 50 (3): 239–44.
- Ankita Singh Rathore, Sandeep Kumar, Rituraj Konwar, et al. CD3+, CD4+ & CD8+ Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) Are Predictors of Favourable Survival Outcome in Infiltrating Ductal Carcinoma of Breast. *Indian J Med Res.* 2014 Sep; 140 (3): 361–9.
- Brown JR, Wimberly H, Lannin DR, Nixon C, Rimm DL, Bossuyt V. Multiplexed quantitative analysis of CD3, CD8, and CD20 predicts response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2014; 20 (23): 5995–6005.

Для цитирования: Коваленко Е.И., Артамонова Е.В., Зоботина Т.Н., Кадагидзе З.Г., Багрова С.Г., Киселевский М.В., Воронников И.К., Денчик Д.А., Кузьмина В.И., Захарова Е.Н., Шоуа Э.К., Жуликов Я.А., Хорoshiлов М.В., Егорова А.В., Хайленко В.А. Субпопуляционный состав опухоли-инфильтрирующих лимфоцитов при люминальном раке молочной железы и его влияние на эффективность неoadъювантной химиотерапии. *Медицинский алфавит.* 2020; (29): 32–37. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-29-32-37>.

For citation: Kovalenko E.I., Artamonova E.V., Zobotina T.N., Kadagidze Z.G., Bagrova S.G., Kiselevsky M.V., Voronnikov I.K., Denchik D.A., Kuzmina V.I., Zakharova E.N., Shoua E.K., Khoroshilov M.V., Egorova A.V., Haylenko V.A. Subpopulation composition of tumor-infiltrating lymphocytes in luminal breast cancer and its effect on effectiveness of neoadjuvant chemotherapy. *Medical alphabet.* 2020; (29): 32–37. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-29-32-37>.