

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

*На правах рукописи*



Калинчук Анна Юрьевна

**ХАРАКТЕРИСТИКА МАКРОФАГОВ В ОПУХОЛЕВОМ  
МИКРООКРУЖЕНИИ: СВЯЗЬ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ  
ПАРАМЕТРАМИ И PD-L1 СТАТУСОМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия  
3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:  
доктор медицинских наук Л.А. Таширева  
доктор медицинских наук, профессор С.В. Вторушин

Томск – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ.....                                                                                                                            | 6  |
| ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                                           | 19 |
| 1.1 Рак молочной железы: общая характеристика .....                                                                                      | 19 |
| 1.1.1 Эпидемиология .....                                                                                                                | 19 |
| 1.1.2 Молекулярно-биологический подтип как фактор, определяющий<br>течение и лечение рака молочной железы.....                           | 19 |
| 1.1.3 Опухолевое микроокружение как фактор, влияющий на течение и<br>лечение рака молочной железы .....                                  | 21 |
| 1.1.4 Иммуноterapia при раке молочной железы .....                                                                                       | 22 |
| 1.2 Состав опухолевого микроокружения у больных раком молочной<br>железы.....                                                            | 24 |
| 1.3 Классические популяции опухоль-ассоциированных макрофагов в<br>микроокружении у больных раком молочной железы.....                   | 28 |
| 1.4 Функциональные популяции опухоль-ассоциированных макрофагов в<br>микроокружении у больных раком молочной железы.....                 | 31 |
| 1.5 Функционирование иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 в опухоль-<br>ассоциированных макрофагах у больных раком молочной железы..... | 32 |
| 1.6 Роль макрофагов в эффективности иммунотерапии при раке молочной<br>железы .....                                                      | 34 |
| 1.7 Макрофагальные предикторы эффективности иммунотерапии при раке<br>молочной железы .....                                              | 36 |
| ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....                                                                                              | 40 |
| 2.1 Материал исследования.....                                                                                                           | 40 |
| 2.2 Методы исследования.....                                                                                                             | 46 |

|                                                                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.1 Иммуногистохимический анализ .....                                                                                                                                        | 46        |
| 2.2.2 TSA-модифицированная мультиплексная иммунофлуоресценция .....                                                                                                             | 49        |
| 2.2.3 Пространственный анализ транскриптома Visium 10x .....                                                                                                                    | 56        |
| 2.2.4 Биоинформатический анализ .....                                                                                                                                           | 61        |
| 2.2.5 Статистический анализ .....                                                                                                                                               | 62        |
| <b>ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ<br/>ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>                                                                                                    | <b>64</b> |
| 3.1 Макрофагальный состав и транскриптомный профиль микроокружения<br>опухоли у больных раком молочной железы .....                                                             | 64        |
| 3.1.1 Частота встречаемости и количество макрофагов в опухолевом<br>микроокружении при раке молочной железы .....                                                               | 66        |
| 3.1.2 Взаимосвязь количества и частоты встречаемости макрофагов в<br>микроокружении опухоли с различными клинико-морфологическими<br>параметрами при раке молочной железы ..... | 69        |
| 3.1.3 Частота встречаемости и количество макрофагов в опухолевом<br>микроокружении при трижды негативном раке молочной железы .....                                             | 88        |
| 3.1.4 Взаимосвязь количества и частоты встречаемости макрофагов в<br>микроокружении опухоли с PD-L1 статусом при трижды негативном раке<br>молочной железы .....                | 90        |
| 3.1.5 Транскриптомные характеристики макрофагов микроокружения<br>опухоли у пациентов с трижды негативным раком молочной железы в<br>зависимости от PD-L1 статуса опухоли ..... | 95        |
| 3.2 Ко-локализации клеток микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1 .....                                                                                                            | 107       |
| 3.2.1 Частота встречаемости и количество ко-локализованных клеток<br>микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1 .....                                                                 | 108       |

|                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.2 Частота встречаемости ко-локализованных макрофагов микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1 .....                                                                                                                              | 109 |
| 3.2.3 Взаимосвязь частоты встречаемости ко-локализованных клеток микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1, с различными клиническо-морфологическими параметрами .....                                                                | 110 |
| 3.2.4 Клеточный состав PD1+PDL1+ спотов.....                                                                                                                                                                                     | 117 |
| 3.3 Поиск предиктора длительности ответа на химиоиммунотерапию при PD-L1-позитивном метастатическом или прогрессирующем трижды негативном раке молочной железы .....                                                             | 119 |
| 3.3.1 Взаимосвязь количества и частоты встречаемости различных типов иммунных клеток в микроокружении опухоли с длительностью ответа на химиоиммунотерапию .....                                                                 | 122 |
| 3.3.2 Оценка предиктивной ценности параметров микроокружения .....                                                                                                                                                               | 125 |
| 3.4 Характеристики макрофагов, ассоциированных с длительностью ответа на химиоиммунотерапию при PD-L1-позитивном метастатическом или прогрессирующем трижды негативном раке молочной железы.....                                 | 128 |
| 3.4.1 Сравнение функциональной характеристики макрофагов микроокружения у пациентов с раком молочной железы, стратифицированных в соответствии с вероятностью длительного и короткого ответа на терапию химиоиммунотерапию ..... | 128 |
| 3.4.2 Транскриптомные особенности микроокружения опухоли у пациентов с раком молочной железы, стратифицированных в соответствии с вероятностью длительного и короткого ответа на химиоиммунотерапию ..                           | 130 |
| 3.4.3 Биологические процессы и молекулярные функции, характерные для иммунных клеток микроокружения опухоли у пациентов с раком молочной                                                                                         |     |

|                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| железы, стратифицированных в соответствии с вероятностью длительного и короткого ответа на химиоиммунотерапию ..... | 133 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....                                                                                                    | 139 |
| ВЫВОДЫ .....                                                                                                        | 145 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....                                                                                      | 147 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....                                                                       | 148 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....                                                                                              | 150 |

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее часто диагностируемым онкологическим заболеванием и основной причиной смерти женщин от рака во всем мире [26]. Характер лечения и прогноз при РМЖ во многом обусловлены биологическими свойствами опухоли, включая её молекулярно-генетический подтип, размеры и степень злокачественности [175]. Кроме того, в настоящее время установлено, что течение заболевания, вероятность его прогрессирования и формирования метастазов, а также устойчивость к проводимой терапии тесно связаны с особенностями клеточного состава опухолевого микроокружения [129] и направленности протекающих в нём иммунновоспалительных реакций [2].

Макрофаги, как и лимфоциты, могут составлять значительную часть клеточного состава стромы солидных новообразований, достигая в отдельных случаях до 50 % [164]. В настоящее время наиболее распространённой и продуктивной концепцией, применяемой для анализа роли макрофагов в процессах воспаления, регенерации и опухолевой прогрессии, является парадигма M1–M2. Макрофаги фенотипа M1 обладают выраженными цитотоксическими свойствами, реализующимися как через цитокин-опосредованные механизмы, так и посредством антитело-опосредованной цитотоксичности. Более того, экспериментальные исследования подтверждают их способность к фагоцитозу опухолевых клеток [98]. В противоположность этому макрофаги подтипа M2 участвуют в формировании метастатического потенциала опухоли, стимулируют ангиогенез и подавляют T-клеточно-опосредованный противоопухолевый иммунный ответ [129]. Однако, на сегодняшний день ни один параметр, основанный на оценке функциональных

характеристик макрофагов, ассоциированный с риском прогрессии, не внедрен в практику.

Значимость иммунной инфильтрации в опухолевой ткани выходит за рамки исключительно прогностической оценки исхода заболевания. В настоящее время накоплено значительное количество данных, указывающих на ключевую роль микроокружения в эффективности противоопухолевой терапии, включая методы, направленные на контрольные точки иммунного ответа, в частности PD-1/PD-L1 сигнального пути [139]. Для назначения данной группы препаратов при РМЖ используется критерий выявления в строме опухоли иммунных клеток, экспрессирующих PD-L1 и занимающих не менее 1 % площади, включающей опухолевые клетки, а также интратуморальную и перитуморальную строму [163]. Однако накопленные данные свидетельствуют о том, что блокада PD-1/PD-L1 не всегда приводит к ожидаемому эффекту даже у пациентов с PD-L1-позитивным статусом [89]. Механизмы терапевтического действия остаются до конца не выясненными. Предполагается, что благоприятный эффект иммунотерапии связан с изменением функционального состояния иммунокомпетентных клеток, обусловленным взаимодействием антител с PD-L1, экспрессируемым клетками, формирующими иммунновоспалительное микроокружение опухоли [157]. В связи с этим особую значимость приобретает изучение зависимости активности лимфоцитов, макрофагов и иных иммунных клеток от экспрессии или подавления PD-L1 и PD-1, что в первую очередь отражается на их способности секретировать цитокины, а также проявлять пластичность, переходя в различные функциональные фенотипы.

Среди ключевых клеточных популяций иммунного ответа в опухолевом микроокружении важное место занимают макрофаги, поэтому понимание механизмов их активации и ингибирования имеет фундаментальное значение. По современным данным, взаимодействие PD-L1, экспрессируемого опухо-

ассоциированными макрофагами, с рецептором PD-1 на Т-лимфоцитах приводит к снижению их функциональной активности и способствует иммунному уклонению опухоли. Экспрессия PD-L1 и PD-1 ограничивает противоопухолевый потенциал макрофагов, который может быть восстановлен при блокировании сигнального пути PD-L1/PD-1. Макрофаги с высокой экспрессией этих молекул описываются как «функционально истощённые» [24]. В то же время, имеются сообщения, что PD-L1, экспрессируемый на макрофагах, не ингибирует ответ Т-клеток, а просто защищает макрофаги от разрушения Т-клетками [149]. Более того, экспрессия PD-L1 в опухоль-ассоциированных макрофагах связана с активацией внутриклеточных сигнальных каскадов, которые участвуют в формировании M2-фенотипа, что указывает на возможное участие PD-L1 в перепрограммировании M1-макрофагов в M2 [182]. Аналогично показано, что PD-1 принимает участие в поддержании M2-поляризации макрофагов [137]. Следовательно, экспрессия PD-L1 влечёт за собой как изменение функционального статуса самих макрофагов (по продукции цитокинов), так и модификацию активности лимфоцитов, а также влияет на пластичность клеточного фенотипа и процессы клеточной гибели. Важно подчеркнуть, что для функционирования сигнального пути PD-L1/PD-1 необходимо взаимодействие лиганда PD-L1 с рецептором PD-1, однако число исследований, посвящённых анализу прямых межклеточных контактов иммуноцитов в опухолевом микроокружении крайне ограничено.

Таким образом, существующие представления о влиянии PD-1 и PD-L1 на функциональную активность макрофагов в опухолевом микроокружении остаются неполными. При этом вопрос о взаимосвязи между PD-L1-статусом опухоли, клеточным составом микроокружения и фенотипическими характеристиками макрофагов до конца не изучен. Недостаточно исследовано и прогностическое значение взаимодействия PD-1/PD-L1-позитивных иммунных клеток в тканях РМЖ. Кроме того, в настоящее время отсутствуют

комплексные работы, посвящённые визуализации межклеточных лиганд-рецепторных взаимодействий, что позволило бы напрямую подтвердить функциональную роль контрольной точки PD-1/PD-L1 и объективно оценить её значимость как терапевтической мишени. В перспективе подобные данные могут стать основой для разработки более надёжных прогностических критериев эффективности терапии ингибиторами PD-1/PD-L1 при раке молочной железы.

### **Степень разработанности темы исследования**

На сегодняшний день накоплен значительный массив исследований, посвящённых изучению макрофагального состава микроокружения различных солидных опухолей, его роли в прогрессировании злокачественного процесса, а также механизмов участия макрофагов в противоопухолевом иммунном ответе. При РМЖ, согласно данным метаанализа, высокая плотность макрофагов в опухолевом микроокружении (CD68+ и/или CD163+) ассоциирована со снижением общей и безрецидивной выживаемости [8]. В то же время показано, что при РМЖ увеличение количества M1-макрофагов и высокое соотношение M1/M2 в микроокружении опухоли сопряжены с выраженной инфильтрацией противоопухолевых иммунных клеток, более длительной выживаемостью пациентов и лучшим ответом на неoadъювантную химиотерапию [128]. С использованием пространственного транскриптомного секвенирования ткани молочной железы были выявлены макрофагальные популяции, расширяющие традиционное представление о M1–M2 дихотомии [94].

Особое значение приобретает исследование механизмов активации и ингибирования макрофагов, а также других клеточных компонентов иммунного микроокружения. В частности, показано, что при трижды негативном РМЖ взаимодействие между PD-L1+ макрофагами и опухолевыми клетками может

способствовать защите последних от цитотоксического действия CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и тем самым стимулировать рост опухоли [154]. С другой стороны, получены данные о том, что PD-L1<sup>+</sup> макрофаги в опухолевом микроокружении при РМЖ представляют собой зрелые иммуностимулирующие клетки, склонные к пространственной ассоциации с Т-лимфоцитами, тогда как PD-L1<sup>–</sup> макрофаги обладают иммуносупрессивными свойствами и преимущественно локализуются в непосредственной близости к опухолевым клеткам [168]. Эти результаты согласуются с данными исследования, в котором было показано, что высокая плотность CD68<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup> макрофагов в опухолевой строме у пациентов с трижды негативным РМЖ связана с более продолжительной общей выживаемостью [167].

В последние годы значительное внимание уделяется изучению роли макрофагов опухолевого микроокружения в формировании чувствительности к терапии ингибиторами PD-1/PD-L1. Показано, что исходные характеристики макрофагального пула способны оказывать существенное влияние на эффективность лечения. В частности, блокада PD-1/PD-L1 может оказаться недостаточной для восстановления активности опухолеспецифических Т-лимфоцитов в условиях выраженного иммуносупрессивного воздействия медиаторов, продуцируемых макрофагами [41]. Кроме того, по одним данным, наличие контактов между PD-1<sup>+</sup> и PD-L1<sup>+</sup> клетками в опухолевом микроокружении коррелирует с благоприятным ответом на иммунотерапию [141], в то время как другие исследования демонстрируют противоположный эффект, указывая на снижение её эффективности [177]. Ведётся активный поиск предикторов ответа на иммунотерапию ингибиторами PD-1/PD-L1 при РМЖ, и, несмотря на появление прогностических моделей [29, 105, 180], их практическая реализация остаётся затруднительной ввиду сложности и недостаточной воспроизводимости.

Тем не менее, несмотря на значительный объём накопленных данных, при РМЖ до настоящего времени отсутствуют сведения о количественном распределении PD-1+ и PD-L1+ макрофагов в опухолевом микроокружении, не выполнена визуализация контактов PD-1+ и PD-L1+ клеток, а также не изучен транскриптомный профиль макрофагов в зависимости от PD-L1 статуса опухоли. Кроме того, сохраняется потребность в уточнении критериев отбора пациентов для назначения иммунотерапии.

### **Цель исследования**

Изучить функциональные характеристики макрофагов в опухолевом микроокружении и их связь с клинико-морфологическими параметрами и PD-L1 статусом больных раком молочной железы.

### **Задачи исследования**

1. Оценить частоту встречаемости и количество M1 и M2 макрофагов, учитывая экспрессию ими PD-1 и PD-L1, в опухолевом микроокружении при раке молочной железы.
2. Охарактеризовать связь количественных характеристик макрофагов и их функционального состояния с клинико-морфологическими параметрами больных раком молочной железы.
3. Исследовать связь количественных характеристик макрофагов и их функционального состояния с PD-L1 статусом опухоли больных трижды негативным раком молочной железы.
4. Сравнить транскриптомный профиль макрофагов у пациентов с PD-L1-позитивным и PD-L1-негативным трижды негативным раком молочной железы.

5. Оценить частоту встречаемости ко-локализации клеток с рецептором PD-1 и лигандом PD-L1, в том числе макрофагов, в микроокружении рака молочной железы.
6. Оценить предикторную значимость иммунологических параметров опухолевого микроокружения у больных метастатическим или прогрессирующим трижды негативным раком молочной железы, получавших терапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом.
7. Изучить особенности транскриптного профиля иммунных клеток микроокружения, ассоциированные с вероятной длительностью ответа на терапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом у пациентов с раком молочной железы.

### **Научная новизна**

Впервые обнаружено, что среди макрофагов микроокружения опухоли фенотип PD1–PDL1+ более характерен для M2 макрофагов, чем для M1. При этом PD1+PDL1– фенотип макрофагов не ассоциирован с состоянием M1-M2 поляризации.

Впервые продемонстрированы существенные различия в транскриптном профиле участков стромы опухоли, содержащих макрофаги, у пациентов с трижды негативным раком молочной железы в зависимости от PD-L1 статуса.

Впервые были обнаружены различия в экспрессии генов рецепторов иммунных контрольных точек в участках стромы опухоли, содержащих макрофаги, в зависимости от PD-L1 статуса рака молочной железы.

Впервые визуализированы ко-локализации иммунных клеток, одна из которых несет лиганд PD-L1, а другая рецептор PD-1, в микроокружении рака

молочной железы. Впервые оценена частота их встречаемости, в том числе в зависимости от молекулярно-биологического подтипа опухоли.

Впервые обнаружено, что доля CD163+ макрофагов в микроокружении опухоли является прогностическим фактором длительности ответа на химиоиммунотерапию при метастатическом или прогрессирующем трижды негативном раке молочной железы.

Впервые показано, что транскриптомные характеристики иммунных клеток микроокружения у пациентов с раком молочной железы ассоциированы с вероятностью длительного или короткого ответа на химиоиммунотерапию.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты исследования расширяют понимание роли макрофагов, вовлечённых в функционирование иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 в микроокружении рака молочной железы. Показана связь макрофагального состава с PD-L1-статусом опухоли и выявлены ассоциации иммунологических характеристик микроокружения с продолжительностью ответа на химиоиммунотерапию.

Фундаментальная ценность работы заключается в установлении частоты выявления макрофагов, экспрессирующих PD-1, PD-L1 и иные функциональные молекулы, а также в определении их взаимосвязи с клинικο-морфологическими особенностями опухолей и транскриптомным профилем макрофагов при различном PD-L1-статусе. Существенным вкладом является и описание частоты межклеточных лиганд-рецепторных взаимодействий между PD-1/PD-L1-положительными иммунными клетками, включая макрофаги, в микроокружении опухоли.

Практическая значимость работы связана с выявлением иммунологических маркеров, определяющих продолжительность ответа на

химиоиммунотерапию у больных раком молочной железы, а также со спецификой транскриптомного профиля микроокружения при различной вероятности длительного ответа на данный вид терапии. Полученные результаты могут послужить основой для создания новых прогностических подходов к оценке эффективности иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1, а также для уточнения показаний к её назначению с целью повышения результативности лечения.

### **Методология и методы исследования**

Данное исследование выполнено в ретроспективном дизайне и охватило опухолевый материал 66 пациенток с подтверждённым морфологически диагнозом инвазивной неспецифической карциномы молочной железы. Из них 16 пациенток имели метастатический или прогрессирующий трижды негативный рак молочной железы с PD-L1-позитивным статусом и получали химиоиммунотерапию. Для морфологического исследования использовалась ткань первичной опухоли, фиксированная в формалине и заключённая в парафин, полученная до начала лечения. Для решения поставленных задач применялись два основных метода: многоцветная иммунофлуоресценция с TSA-модификацией и пространственная транскриптомика Visium. Первый из них использовался для оценки экспрессии PD-1 и PD-L1 в макрофагах разных фенотипов — CD68+CD163– (M1) и CD163+ (M2). В группе пациенток с метастатическим или прогрессирующим PD-L1-позитивным трижды негативным раком дополнительно определялись количественные параметры CD8+ Т-лимфоцитов, CD20+ В-лимфоцитов, CD163+ макрофагов и FoxP3+ Т-регуляторных клеток с учётом экспрессии PD-1 и PD-L1. Методика пространственной транскриптомики Visium позволила провести сопоставительный анализ транскриптомных характеристик и связанных с ними

биологических процессов в зонах стромы опухоли, содержащих макрофаги, у пациенток с различным PD-L1-статусом. Для статистической обработки данных применялись непараметрические критерии, ROC-анализ, а также методы бинарной логистической регрессии.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Экспрессия молекул PD-1 и PD-L1 на M1 и M2 макрофагах микроокружения опухоли при раке молочной железы зависит от молекулярного подтипа и PD-L1-статуса опухоли, но не ассоциирована с фактом развития лимфогенных и гематогенных метастазов.
2. У больных трижды негативным раком молочной железы спектр биологических процессов в опухоль-ассоциированных макрофагах определяется PD-L1-статусом опухоли.
3. У больных метастатическим или прогрессирующим трижды негативным раком молочной железы количество CD163+ макрофагов в строме опухоли является предиктором длительности ответа на химиоиммунотерапию.

### **Соответствие диссертации паспортам научных специальностей**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, направлению исследования п.2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)» и паспорту научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия, направлению исследования п.2. «Научный анализ патологических процессов, лежащих в основе заболевания,

прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов».

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность полученных в диссертационной работе результатов обеспечивается рядом факторов. Прежде всего, это достаточный объём клинического материала, включающий опухолевую ткань значительного числа пациентов с различными формами рака молочной железы, что позволяет рассматривать выводы исследования как статистически и клинически обоснованные. Кроме того, применялся широкий спектр современных методологических подходов, включающих морфологические, иммуногистохимические, иммунофлуоресцентные и биоинформатические методы, а также технологию пространственной транскриптомики, что существенно повышает уровень объективности анализа. Использование высокотехнологичного лабораторного оборудования и стандартизированных протоколов позволило минимизировать методические ошибки и получить воспроизводимые результаты. Статистическая обработка данных выполнялась с применением адекватных методов анализа, включая непараметрические критерии, ROC-анализ и логистическую регрессию, что гарантировало корректность интерпретации и высокую степень достоверности выводов.

### **Апробация материалов диссертации**

Основные результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на VII Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2022 год), XII Научно-практической конференции с международным участием «Путь в науку» (Москва, 2023 год),

VIII Всероссийском молодёжном научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (Орел, 2023 год), VI Всероссийской конференции «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» (Горно-Алтайск, 2024 год), а также на XI Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2025» (Санкт-Петербург, 2025 год).

### **Публикации результатов исследования**

По результатам диссертационного исследования опубликовано 7 научных работ, включая 5 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, получен 1 патент на изобретение.

### **Личный вклад автора**

Автором проведён систематический поиск и аналитический обзор литературы по теме, что позволило сформировать научную основу работы. Автором самостоятельно выполнены все экспериментальные исследования — морфологические и иммуногистохимические методы, TSA-модифицированная иммунофлуоресценция и пространственная транскриптомика, проведена обработка и статистический анализ полученных данных, их интерпретация, сформулированы основные выводы.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста и включает введение, три главы (обзор литературы; материал и методы исследования; результаты собственных исследований с их обсуждением),

заклучение, выводы и практические рекомендации. В работе представлено 43 таблицы и 18 иллюстративных рисунков, которые отражают основные положения и результаты исследования. Библиографический список насчитывает 182 источника, среди которых 5 отечественных и 177 зарубежных публикаций.

## **ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Рак молочной железы: общая характеристика**

#### **1.1.1 Эпидемиология**

РМЖ является самым распространенным видом злокачественных новообразований среди женщин во всем мире по данным Международного агентства по изучению рака [26]. В России РМЖ также является ведущей онкологической патологией, составляя, согласно статистическим данным за 2023 год, 22,5 % от всех злокачественных новообразований у женщин [1]. В 2023 году диагноз РМЖ был впервые поставлен 82499 женщинам, причем рост заболеваемости продолжает повышаться. РМЖ также является причиной значительной смертности: в 2023 году РМЖ стал причиной смерти 18580 женщин в России [1].

#### **1.1.2 Молекулярно-биологический подтип как фактор, определяющий течение и лечение рака молочной железы**

РМЖ – один из немногих видов рака, для которого существует строгая молекулярная классификация, эффективно применяемая в клинической практике. Ее разработка стала результатом исследования паттернов экспрессии генов в образцах ткани с РМЖ, проведенном Perou C.M, Sorlie T. и соавт. в 2000 году [132]. В настоящее время, определение молекулярно-биологического подтипа РМЖ основано на оценке рецепторного статуса опухоли, а именно, степени экспрессии ER (рецепторов эстрогена), PR (рецепторов прогестерона), HER2 (рецептор второго типа к человеческому эпидермальному фактору роста) и Ki67 (показатель пролиферативной активности опухолевых клеток) с помощью иммуногистохимического метода окрашивания ткани [16]. Разные

молекулярно-биологические подтипы РМЖ фактически представляют собой отдельные заболевания, требующие индивидуальных терапевтических стратегий [175].

Люминальный А подтип встречается в 30-40 % случаев РМЖ [21]. Является эстроген- и прогестерон-зависимым подтипом с низким уровнем экспрессии HER2, низким пролиферативным индексом (ER+, PR $\geq$ 20 %, HER2–, Ki67<20 %) и высокой степенью дифференцировки [161]. Люминальный А РМЖ поддается гормонотерапии, имеет тенденцию к медленному росту и благоприятный прогноз [58].

Люминальный В подтип составляет 20-30 % от всех типов РМЖ [21]. Люминальный В подтип считается более агрессивным подтипом РМЖ, чем люминальный А. Является эстроген-зависимой опухолью с высоким пролиферативным индексом и варьирующим статусом HER2 (ER+, PR<20 % и/или HER2+ и/или Ki67 $\geq$ 20 %) [161]. Данный подтип часто не чувствителен к гормонотерапии, но может отвечать на терапию моноклональными антителами (таргетную терапию, направленную на HER2) [6].

HER2-позитивный подтип встречается с частотой 12-20 % [21]. При данном подтипе РМЖ в опухолевых клетках отсутствует экспрессия ER и PR, пролиферативный индекс высокий (ER–, PR–, HER2+) [161]. HER2-позитивный РМЖ имеет худший прогноз, чем люминальные подтипы, но характеризуется чувствительностью к терапии моноклональными антителами [111].

Трижды негативный подтип возникает с частотой 15-20 % [21]. Этот тип рака чаще встречается у женщин с мутациями гена *BRCA1* [57]. Является эстроген- и прогестерон-независимым подтипом с низкой экспрессией HER2 (ER–, PR–, HER2–), высоким пролиферативным индексом и низкой степенью дифференцировки. Трижды негативный РМЖ отличается высокой агрессивностью, большой вероятностью развития рецидивов и метастазов. Как правило, для лечения трижды негативного РМЖ применяется системная

химиотерапия с использованием таких препаратов, как антрациклины и таксаны, в неоадьювантном или адьювантном режиме [124].

Однако на данный момент хорошо известно, что не только молекулярная характеристика опухолевых клеток и гистологические особенности опухоли, но и иммуновоспалительный компонент микроокружения опухоли (МОО) играет значительную роль в течении РМЖ, включая вероятность прогрессии и метастазирования, а также резистентность к терапии [129].

### **1.1.3 Опухолевое микроокружение как фактор, влияющий на течение и лечение рака молочной железы**

В 2014 году International TILs (tumor-infiltrating lymphocytes) Working Group предложила методологию оценки уровня TILs в опухоли при РМЖ [140], что позволило стандартизировать определение этого параметра. TILs определяются как сумма всех моноклеарных клеток, включая лимфоциты и плазматические клетки, в строме опухоли и среди опухолевых клеток [140]. Наличие TILs в опухоли отражает текущий противоопухолевый иммунный ответ пациента [46]. Опухоль классифицируется как «горячая» или «воспаленная», если она характеризуется обильным иммунным инфильтратом, или «холодная», если она в значительной степени лишена лимфоцитов [46].

Традиционно РМЖ считался иммунологически «холодной» опухолью, однако было обнаружено, что значительно более высокий уровень TILs характерен для трижды негативного и HER2-позитивного РМЖ по сравнению с люминальными формами, а также ассоциирован с большей степенью злокачественности и экспрессией пролиферативного маркера Ki67 [110]. При этом при трижды негативном и HER2-позитивном РМЖ повышенный уровень TILs является предиктором лучшего ответа на неоадьювантную химиотерапию и исходов заболевания [140], а при люминальном HER2-негативном РМЖ –

наоборот, неблагоприятным прогностическим фактором течения заболевания [42]. Причём было выявлено, что развитие гематогенных метастазов и более короткая безметастатическая выживаемость у больных с люминальным HER2-негативным РМЖ связаны с большим количеством TILs вблизи солидных структур [3]. Кроме того, предполагается, что «горячие» опухоли с более выраженной иммунной инфильтрацией, представляют собой более благоприятные условия для успешной иммунотерапии [109]. Пациенты с метастатическим трижды негативным РМЖ и высоким уровнем стромальных TILs ( $\geq 10\%$ ), имели лучшие показатели объективного ответа на иммунотерапию пембролизумабом, чем пациенты с низким уровнем стромальных TILs ( $< 10\%$ ) [109].

Однако МОО включает в себя различные популяции иммунных клеток, в том числе с противовоспалительными свойствами, и определение его состава и баланса иммуновоспалительных реакций является важным шагом на пути к улучшению прогнозирования течения и ответа на иммунотерапию РМЖ.

#### **1.1.4 Иммунотерапия при раке молочной железы**

Иммунотерапия с использованием ингибиторов PD-1 или PD-L1 в настоящее время рассматривается как один из наиболее перспективных подходов к лечению злокачественных новообразований различной локализации, включая рак молочной железы. Принцип действия данного метода основан на связывании анти-PD-1/PD-L1 антител со специфической мишенью, что приводит к блокированию функционирования иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 [44]. Указанная контрольная точка представляет собой ключевой механизм, обеспечивающий ускользание опухоли от иммунного надзора. Рецептор PD-1 экспрессируется преимущественно на иммунных клетках опухолевого микроокружения, тогда как его лиганд PD-L1

определяется как на опухолевых клетках, так и на клетках иммунной системы. Блокирование взаимодействия PD-1/PD-L1 направлено на восстановление активности подавленного противоопухолевого Т-клеточного иммунного ответа в микроокружении опухоли [44].

В 2019 году атезолизумаб, моноклональное антитело против PD-L1, в комбинации с наб-паклитакселом впервые получил одобрение FDA (Food and Drug Administration) для терапии рака молочной железы. Согласно данным исследования IMpassion130, данная комбинация продемонстрировала эффективность в качестве первой линии лечения неоперабельного местнораспространённого или метастатического трижды негативного РМЖ при экспрессии PD-L1 на инфильтрирующих опухоль иммунных клетках [54, 142]. Однако уже через два года одобрение FDA было отозвано [56], тогда как Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) сохранило разрешение на использование препарата по этим показаниям [158].

Другим важным этапом развития иммунотерапии при ТНРМЖ стали исследования программы KEYNOTE. На основании результатов многоцентрового исследования KEYNOTE-355 в 2020 году был одобрен пембролизумаб — ингибитор PD-1, который в комбинации с химиотерапией стал применяться в качестве терапии первой линии у пациенток с метастатическим PD-L1-положительным ТНРМЖ [37]. В 2021 году тот же препарат был утверждён и для терапии ранних форм заболевания: он используется совместно с химиотерапией в неоадьювантном режиме, а также в виде адьювантной монотерапии, что было подтверждено результатами исследования KEYNOTE-522 [55, 143]. Следует отметить, что иммунотерапия ингибиторами PD-1/PD-L1 в настоящее время применяется исключительно при трижды негативном подтипе РМЖ. Для люминального А, люминального В и HER2-позитивного рака молочной железы её клиническая эффективность не доказана, и данные препараты не входят в стандарты лечения, где основу

терапии составляют гормональные и таргетные средства, а также химиотерапия [44].

Несмотря на то, что у части больных с ТНРМЖ достигается стойкий ответ на иммунотерапию, значительная доля пациентов не получает клинической пользы от данного подхода. В этой связи продолжаются активные исследования, направленные на поиск надёжных предиктивных биомаркеров, позволяющих точнее отбирать кандидатов для лечения.

## **1.2 Состав опухолевого микроокружения у больных раком молочной железы**

Опухолевая строма включает широкое множество популяций клеток врожденного и адаптивного иммунитета, а также неиммунные клетки (фибробласты, адипоциты) [138]. Количественный состав клеток МОО разнится от пациента к пациенту, при этом различные популяции иммунных клеток обладают уникальным функционалом и играют противо- или проопухолевую роль в МОО [138]. При РМЖ лимфоциты и макрофаги в МОО играют ключевую роль, формируя основу иммунного ответа [138]. Лимфоцитарный состав преимущественно представлен Т-клетками, с меньшим количеством В-клеток [138]. Макрофаги, в свою очередь, традиционно классифицируются на два типа – М1 и М2 [118], однако данная классификация в настоящее время активно пересматривается [94].

Среди Т-клеток в микроокружении РМЖ встречаются цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-клетки, CD4<sup>+</sup> хелперные Т-клетки 1, 2 и 17 типов (Th1, Th2 и Th17), фолликулярные хелперные Т-клетки (Tfh) и регуляторные Т-клетки (Treg). Центральная роль в противоопухолевом адаптивном иммунном ответе принадлежит цитотоксическим CD8<sup>+</sup> Т-клеткам. После распознавания опухолеассоциированного антигена, представленного антиген-презентирующей

клеткой в комплексе с HLA-I, CD8<sup>+</sup> Т-клетке для активации необходимо интегрировать несколько сигналов, включая сигнал Т-клеточного рецептора, сигналы костимулирующих молекул и воспалительных цитокинов (IL2, IL12 и IFN типа I) [38, 39, 179]. Цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты после активации реализуют противоопухолевый эффект через секрецию ключевых эффекторных молекул. Перфорин формирует поры в мембране клеток-мишеней, обеспечивая транспорт гранзимов — сериновых протеаз, запускающих каскад апоптоза и приводящих к элиминации опухолевых клеток [13, 165]. Согласно данным метаанализа, высокий уровень инфильтрации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в опухолевой ткани ассоциирован с более благоприятным прогнозом у больных раком молочной железы, включая увеличение общей и безрецидивной выживаемости [153]. Наибольшая прогностическая значимость отмечена для CD8<sup>+</sup> Т-клеток, локализованных в перитуморальной области [153]. Вместе с тем в условиях хронического воспалительного процесса функциональная активность CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов постепенно снижается, что приводит к формированию состояния их истощения. Для фенотипа истощённых CD8<sup>+</sup> Т-клеток типично нарушение эффекторных функций, что проявляется уменьшением продукции ключевых цитокинов — IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2, а также повышение экспрессии ингибиторных рецепторов иммунных контрольных точек, включая PD-1, CTLA-4, TIM-3, TIGIT и LAG-3 [159]. Предотвращение или устранение истощения Т-клеток является основной целью терапии ингибиторами иммунных контрольных точек, в том числе при РМЖ [35].

Th1 секретируют воспалительные цитокины IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  и поддерживают противоопухолевый иммунный ответ путем ускорения созревания дендритных клеток, повышения эффективности презентации антигена, усиления клональной экспансии и цитолитической функции CD8<sup>+</sup> Т-клеток, образования CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти и активации M1 макрофагов опухолевого микроокружения [18]. Кроме того, цитокины Th1 обладают

прямой противоопухолевой активностью: останавливают клеточный цикл в G1/G0 и индуцируют сенесценс и апоптоз в клетках опухоли молочной железы [19, 121]. Th2 чаще рассматриваются как популяция клеток, стимулирующих опухолевую прогрессию. Th2, экспрессирующие высокие уровни IL4, способны повышать проопухолевые свойства макрофагов, которые активируют сигнальный каскад EGFR на опухолевых клетках молочной железы и способствуют инвазии и последующему метастазированию РМЖ [40]. Кроме того, Т-хелперы 2-го типа (Th2) посредством продукции цитокинов IL-4 и IL-13 способны стимулировать пролиферацию эпителиальных клеток молочной железы за счёт активации сигнальных путей STAT-6 и IRS-1 [172]. Вместе с тем имеются данные, что при раке молочной железы Th2 могут изменять функциональное состояние опухолевых клеток, индуцируя их терминальную дифференцировку, а также оказывать прямое ингибирующее воздействие на канцерогенез и процессы эпителиально-мезенхимального перехода. Эти эффекты реализуются через секрецию цитокинов IL-3, IL-5 и GM-CSF [17]. Соотношение клеток Th2/Th1 в первичных опухолях при РМЖ коррелирует со стадией опухоли, метастатическими лимфатическими узлами, большим размером опухоли и сниженной общей выживаемостью [176]. Соответственно, иммунотерапия ингибиторами PD-1/PD-L1 направлена на восстановление иммунитета Th1 и сдвиг соотношения Th2/Th1 в сторону Th1 [34].

Роль Th17 и Tfh в МОО неоднозначна. С одной стороны, Th17 путем секреции IL17 способствуют росту опухоли, вызывая ангиогенез [62]. С другой стороны, Th17 участвуют в привлечении иммунных клеток в МОО и активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток или преобразуются в Th1 [62]. У пациентов с РМЖ повышенное количество Th17 в опухолевой строме ассоциировано с высокой степенью злокачественности, тройным негативным молекулярным подтипом и более короткой безрецидивной выживаемостью [33]. Tfh принимают участие в дифференцировке В-клеток и являются важным функциональным компонентом

в третичных лимфоидных структурах опухолей, в том числе при РМЖ [64, 65, 123].

Treg являются основными регуляторами гомеостаза и толерантности иммунной системы. В МОО при РМЖ Treg играют роль проопухолевой популяции, тормозящей противоопухолевый иммунный ответ за счет секреции иммуносупрессорных цитокинов (IL10 и TGF- $\beta$ ), а также экспрессии иммунных контрольных точек (CTLA-4, PD-L1 и LAG-3) [93]. Высокая инфильтрация МОО FoxP3<sup>+</sup> Tregs ассоциирована с отрицательным рецепторным статусом и экспрессией HER2, с низкой общей выживаемостью пациентов с РМЖ [147, 181], а также способствует устойчивости к иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1 [53].

Роль В-клеток, инфильтрирующих опухоль, считается двоякой. Они могут оказывать как противоопухолевое, так и проопухолевое действие в зависимости от их фенотипов и состава МОО. При РМЖ В-клетки обнаруживаются в МОО как по отдельности, так и в составе третичных лимфоидных структур [99]. Противоопухолевая активность В-клеток в МОО опосредована распознаванием опухолеспецифических антигенов, их презентацией Т-клеткам и продукцией антител, маркирующих опухолевые клетки для их дальнейшего разрушения другими иммунными клетками путем антителозависимой клеточной цитотоксичности [99]. Было показано, что при трижды негативном РМЖ высокая плотность стромальных В-клеток (CD20<sup>+</sup> TILs) ассоциирована с лучшей безрецидивной и общей выживаемостью [95]. Кроме того, В-клетки и Tfh опосредуют реакцию на ингибиторы контрольных точек в моделях РМЖ у мышей с высокой мутационной нагрузкой [72]. Наряду с этим, В-клетки также могут поддерживать рост опухоли. Регуляторные В-лимфоциты (Breg) характеризуются экспрессией молекул с ингибирующими свойствами, включая PD-L1 и FasL, а также продуцируют противовоспалительные цитокины, такие как IL-10, TGF- $\beta$  и IL-35, которые

обеспечивают подавление иммунных реакций [116]. Известно, что Врег присутствуют в МОО при РМЖ и вовлечены в преобразование покоящихся Т-клеток в Treg, чем способствуют формированию иммуносупрессивного микроокружения и прогрессии [126].

Опухольассоциированные макрофаги составляют основную популяцию миелоидных клеток опухолевого микроокружения и в ряде солидных опухолей, включая рак молочной железы, могут достигать до 50% от их общего числа [164]. Эти клетки считаются ключевыми медиаторами противоопухолевого иммунного ответа, однако в большей степени они способствуют его подавлению, чем активации [170].

Исследование взаимодействия макрофагов и Т-лимфоцитов с использованием трёхмерной модели «опухоль молочной железы на чипе» *in vitro* показало, что присутствие Т-клеток связано с замедлением миграционной активности как опухолевых клеток, так и макрофагов, тогда как сами макрофаги вносят значимый вклад в прогрессирование заболевания [113].

Кроме того, показано, что характер инфильтрации опухолевого микроокружения макрофагами различных типов оказывает влияние как на течение рака молочной железы, так и на эффективность иммунотерапии. Ведётся поиск прогностических маркеров, основанных на оценке макрофагального состава, однако до настоящего времени ни один из них не внедрён в клиническую практику.

### **1.3 Классические популяции опухоль-ассоциированных макрофагов в микроокружении у больных раком молочной железы**

В начале 2000-х Mills и соавт., а также Gordon и соавт. предложили концепцию активации макрофагов, согласно которой они делятся на два основных типа – M1 и M2 (классически и альтернативно активированные [60]

соответственно) [118]. Эта концепция возникла из наблюдений, что макрофаги у мышей с преимущественным Th1 или Th2 типом иммунного ответа имеют ярко выраженные различия в метаболизме [60, 118, 169], и, в целом, оказалась применимой не только к макрофагам нормальных тканей человека, но и к опухоль-ассоциированным макрофагам.

Стимулами для M1 макрофагов являются IFN- $\gamma$  и лиганды к TLR, в ответ на которые M1 макрофаги секретируют провоспалительные цитокины TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  и IL12, хемокины CXCL9 и CXCL10, способствуя рекрутированию T-клеток и поддержанию Th1 иммунного ответа, а также активные формы азота и кислорода. M1 макрофаги способны уничтожать опухолевые клетки посредством цитокин-опосредованной и антитело-опосредованной цитотоксичности [106, 112, 148]. Кроме этого, имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о способности M1 макрофагов осуществлять фагоцитоз опухолевых клеток [98]. Наоборот, макрофаги M2 активируются с помощью IL4, IL13 и секретируют иммуносупрессивные цитокины такие как: TGF- $\beta$ , IL4, IL10 и IL13. M2 макрофаги выполняют противовоспалительную функцию, принимая участие в рекрутировании Treg и ослабляя активность эффекторных T-клеток, и способствуют регенерации тканей. В опухоли M2 макрофаги формируют иммуносупрессивное МОО и обеспечивают ангиогенез, поддерживая, таким образом, ее рост и образование метастазов [106, 112, 148]. Помимо того, высокий уровень соотношения опухоль-stroma коррелировал с повышенным содержанием макрофагов M2 в ткани опухоли при РМЖ [108]. При этом, как было показано в исследовании с использованием клеточных линий РМЖ, макрофаги, как M1, так и M2, подавляют пролиферацию опухолевых клеток [162].

Во многих исследованиях, посвященных изучению предикторной роли макрофагов в МОО, в том числе при РМЖ, CD68 используется в качестве общего маркера макрофагов, тогда как CD163 и CD206 – в качестве маркера M2

макрофагов. CD68 участвует в дифференциации гемопоэтических клеток моноцитарно-макрофагального происхождения, опосредует фагоцитоз и эндоцитоз, однако его функция в иммунитете и воспалении неоднозначна [155]. CD163 является специфичным для макрофагов белком, известен как scavenger-рецептор комплекса гемоглобин-гаптоглобин, а повышенная экспрессия этого рецептора является одним из основных изменений при переключении макрофагов в M2 фенотип [50]. CD206 представляет собой лектин С-типа, экспрессируемый большинством тканевых макрофагов, и связан с фагоцитозом маннозилированных гликопротеинов [10].

Применение метода пространственного транскриптомного секвенирования в ткани молочной железы позволило выявить наличие как классически активированных макрофагов (macro-m1), характеризующихся экспрессией IL1B, так и альтернативно активированных макрофагов (macro-m2), ассоциированных с экспрессией *MRC1*. Обе эти популяции подразделялись на субкластеры: macro-m1-CCL и macro-m2-CXCL [94]. Кроме того, среди макрофагальных клеток были выделены популяции, экспрессирующие гены интерферонового ответа (macro-IFN) — *IFIT1* и *IFIT2*, а также липид-ассоциированные макрофаги (macro-lipo), характеризующиеся экспрессией *APOC*, *LIPA* и *LPL* [94]. При РМЖ высокий уровень M1 макрофагов и соотношение M1/M2 в МОО связаны с высокой инфильтрацией противоопухолевых иммунных клеток более длительной выживаемостью и лучшим ответом на неоадьювантную химиотерапию [128]. По данным метаанализа, высокая плотность макрофагов в МОО (CD68+ и/или CD163+) связана со снижением общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования при РМЖ [8].

Хотя данная дихотомическая классификация макрофагов получила широкое признание и считается продуктивной для изучения прогностических

характеристик, она является чрезмерно упрощенной и не отражает все многообразие функций макрофагов в опухоли.

#### **1.4 Функциональные популяции опухоль-ассоциированных макрофагов в микроокружении у больных раком молочной железы**

В исследовании Wu и соавт. в МОО больных РМЖ было обнаружено пять кластеров макрофагов: Mac:*CXCL10* с признаками, ранее связанными с фенотипом «M1-подобные», Mac:*EGR1* и Mac:*SIGLEC1*, напоминающие фенотип «M2-подобные», липид-ассоциированные макрофаги LAM1:*FABP5* и LAM2:*APOE*, которые находятся вне традиционной классификации M1/M2 и составляют 30–40% от общего числа миелоидных клеток [171]. РНК, кодирующие PD-L1 (*CD274*) и PD-L2 (*PDCD1LG2*), в высокой степени экспрессировались в популяции Mac:*CXCL10* [171].

Кроме того, было обнаружено, что локализация макрофагов связана с их функциональными фенотипами. Иммуностимулирующие макрофаги с фенотипом CD11c+CD86+ заселяли гнезда опухоли, в то время как иммуносупрессивные макрофаги с фенотипом Sca-1+CD206+PD-L1+ располагались в строме опухоли и ассоциировались с худшими результатами лечения пациентов с РМЖ [12]. Известно также, что CD169+ макрофаги в МОО при РМЖ пространственно связаны с третичными лимфоидными структурами и Tregs [63]. CD169+ макрофаги *in vitro* обладали иммуносупрессивной функцией, ингибируя пролиферацию NK-, Т- и В-клеток и усиливая секрецию антител и IL6 в активированных В-клетках [63]. SPP1+ макрофаги концентрируются в гипоксических и некротических областях опухоли, IL4I1+ макрофаги в опухоли заселяют ниши с высоким оборотом клеток и фагоцитируют апоптотические клетки [115], TREM2+ макрофаги часто образуют скопления и окружают опухолевые гнезда, FOLR2+ макрофаги

локализуются в периваскулярных зонах тканей РМЖ, где они взаимодействуют с CD8<sup>+</sup> Т-клетками и активируют их [120].

Таким образом, новейшие исследования, проведенные с использованием технологий секвенирования единичных клеток, пространственной транскриптомики и мультиплексного профилирования белков, позволили расширить представления о макрофагальном составе и роли макрофагов в МОО при РМЖ. Однако, на сегодняшний день ни один параметр, основанный на оценке функциональных характеристик макрофагов, ассоциированный с риском прогрессии, не внедрен в практику.

### **1.5 Функционирование иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 в опухоль-ассоциированных макрофагах у больных раком молочной железы**

При раке молочной железы лиганд PD-L1 чаще выявляется на иммунных клетках стромы, чем на самих опухолевых клетках. По данным иммуногистохимического анализа, экспрессия PD-L1 определяется на опухолевых клетках приблизительно в 12 % первичных случаев РМЖ и в 32 % случаев трижды негативного подтипа [43]. Для иммунных клеток эти показатели выше: 29 % всех первичных РМЖ и 61 % трижды негативных РМЖ [43]. Среди клеток стромы ведущая роль в экспрессии PD-L1 принадлежит макрофагам [90]. Показана фенотипическая гетерогенность PD-L1-позитивных макрофагов [166] и их участие в регуляции иммунных реакций [171]. По данным литературы, около 30–35 % CD68<sup>+</sup> макрофагов в микроокружении РМЖ экспрессируют PD-L1 [90].

Механистические исследования на мышинных моделях продемонстрировали, что PD-L1<sup>+</sup> макрофаги играют ключевую роль в подавлении противоопухолевого иммунного ответа [97, 102, 156]. Их взаимодействие с PD-1 на поверхности Т-лимфоцитов индуцирует анергию

последних и способствует ускользанию опухоли от иммунного надзора. Вместе с тем в исследованиях при раке лёгкого показано, что PD-L1 на макрофагах может выполнять защитную функцию, предохраняя их от цитотоксического воздействия Т-клеток [149]. При глиобластоме экспрессия PD-L1 в макрофагах ассоциировалась с активацией сигнальных каскадов, участвующих в поляризации в M2-фенотип, что позволило выдвинуть гипотезу о возможном участии PD-L1 в переключении макрофагов с M1- на M2-тип [182]. Для РМЖ подобные данные пока не подтверждены.

Субпопуляция CD163+ макрофагов способна к пролиферации *in situ* в опухолевом микроокружении при РМЖ [130]. Эти клетки экспрессируют ряд иммуносупрессивных молекул, включая PD-L1, PD-L2, IL-10 и TGF- $\beta$ , что подтверждает их роль в подавлении активности Т-лимфоцитов [130]. В частности, взаимодействие PD-L1+ макрофагов с опухолевыми клетками при трижды негативном РМЖ может способствовать защите последних от цитотоксического воздействия CD8+ Т-лимфоцитов и прогрессированию опухоли [154]. Однако данные Wang и соавт. показали, что высокая плотность CD68+PD-L1+ макрофагов в строме у пациенток с трижды негативным РМЖ, не получавших иммунотерапию, ассоциировалась с увеличением общей выживаемости [167]. Это согласуется с результатами другой группы, установившей, что PD-L1+ макрофаги обладают зрелым иммуностимулирующим фенотипом и склонны к пространственной ассоциации с Т-клетками, тогда как PD-L1– макрофаги чаще демонстрируют иммуносупрессивные свойства и располагаются в непосредственной близости от опухолевых клеток [168]. Таким образом, функциональная роль PD-L1+ макрофагов при РМЖ остаётся дискуссионной, а представленные в литературе данные противоречивы.

Рецептор PD-1 первоначально был описан как коингибиторный белок, экспрессируемый на активированных Т-лимфоцитах. Его взаимодействие с PD-

L1 приводит к фосфорилированию сигнальных молекул и подавлению передачи сигнала от Т-клеточного рецептора (TCR) или костимулирующего рецептора CD28, что снижает функциональную активность Т-клеток [152]. Впоследствии было показано, что экспрессия PD-1 характерна также для В-лимфоцитов, NK-клеток, дендритных клеток, моноцитов и макрофагов [61, 125]. В отношении макрофагов установлено, что PD-1+ клетки обладают пониженной эффекторной функцией. Так, в исследовании Huang и соавт. перитонеальные макрофаги у пациентов с сепсисом экспрессировали высокие уровни PD-1 и характеризовались сниженной бактерицидной активностью [76]. Дополнительно показано, что PD-1 в макрофагах ингибирует фагоцитоз и участвует в поляризации в M2-фенотип [61, 91, 137].

Вместе с тем роль PD-1+ макрофагов в опухолевом микроокружении при РМЖ остаётся малоизученной. В настоящее время отсутствуют данные о частоте их выявления в строме опухоли и функциональных характеристиках данной популяции.

### **1.6 Роль макрофагов в эффективности иммунотерапии при раке молочной железы**

При РМЖ макрофагальная инфильтрация МОО более характерна для пациентов, которым потенциально может быть назначена иммунотерапия. Анализ транскриптома раннего трижды негативного РМЖ с позитивным и негативным PD-L1 статусом показал, что в МОО PD-L1-позитивного РМЖ была повышена экспрессия IDO-1, HLA-DR, CD40 и CD163, характерных для макрофагов, по сравнению с PD-L1-негативным РМЖ [28].

Многогранная роль макрофагов в МОО в эффективности иммунотерапии обусловлена следующими факторами. Во-первых, макрофаги, экспрессируя PD-1 и PD-L1, могут являться прямой мишенью анти-PD-1/PD-L1 препаратов. Во-

вторых, макрофаги обладают широким спектром функций, играя фундаментальную роль как во врожденных, так и в адаптивных иммунных реакциях [114], и направляя противоопухолевый иммунный ответ. В-третьих, макрофаги являются наиболее многочисленными клетками в МОО. При РМЖ их больше, чем CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток, влияние которых на эффективность иммунотерапии считается первостепенным [90].

С одной стороны, на эффект иммунотерапии может повлиять макрофагальный состав МОО до ее начала. Например, терапия анти-PD-1/PD-L1 может оказаться недостаточной для реактивации опухолеспецифических Т-клеток из-за сильных эффектов иммуносупрессивных факторов, экспрессируемых макрофагами [41]. При плоскоклеточном раке лёгкого показано, что макрофаги в опухолевой строме устанавливают продолжительные контакты с CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами [131]. Было выявлено, что истощение макрофагов посредством ингибирования рецептора колониестимулирующего фактора-1 (CSF-1R), сопровождающееся нарушением их взаимодействия с CD8<sup>+</sup> Т-клетками, в сочетании с терапией анти-PD-1 у экспериментальных животных усиливает миграцию и инфильтрацию CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в опухолевую ткань [131]. Показано, что активация IL1R2 с помощью IL1 $\beta$ , полученного из макрофагов, стимулирует экспрессию PD-L1, а блокада IL1R2 приводит к повышению эффективности анти-PD-1 иммунотерапии при трижды негативном РМЖ [173]. Макрофаги TREM2<sup>+</sup> при РМЖ проявляют иммуносупрессивные свойства, коррелируют с плохим прогнозом и способствуют истощению Т-клеток, связанному с резистентностью к анти-PD-1/PD-L1 иммунотерапии [14, 120]. M2-ассоциированные макрофаги, секретируя гранулин, способствуют истощению CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток, снижая результативность иммунотерапии, тогда как макрофаги фенотипа M1, напротив, способствуют восстановлению миграции и инфильтрации CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в опухолевую ткань [135]. Кроме того, было

показано, что количество CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-клеток в пределах 20 мкм (такое расстояние между ядрами клеток указывает на большую вероятность их контакта) от PD-L1<sup>+</sup> макрофагов в МОО было значительно выше, чем PD-L1<sup>-</sup> макрофагов [168]. Однако, согласно одним представлениям, наличие контактов PD-1<sup>+</sup> и PD-L1<sup>+</sup> клеток в МОО связано с хорошим ответом на иммунотерапию [141], а согласно другим – препятствует эффективности [177].

С другой стороны, применение иммунотерапии влияет на функциональные свойства макрофагов, что приводит к изменению иммунологического ландшафта микроокружения и формирует долгосрочный эффект иммунотерапии. По данным single-cell секвенирования транскриптома клеток микроокружения опухоли пациенток с РМЖ, изменения в ответ на применение анти-PD-1 иммунотерапии очень неоднородны [11]. Тем не менее, понимание роли различных популяций макрофагов МОО в эффективности анти-PD-1/PD-L1 иммунотерапии РМЖ фрагментарно.

### **1.7 Макрофагальные предикторы эффективности иммунотерапии при раке молочной железы**

С исходом иммунотерапии может быть ассоциирована экспрессия тех или иных функциональных молекул макрофагов. Среди пациентов с трижды негативным РМЖ, получавших атезолизумаб и паклитаксел, не ответивших на терапию, до начала терапии наблюдалось большее количество CD68<sup>+</sup> макрофагов в микроокружении опухоли по сравнению с ответившими. Макрофаги у пациентов, не ответивших на иммунотерапию, имели высокую экспрессию генов *SPP1*, *TREM2*, *FN1* и *C3*, в то время как макрофаги у ответивших гиперэкспрессировали *CXCL9*, *MMP9* и *PLA2G2D* [180].

В другом исследовании, для построения RiskScores использовались три гена (*LAMP3*, *GZMB* и *CXCL13*), связанные с соотношением макрофагов

M1/M2. Модель RiskScore эффективно стратифицировала пациентов с трижды негативным РМЖ на основе риска смертности. Анализ обогащения набора генов (GSEA) связал RiskScore с несколькими важными путями, включая восстановление ошибочных спариваний, передачу сигналов JAK/STAT3, передачу сигналов VEGF, презентацию процессинга антигена, передачу сигналов ERBB и передачу сигналов P53. В исследовании также прогнозировалась чувствительность пациентов к иммунотерапии с использованием шкалы риска [105].

Помимо того, экспрессия ряда генов, связанных с функционалом макрофагов в опухоли, ассоциирована с высокой и низкой вероятностью ответа на иммунотерапию. Оценка уровня экспрессии генов *CXCL13*, *KLHDC7B*, *STC2*, *APOD* и *CACNG4* позволяет разделить пациентов с РМЖ на группы риска. Для пациентов с РМЖ из группы низкого риска была характерна более длительная безрецидивная выживаемость, более высокий балл IPS (immunophenoscore, инструмент для прогнозирования ответа на анти-CTLA-4 и анти-PD-1 иммунотерапию) и более высокая экспрессия генов, связанных с презентацией антигена и иммунными контрольными точками, чем для пациентов с РМЖ из группы высокого риска. Проверка способности данной модели оценки риска прогнозировать эффективность иммунотерапии была проведена на когорте iMvigor210, в которую входили пациенты с метастатическим уротелиальным раком, получавшие анти-PD-L1 иммунотерапию. В когорте iMvigor210 группа низкого риска продемонстрировала более высокий уровень объективного ответа (CR/PR), чем группа высокого риска (30 % против 15 %). Это предполагает, что группа низкого риска демонстрирует более иммуногенный фенотип, что подразумевает потенциальную пользу иммунотерапии у пациентов с РМЖ с низким риском [29].

**Закключение по обзору литературы.** Макрофаги являются одной из ключевых популяций клеток в МОО при РМЖ, составляя до 50 % всех клеток стромы. К настоящему времени накоплен большой пласт информации о роли и функциях этих клеток в микроокружении опухоли при РМЖ. Известно, что они обладают высокой пластичностью и могут выполнять как про-, так и противоопухолевые функции в зависимости от их фенотипа. Классическая дихотомия M1/M2 макрофагов, хотя и остается полезной для понимания их роли в опухолевом процессе, не отражает всего многообразия их функций и взаимодействий в микроокружении опухоли. Современные исследования, основанные на технологиях секвенирования единичных клеток и пространственной транскриптомики, выявили множество субпопуляций макрофагов, каждая из которых обладает уникальными функциональными характеристиками и локализацией в опухоли. Однако, несмотря на значительный прогресс в понимании роли макрофагов, до сих пор не существует четких критериев, позволяющих использовать их функциональные характеристики в качестве прогностических маркеров для клинической практики.

Иммунная контрольная точка PD-1/PD-L1 является одним из ключевых механизмов уклонения опухоли от иммунного надзора, однако роль макрофагов, экспрессирующих PD-1 и PD-L1 в микроокружении рака молочной железы (РМЖ), остаётся недостаточно определённой и противоречивой. Для больных трижды негативным РМЖ с PD-L1-позитивным статусом характерно агрессивное течение заболевания, при котором значимую роль играют характеристики опухолевого микроокружения: клеточный состав, профиль секретируемых цитокинов и межклеточные взаимодействия.

До настоящего времени не достаточно изучено, каким образом различаются количественные и функциональные характеристики макрофагов в микроокружении опухоли у пациенток с различным PD-L1-статусом при

трижды негативном РМЖ. Известно, что PD-L1-позитивные макрофаги могут выступать прямой мишенью для иммунотерапии, однако их иммуносупрессивные свойства способны ограничивать эффективность лечения. В то же время функциональная перестройка макрофагов под воздействием ингибиторов PD-1/PD-L1 может способствовать формированию длительного противоопухолевого иммунного ответа.

Понимание роли отдельных популяций макрофагов в эффективности иммунотерапии остаётся фрагментарным. Кроме того, недостаточно изучены физические взаимодействия макрофагов с другими иммунными клетками в опухоли, что может иметь принципиальное значение для объяснения механизмов иммуносупрессии и разработки новых терапевтических стратегий.

Таким образом, остается актуальным исследование роли макрофагов в микроокружении опухоли при РМЖ, особенно в контексте их участия в функционировании иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 и влияния на эффективность иммунотерапии. Расширение знаний о функциональной активности макрофагов и их роли в регуляции опухолевой прогрессии открывает перспективы для разработки прогностически значимых биомаркеров и внедрения инновационных терапевтических подходов, что может способствовать улучшению клинических исходов у пациенток с раком молочной железы.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материал исследования

Исследование являлось ретроспективным и включало материал 66 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. В исследовании была использована фиксированная формалином залитая в парафин ткань первичной опухоли.

**Общими критериями включения пациентов в исследование являлись:** согласие пациента на участие в исследовании, гистологически верифицированный диагноз инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы, возраст больных старше 18 лет.

**Общими критериями исключения являлись:** возраст больных менее 18 лет, другой гистологический тип рака молочной железы, первично множественные злокачественные опухоли, аутоиммунные и хронические воспалительные заболевания в стадии обострения.

Для определения молекулярно-биологического типа опухоли было проведено иммуногистохимическое окрашивание белков ER, PR, HER2 и Ki67. Рецепторный статус опухоли (экспрессия рецепторов к эстрогену и прогестерону) оценивался по системе Allred [67], оценка HER2-статуса опухоли проводилась в соответствии с критериями ASCO/CAP [70], экспрессия Ki67 – в соответствии с методикой оценки, предложенной International Ki67 in Breast Cancer Working Group [122]. Степень злокачественности опухоли определялась в соответствии с Nottingham combined histologic grade (Elston-Ellis modification of Scarff-Bloom-Richardson grading system) [20]. Стадирование заболевания осуществлялось в соответствии с классификацией TNM 8-го пересмотра,

принятой Союзом по международному противораковому контролю (Union for International Cancer Control, UICC) [22].

Исследование выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Протокол одобрен независимым этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 29 от 23.12.2022). Все пациенты до включения в исследование подписали информированное согласие.

**Группы пациентов.** Для анализа макрофагального состава опухолевого микроокружения, а также оценки ко-локализации клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, использовались образцы опухолевой ткани 39 пациенток с раком молочной железы (стадии  $T_{1-4}N_{0-3}M_0$ ; люминальный А, люминальный В и трижды негативный подтипы). Все материалы были получены до начала терапии (химиотерапии, гормонотерапии или лучевой). Все пациенты получили хирургическое лечение в объеме радикальной мастэктомии или секторальной резекции. Неoadъювантная химиотерапия, а также адъювантная химиотерапия или гормонотерапия проводились пациентам по показаниям. Лечение проводилось в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2010 по 2023 гг.

Клинико-морфологическая характеристика включённых пациенток представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Клинико-морфологические параметры 39 пациентов

| Параметр                      | Значение параметра | %      | n/N   |
|-------------------------------|--------------------|--------|-------|
| Возраст                       | До 50              | 33,33% | 13/39 |
|                               | Старше 50          | 66,67% | 26/39 |
| Менструальная функция         | Сохранена          | 35,90% | 14/39 |
|                               | Менопауза          | 64,10% | 25/39 |
| Молекулярный подтип опухоли   | Люминальный А      | 15,38% | 6/39  |
|                               | Люминальный В      | 41,03% | 16/39 |
|                               | Трижды негативный  | 43,59% | 17/39 |
| Параметр Т                    | T1                 | 25,64% | 10/39 |
|                               | T2                 | 64,10% | 25/39 |
|                               | T3 и T4            | 7,69%  | 3/39  |
|                               | Нет данных         | 2,56%  | 1/39  |
| Стадия                        | I                  | 20,51% | 8/39  |
|                               | IIA                | 51,28% | 20/39 |
|                               | IIB                | 12,82% | 5/39  |
|                               | IIIA и IIIC        | 12,82% | 5/39  |
|                               | Нет данных         | 2,56%  | 1/39  |
| Степень злокачественности     | 1                  | 7,69%  | 3/39  |
|                               | 2                  | 64,10% | 25/39 |
|                               | 3                  | 20,51% | 8/39  |
|                               | Нет данных         | 7,69%  | 3/39  |
| Лимфогенное метастазирование  | Нет                | 64,10% | 25/39 |
|                               | Есть               | 35,90% | 14/39 |
| Гематогенное метастазирование | Нет                | 79,49% | 31/39 |
|                               | Есть               | 20,51% | 8/39  |
| PD-L1 статус при ТНРМЖ        | Позитивный         | 52,94% | 9/17  |
|                               | Негативный         | 47,06% | 8/17  |

Для изучения транскриптомного профиля макрофагов опухолевого микроокружения была взята опухолевая ткань 11 пациентов с РМЖ ( $T_{1-4}N_{0-2}M_0$ , только трижды негативный молекулярно-биологический подтип), полученная до проведения химиотерапевтического лечения. Пациенты проходили лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2019 г. по 2021 г (Таблица 2). Всем пациентам было проведено хирургическое

лечение, а также неoadъювантная или адъювантная химиотерапия по показаниям. Всем 11 пациентам был определен PD-L1 статус.

Таблица 2 – Клинико-морфологические параметры 11 пациентов

| Параметр                      | Значение параметра | %       | n/N  |
|-------------------------------|--------------------|---------|------|
| Возраст                       | До 50              | 63,64 % | 7/11 |
|                               | Старше 50          | 36,36 % | 4/11 |
| Параметр T                    | T1                 | 36,36 % | 4/11 |
|                               | T2                 | 18,18 % | 2/11 |
|                               | T3                 | 18,18 % | 2/11 |
|                               | T4                 | 27,27 % | 3/11 |
| Параметр N                    | N0                 | 63,64 % | 7/11 |
|                               | N1                 | 27,27 % | 3/11 |
|                               | N2                 | 9,09 %  | 1/11 |
| Стадия                        | I                  | 36,36 % | 4/11 |
|                               | IIA                | 18,18 % | 2/11 |
|                               | IIB                | 9,09 %  | 1/11 |
|                               | IIIA               | 9,09 %  | 1/11 |
|                               | IIIB               | 27,27 % | 3/11 |
| Степень злокачественности     | 2                  | 63,64 % | 7/11 |
|                               | 3                  | 36,36 % | 4/11 |
| PD-L1 статус                  | Позитивный         | 45,45 % | 5/11 |
|                               | Негативный         | 54,55 % | 6/11 |
| Лимфогенное метастазирование  | Нет                | 36,36 % | 4/11 |
|                               | Есть               | 63,64 % | 7/11 |
| Гематогенное метастазирование | Нет                | 72,73 % | 8/11 |
|                               | Есть               | 27,27 % | 3/11 |

Для поиска иммунологических маркеров, ассоциированных с длительностью ответа на химиоиммунотерапию, был использован материал 16 пациенток с раком молочной железы ( $T_{1-4}N_{0-3}M_{0-1}$ , трижды негативный молекулярный подтип, PD-L1-позитивный статус), проходивших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, а также в КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» (г. Барнаул), ГБУЗ «Сахалинский областной онкологический диспансер» (г. Южно-Сахалинск) и

ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1» (г. Краснодар) в период с 2009 по 2022 гг.

По показаниям пациенткам была проведена неоадьювантная химиотерапия, после которой выполнен хирургический этап лечения с последующим проведением адьювантной химиотерапии. Схемы и количество курсов химиотерапии варьировали в зависимости от клинических особенностей заболевания с учётом действующих клинических рекомендаций. На этапах динамического наблюдения у всех пациентов возникло прогрессирование заболевания в виде развития отдаленных метастазов. С учетом позитивного PD-L1 статуса опухоли всем пациенткам назначалась комбинированная химиоиммунотерапия с использованием атезолизумаба в сочетании с наб-паклитакселом. Лечение проводилось в соответствии со стандартными схемами: наб-паклитаксел 100 мг/м<sup>2</sup> внутривенно в 1-й, 8-й и 15-й дни цикла + атезолизумаб 840 мг внутривенно в 1-й и 15-й дни каждые 4 недели; либо атезолизумаб 1200 мг внутривенно 1 раз в 3 недели; либо атезолизумаб 1680 мг внутривенно 1 раз в 4 недели [5]. Лечение проводилось до прогрессирования заболевания. Случаев непереносимой токсичности не зарегистрировано. Срок наблюдения за пациентами составил 24 месяца. Химиоиммунотерапию пациенты получали с 2020 по 2022 гг.

Ответ на химиоиммунотерапию был определен согласно критериям оценки ответа солидных опухолей RECIST 1.1 (response evaluation criteria in solid tumours) [45]. Данные критерии выделяют 4 возможных типа ответа на лечение: прогрессирование, частичный ответ, полный ответ и стабилизацию заболевания. Клинически эффективным считали лечение, приводящее к частичному или полному ответу, а также к стабилизации заболевания. Данный подход позволил сформировать 2 группы пациентов: пациенты с длительным ответом на терапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом (период клинической эффективности более 6 месяцев с момента начала

терапии) и пациенты с коротким ответом на терапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом (период клинической эффективности менее 6 месяцев с момента начала терапии).

Таблица 3 – Клинико-морфологические параметры 16 пациентов, получавших химиоиммунотерапию

| Параметр                                  | Значение параметра | %       | n/N   |
|-------------------------------------------|--------------------|---------|-------|
| Возраст                                   | До 50              | 68,75 % | 11/16 |
|                                           | Старше 50          | 31,25 % | 5/16  |
| Неoadъювантная химиотерапия               | Не проводилась     | 25 %    | 4/16  |
|                                           | Проводилась        | 75 %    | 12/16 |
| Параметр Т                                | T1                 | 25 %    | 4/16  |
|                                           | T2                 | 25 %    | 4/16  |
|                                           | T4                 | 50 %    | 8/16  |
| Параметр N                                | N0                 | 31,25 % | 5/16  |
|                                           | N1                 | 31,25 % | 5/16  |
|                                           | N2                 | 18,75 % | 3/16  |
|                                           | N3                 | 18,75 % | 3/16  |
| Параметр M                                | M0                 | 87,5 %  | 14/16 |
|                                           | M1                 | 12,5 %  | 2/16  |
| Стадия                                    | I                  | 18,75 % | 3/16  |
|                                           | IIA                | 6,25 %  | 1/16  |
|                                           | IIB                | 18,75 % | 3/16  |
|                                           | IIIB               | 25 %    | 4/16  |
|                                           | IIIC               | 18,75 % | 3/16  |
|                                           | IV                 | 12,5 %  | 2/16  |
| Степень злокачественности                 | 2                  | 56,25 % | 9/16  |
|                                           | 3                  | 43,75 % | 7/16  |
| Лимфогенное метастазирование              | Нет                | 0       | 0/16  |
|                                           | Есть               | 100 %   | 16/16 |
| Гематогенное метастазирование             | Нет                | 0 %     | 0/16  |
|                                           | Есть               | 100 %   | 16/16 |
| Длительность ответа на химиоиммунотерапию | >6 месяцев         | 37,5 %  | 6/16  |
|                                           | ≤6 месяцев         | 62,5 %  | 10/16 |

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

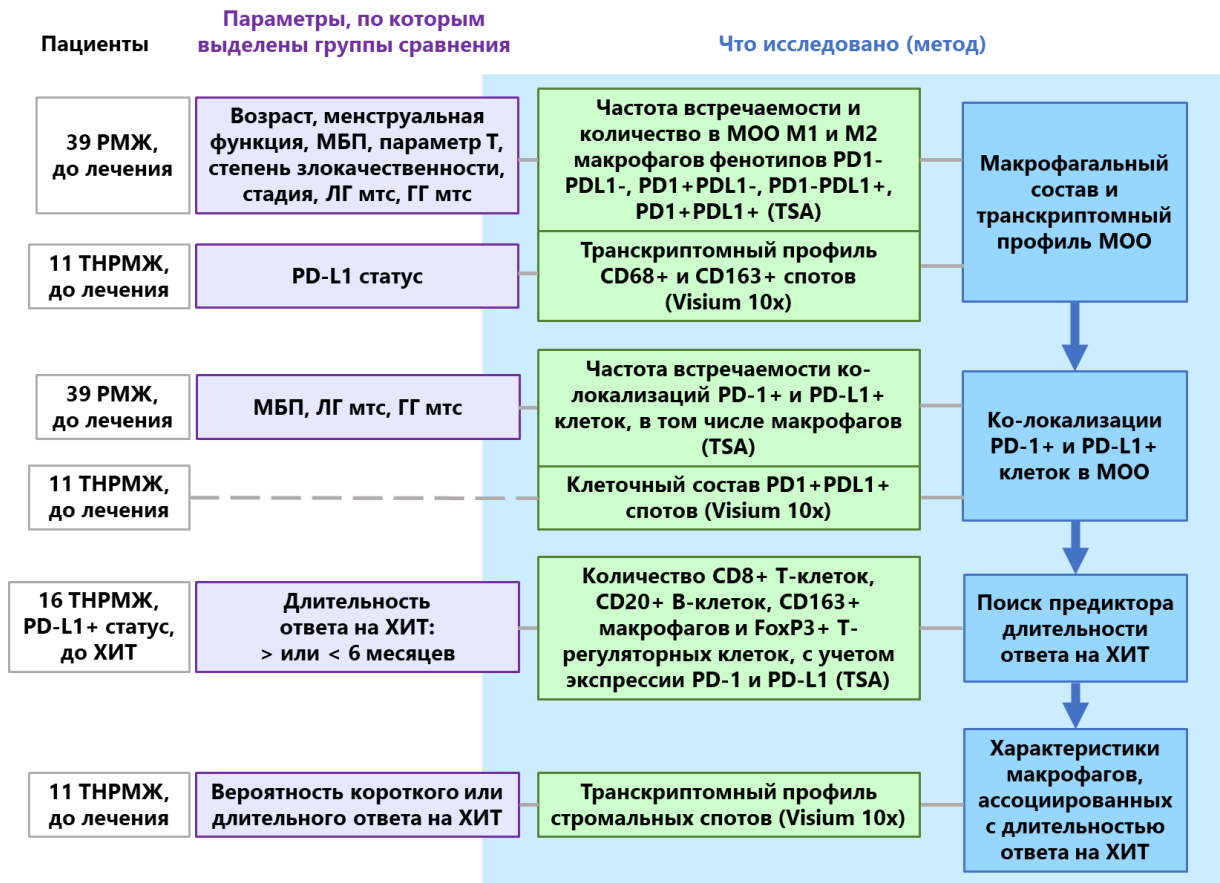


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Примечания: МОО — микроокружение опухоли; РМЖ — рак молочной железы; ТНРМЖ — трижды негативный рак молочной железы; МБП — молекулярно-биологический подтип; ЛГ мтс — лимфогенное метастазирование; ГГ мтс — гематогенное метастазирование; ХИТ — химиоиммунотерапия; TSA — tyramide signal amplification — тирамидная амплификация сигнала.

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Иммуногистохимический анализ

Принцип иммуногистохимического метода основан на специфическом взаимодействии антиген–антитело и используется для выявления экспрессии

целевых белков в тканевых срезах. Для визуализации результата применяются вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP, Horseradish peroxidase), и хромоген — раствор диаминобензидина. В ходе ферментативной реакции HRP диаминобензидин окисляется и приобретает коричневую окраску, что позволяет определить локализацию и интенсивность экспрессии исследуемого белка с использованием светового микроскопа.

**Оценка PD-L1 статуса.** Для определения статуса экспрессии PD-L1 применяли иммуногистохимический метод с использованием тест-системы PD-L1 (SP142) на автоматизированной платформе Ventana Benchmark Ultra (Roche, США). Окрашивание выполняли в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем, с использованием систем визуализации OptiView DAB IHC Detection Kit (Roche, США) и амплификации OptiView Amplification Kit (Roche, США) [163].

Гистологические срезы толщиной 3–4 мкм из фиксированной в формалине и залитой в парафин ткани изготавливали по стандартной методике и наносили на предметные стекла. Иммуногистохимическое окрашивание проводили в автоматическом режиме на платформе Ventana Benchmark Ultra. Протокол включал стадии депарафинизации, кондиционирования клеток (Cell Conditioning 1, 48 мин), блокирования эндогенной пероксидазной активности, инкубации с первичным антителом (VENTANA PD-L1 (SP142)), а также этапы связывания и амплификации: OptiView HQ Linker (8 мин), OptiView HQ Multimer (8 мин), Amplifier, Amplifier H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8 мин), Amplification Multimer (8 мин).

После завершения окрашивания срезы промывали в буферном растворе и проточной воде в течение 10 минут, затем выполняли контрастное окрашивание ядер гематоксилином Майера (BioVitrum, Россия) в течение 3 минут. Далее срезы повторно промывали в проточной воде (10 мин), обезвоживали в трёх последовательных порциях 96 % этанола (по 4 мин каждая), просветляли в трёх

порциях ксилола (по 4 мин каждая) и заключали в монтирующую среду Витрогель (BioVitrum, Россия).

Оценку результатов проводили методом световой микроскопии на микроскопе AxioScore A1 (Zeiss, Германия) в соответствии с критериями, указанными в руководстве по интерпретации теста VENTANA PD-L1 (SP142) [4]. Случаи, в которых окрашивание PD-L1 отсутствовало либо выявлялось в иммунных клетках, инфильтрирующих опухоль, но занимало  $<1\%$  площади (включая область опухолевых клеток, интраопухолевую и перитуморальную строму), классифицировали как PD-L1-негативные. При выявлении окрашивания иммунных клеток, покрывающего  $\geq 1\%$  площади опухоли, статус определяли как PD-L1-позитивный.

**Идентификация CD163-позитивных макрофагов.** С целью стратификации пациентов по предполагаемой чувствительности к химиоиммунотерапии был проведён иммуногистохимический анализ экспрессии макрофагального рецептора CD163 в образцах опухолевой ткани. Окрашивание выполнялось на автоматическом иммуностейнере Bond RXm (Leica, Германия) с использованием стандартного протокола, включающего депарафинизацию в Bond Dewax Solution, демаскировку антигенов в Bond Retrieval Solution 2 при  $98,5^\circ\text{C}$  в течение 20 минут, а также последующие промывания в Bond Wash Solution (все реагенты – Leica, Германия). После создания гидрофобного барьера вокруг среза, предотвращающего растекание по стеклу нанесенной на срез жидкости, в ручном режиме проводилось блокирование эндогенной пероксидазы с использованием EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako, США), нанесение первичного антитела к CD163 (разведение 1:30; клон 10D6, Diagnostic BioSystems, США), инкубация с полимерной системой визуализации EnVision Flex / HRP (Dako, США) и проявление реакции с диаминобензидином (DAB), приготовленным ex tempore. Контрастное окрашивание ядер осуществлялось гематоксилином Майера

(BioVitrum, Россия). Завершение окрашивания включало этапы обезвоживания в этаноле, просветления в ксилоле и заключения срезов в монтирующую среду Витрогель (BioVitrum, Россия).

Оценка наличия и плотности CD163-позитивных макрофагов проводилась методом световой микроскопии с использованием микроскопа AxioScope A1 (Zeiss, Германия).

### **2.2.2 TSA-модифицированная мультиплексная иммунофлуоресценция**

Метод TSA-модифицированной (Tyramide Signal Amplification) мультиплексной иммунофлуоресценции основан на специфическом связывании антител с целевыми белками в срезах ткани и детекции сигнала флуоресцентной метки. После связывания целевых белков с первичным антителом добавляют вторичные антитела, конъюгированные с полимером HRP. В свою очередь HRP в присутствии низких концентраций  $H_2O_2$  способна преобразовывать меченый флуорофором субстрат тирамида в высокореакционную форму, которая ковалентно связывается с остатками тирозина на целевом белке или рядом с ним. Затем комплекс антител удаляется, а тирамид с флуоресцентной меткой остается связанным с целевым белком, что позволяет провести следующие циклы окрашивания других целевых белков без перекрестной реакции антител. Таким образом, TSA-модифицированная мультиплексная иммунофлуоресценция позволяет обнаруживать до 7 различных белков в одном срезе ткани.

В данном исследовании этот метод использовался для визуализации экспрессии PD-1 и PD-L1 макрофагами опухолевого микроокружения в ткани больных РМЖ, а также для изучения состава иммунных клеток опухолевого микроокружения у больных РМЖ, получавших химиоиммунотерапию.

**Подготовка протокола мультиплексного окрашивания ткани.** Для подготовки протокола мультиплексного иммунофлуоресцентного окрашивания предварительно подбирались оптимальные условия каждого цикла: тип демаскирующего буфера, рабочие разведения первичных антител, а также время инкубации с первичными и вторичными антителами. В результате был сформирован воспроизводимый протокол иммуногистохимического окрашивания, включающий следующие этапы:

1. Из парафиновых блоков, изготовленных после фиксации материала в 10 % нейтральном формалине, по стандартной методике готовились серийные гистологические срезы толщиной 3–4 мкм, которые наносились на предметные стёкла.
2. Подготовка срезов к окрашиванию проводилась на автоматическом иммуностейнере Bond RXm (Leica, Германия) в соответствии со стандартным протоколом Bond. Этапы включали: депарафинизацию в Bond Dewax Solution, обработку 96 % этанолом, промывку в Bond Wash Solution, демаскировку антигенов в Bond Retrieval Solution 1 или Bond Retrieval Solution 2 при 98,5° С в течение 20 минут, последующую промывку в Bond Wash Solution (все реагенты — Leica, Германия).
3. Срезы обводились гидрофобным маркером. Для блокирования активности эндогенной пероксидазы вручную наносился EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (ready-to-use, Dako, США) на 10 минут, после чего выполнялась промывка в PBS-буфере в течение 5 минут.
4. На срезы наносились первичные антитела в рабочих разведениях согласно инструкциям производителей:
  - анти-CD163 (1:30, клон 10D6, Diagnostic BioSystems, США),
  - анти-CD20 (1:200, клон L26, Leica, США),
  - анти-CD3 (ready-to-use, polyclonal, Dako, США),
  - анти-CD68 (ready-to-use, клон KP1, Dako, США),

- анти-CD8 (ready-to-use, клон C8/144B, Dako, США),
- анти-FoxP3 (1:100, клон 236A/E7, Invitrogen, США),
- анти-pan-cytokeratin (ready-to-use, клон AE1/AE3, Dako, США),
- анти-PD-1 (ready-to-use, клон NAT105, Cell Marque, США),
- анти-PD-L1 (ready-to-use, клон SP142, Ventana, США).

Инкубация срезов с первичными антителами проводилась в течение 25 минут при температуре 25° С, затем выполнялись две промывки в PBS по 5 минут каждая.

5. Для визуализации использовалась универсальная полимерная система EnVision Flex/HRP (ready-to-use, Dako, США), содержащая вторичные антитела (анти-мышь и анти-кролик). Инкубация проводилась 20 минут при температуре 25° С с последующими двумя промывками в PBS (по 5 минут каждая).
6. Реакцию выявляли с помощью раствора диаминобензидина (DAB), наносимого на срезы на 3–5 минут при 25° С. Рабочий раствор готовился непосредственно перед применением: 1 капля EnVision Flex DAB+ Chromogen (ready-to-use, Dako, США) разводилась в 1 мл EnVision Flex Substrate Buffer (ready-to-use, Dako, США). Для усиления окрашивания срезы дополнительно инкубировались в проточной воде 10 минут.
7. Контрастное окрашивание ядер клеток выполнялось гематоксилином Майера (BioVitrum, Россия) в течение 3 минут.
8. Срезы промывались в воде в течение 10 минут.
9. Обезвоживание проводилось с использованием трёх последовательных порций 96 % этанола, в каждой из которых срезы инкубировались по 4 минуты.
10. Просветление осуществлялось в трёх порциях ксилола, также по 4 минуты в каждой.

11. Окрашенные срезы были заключены в монтирующую среду Витрогель (BioVitrum, Россия).

**Оптимизация и реализация протокола мультиплексного иммуногистохимического окрашивания.** На этапе оптимизации мультиплексного иммуногистохимического протокола была проведена адаптация условий демаскировки антигенов, концентраций первичных антител и временных параметров инкубации с первичными и вторичными антителами. Подбор буферов и условий инкубации выполнялся с использованием автоматического иммуностейнера Bond RXm (Leica, Германия). Были протестированы буферы демаскировки Bond Retrieval Solution 1 и Bond Retrieval Solution 2 (Leica), температурные режимы, а также параметры визуализации с использованием EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent и EnVision Flex / HRP (Dako, США). Для всех антител были определены рабочие разведения и оптимальная продолжительность инкубации (25 минут при 25° C), в том числе для anti-CD3, CD8, CD20, CD68, CD163, FoxP3, pan-cytokeratin, PD-1 и PD-L1.

Валидация флуоресцентного сигнала включала формирование спектральных профилей неокрашенных срезов (для коррекции аутофлуоресценции) и отдельных флуорофоров Opal (520–690) и DAPI с использованием программного обеспечения inForm 2.2.1 (PerkinElmer). Проводилось моноплексное окрашивание с определением оптимальных параметров TSA-модифицированной флуоресценции, а также конфигурации панелей с учётом экспрессии целевых маркёров и свойств флуорофоров.

Для мультиплексного окрашивания использовалась система Opal 7-color Kit (Akoya Biosciences, США), обеспечивающая циклическую визуализацию с ремаскировкой между циклами. Исследуемым материалом являлись парафиновые блоки опухолевой ткани:

- Панель А – опухоли 39 пациенток с люминальным А, люминальным В и трижды негативным раком молочной железы,
- Панель В – образцы 16 пациенток с метастатическим или прогрессирующим трижды негативным раком молочной железы, получавших химиоиммунотерапию и имеющих PD-L1-позитивный статус.

Для панели А была разработана конфигурация маркёров: PD-1 (Opal520), CD68 (Opal540), PD-L1 (Opal570), CD3 (Opal620), CD163 (Opal650), panCK (Opal690). Для панели В: CD8 (Opal520), PD-1 (Opal540), CD20 (Opal570), CD163 (Opal620), PD-L1 (Opal650), FoxP3 (Opal690). Характеристики антител и флуорофоров представлены в таблице 4.

Каждый цикл включал нанесение первичного антитела, инкубацию с полимерной системой HRP и отложенной TSA-визуализацией соответствующим флуорофором Opal, разведённым 1:400. Между циклами проводилась демаскировка в Bond Retrieval Solution с повторной отмывкой. По завершении последнего цикла окрашивания ядер осуществлялось ручную с использованием Fluoroshield™ with DAPI (Sigma-Aldrich, США).

Таблица 4 – Используемые антитела и флуорофоры

| № | Маркёр | Клон / тип антитела      | Производитель               | Разведение | Opal-флуорофор | Панель |
|---|--------|--------------------------|-----------------------------|------------|----------------|--------|
| 1 | PD-1   | NAT105, mouse monoclonal | Cell Marque (США)           | 1:50       | Opal520        | А, В   |
| 2 | CD68   | KP1, mouse monoclonal    | Dako (США)                  | 1:5        | Opal540        | А      |
| 3 | PD-L1  | SP142, rabbit monoclonal | Ventana (США)               | 1:30       | Opal570        | А, В   |
| 4 | CD3    | Polyclonal, rabbit       | Dako (США)                  | 1:5        | Opal620        | А      |
| 5 | CD163  | 10D6, mouse monoclonal   | Diagnostic BioSystems (США) | 1:150      | Opal650        | А, В   |

*Продолжение таблицы 4*

| № | Маркёр | Клон / тип антитела       | Производитель    | Разведение | Opal-флуорофор | Панель |
|---|--------|---------------------------|------------------|------------|----------------|--------|
| 6 | panCK  | AE1/AE3, mouse monoclonal | Dako (США)       | 1:20       | Opal690        | А      |
| 7 | CD8    | C8/144B, mouse monoclonal | Dako (США)       | 1:10       | Opal520        | В      |
| 8 | CD20   | L26, mouse monoclonal     | Leica (США)      | 1:600      | Opal570        | В      |
| 9 | FoxP3  | 236A/E7, mouse monoclonal | Invitrogen (США) | 1:800      | Opal690        | В      |

**Анализ изображений.** Для выполнения мультиплексного анализа использовали систему визуализации Vectra 3.0 (Akoya Biosciences, США). Полученные изображения с многоканальным окрашиванием подвергались спектральному разделению и последующей обработке в специализированном программном обеспечении inForm 2.2.1 (Akoya Biosciences, США). При этом учитывались спектральные библиотеки, сформированные для каждого антитело–Opal комплекса, что обеспечивало корректную интерпретацию сигналов. Первичное обучение алгоритмов проводилось на наборе из 15–25 репрезентативных изображений ткани. Для этих изображений вручную создавалась эталонная (референсная) сегментация, на основании которой программное обеспечение обучалось автоматически выделять следующие области: опухолевые клетки, стромальный компонент и пустые участки, не содержащие ткани. Настройки, оптимизированные на обучающем наборе, применялись для дальнейшей автоматизированной обработки всех полученных изображений исследованных тканевых образцов. Наряду с сегментацией тканей выполнялась сегментация клеток с разделением каждой клетки на ядро, цитоплазму и мембрану. Для каждого маркера индивидуально определялся порог интенсивности флуоресценции, после чего программой производился

автоматический подсчёт клеток с экспрессией данного маркера. Из анализа исключались области с искусственным окрашиванием, с недостаточным качеством изображения, а также зоны некроза.

**Подсчет клеток.** Подсчет клеток в опухолевом микроокружении в ткани, окрашенной в соответствии с панелью А осуществлялся следующим образом: фенотип M1 макрофагов определялся как CD68+CD163–CD3–panCK–, M2 макрофагов – как CD68+/-CD163+CD3–panCK–, лимфоцитов – как CD68–CD163–CD3+panCK–, опухолевых клеток – как CD68–CD163–CD3–panCK+. На макрофагах была оценена экспрессия PD-1 и PD-L1 и выделено восемь фенотипов: PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1, PD1+PDL1+ M1, PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2, PD1+PDL1+ M2. В 4-5 полях зрения подсчитывали абсолютное количество макрофагов каждого из изучаемых фенотипов, а также лимфоцитов, располагающихся в строме и среди опухолевых клеток. Относительные количества макрофагов и лимфоцитов подсчитаны как проценты от суммы всех клеток стромы. Относительные количества M1 и M2 макрофагов приведены в виде процентов от суммы всех макрофагов стромы. Для оценки макрофагальной формулы микроокружения каждый из фенотипов макрофагов был представлен как процент от суммы M1 или M2 макрофагов.

Подсчет клеток в опухолевом микроокружении в ткани, окрашенной в соответствии с панелью В осуществлялся следующим образом: исходя из панели используемых маркеров, в опухолевом микроокружении идентифицированы CD8+ цитотоксические лимфоциты, CD20+ В-лимфоциты, CD163+ макрофаги и FoxP3+ Т-регуляторные лимфоциты и оценена экспрессия ими PD-1 и PD-L1. Доля клеток рассчитывалась в процентах от числа всех клеток стромы опухоли.

### 2.2.3 Пространственный анализ транскриптома Visium 10x

Visium 10x – это технология пространственного профилирования транскриптома на основе секвенирования. Для проведения этого анализа используется ткань, размещенная на стекле Visium и окрашенная гематоксилином и эозином для визуализации. На ткань наносятся зонды, специфичные к каждой целевой мРНК транскриптома человека. Для каждой мРНК имеется пара специфичных к ней зондов. В ткани происходит гибридизация пары зондов и мРНК, а затем лигирование пар зондов друг с другом под действием лигазы. В результате добавления РНКазы происходит разрушение РНК ткани и высвобождение лигированных пар зондов, которые затем связываются с праймерами, присутствующими на поверхности стекла Visium в области захвата. Стекло Visium включает 4 области захвата, каждая из которых имеет размер 6,5 x 6,5 мм и содержит около 5000 спотов. Каждый спот имеет диаметр 55 мкм и содержит на своей поверхности праймеры, в состав которых входит уникальный 16-нуклеотидный пространственный штрих-код. Таким образом, все зонды, захваченные праймерами, расположенными в пределах одного спота, будут иметь идентичный пространственный штрих-код. Пространственно штрих-кодированные, лигированные производные зондов отделяются от стекла Visium и индексируются индивидуальным для каждого образца индексом. Затем следуют этапы измерения концентрации готовых библиотек и их секвенирования.

Индексы необходимы для идентификации каждого образца, а пространственные штрих-коды используются для связывания прочтений с изображениями срезов ткани и пространственного картирования экспрессии мРНК. Результирующие данные представляют собой количественные значения экспрессии мРНК для каждого пространственного спота. Транскриптомные данные, подвергнутые биоинформатической обработке, сопоставляются с

изображением окрашенной ткани, что позволяет определить особенности экспрессии мРНК в конкретных локусах ткани.

**Протокол подготовки материала для пространственного анализа транскриптома Visium 10x.** Материалом исследования являлась фиксированная формалином залитая в парафин ткань первичной опухоли 11 пациентов с раком молочной железы трижды негативного молекулярно-биологического подтипа, полученная на этапе взятия биопсии или на хирургическом этапе лечения. Для исследования были взяты 2 стекла Visium, которые имели, в общей сложности, 8 областей захвата. В пяти из них была размещена ткань пяти пациентов, в трех – ткань шести пациентов. Подготовка материала проводилась в соответствии с рекомендациями 10x Genomics и включала подготовку ткани, депарафинизацию, окрашивание гематоксилином и эозином, визуализацию, декросслинking, создание библиотек и оценку их качества и секвенирование. Затем проводился биоинформатический анализ полученного материала.

### ***I. Подготовка ткани.***

До начала подготовки срезов ткани проводилась оценка качества РНК в выбранных образцах ткани. Для этого срезы толщиной 10 мкм собирали в пробирки и обрабатывали набором PureLink FFPE RNA Isolation Kit (Invitrogen, США) согласно инструкции. Средний размер фрагментов РНК и долю молекул >200 нуклеотидов определяли с помощью высокочувствительной РНК ScreenTape на системе 4150 TapeStation (Agilent, США). Для дальнейшего анализа отбирали образцы, в которых не менее 50 % общего числа фрагментов молекул РНК имело размер более 200 нуклеотидов.

Затем изготавливали парафиновые срезы и помещали их на стекла Visium Spatial Gene Expression Slide (10x Genomics, США), располагая каждый образец строго в пределах зоны захвата (6,5 × 6,5 мм). Стекла оставляли для высыхания на ночь при комнатной температуре.

## ***II. Депарафинизация, окрашивание гематоксилином и эозином, визуализация, декросслинking.***

Тканевые образцы последовательно обрабатывали: проводили депарафинизацию путём инкубации при 60° С в течение 2 часов с последующей обработкой в ксилоле (2×10 мин), этаноле градиентной концентрации (100% – 3×3 мин, 96 % – 2×3 мин, 85 % и 70 % – по 3 мин) и ополаскиванием в воде Milli-Q nuclease-free.

Для окрашивания на срезы наносили гематоксилин (3 мин), обрабатывали Blueing Buffer (1 мин), затем эозином (1 мин) с промежуточными промывками водой. После окрашивания срезы покрывали 85 % глицерином, до высыхания фотографировали с помощью системы Aperio (Leica, Германия), а затем быстро удаляли покровные стёкла промывкой в воде Milli-Q nuclease-free с последующей сушкой при 37° С (3 мин).

Декросслинking проводили в Visium Cassette, последовательно обрабатывая срезы 0,1 N HCl (по 100 мкл на лунку, 3×1 мин) и TE-буфером (pH 9, по 150 мкл на лунку, дважды) с финальной инкубацией при 70° С в течение 60 минут.

## ***III. Создание библиотек и оценка их качества.***

**1. Гибридизация зондов.** Подготовили Pre-hybridization Mix (из расчета на два стекла, 8 зон захвата – 783,2 мкл воды, 88 мкл 10X PBS, 4,4 мкл разведённого Perm Enzyme B, 4,4 мкл Tween-20) и Probe Hybridization Mix (из расчета на два стекла, 8 зон захвата – 88 мкл воды, 616 мкл FFPE Hyb Buffer, по 88 мкл Human WT Probes RHS/LHS). Внесли по 100 мкл Pre-hybridization Mix в каждую лунку, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, затем заменили на Probe Hybridization Mix и провели гибридизацию при 50° С в течение 16-24 часов.

**2. Лигирование зондов.** После гибридизации провели серию отмывок: трижды FFPE Post-Hyb Wash Buffer (по 150 мкл, 50° С, 5 мин), 2X SSC (по 150

мкл, комнатная температура, 3 мин). Добавили по 60 мкл Probe Ligation Mix в каждую лунку (подготовленного из расчета на два стекла, 8 зон захвата – 211,2 мкл воды, 264 мкл 2X Ligation Buffer, 52,8 мкл Ligation Enzyme), инкубировали при 37° С в течение 1 часа. Затем выполнили две отмывки Post Ligation Wash Buffer (по 100 мкл, 57°С, 5 мин) и две отмывки 2X SSC.

**3. Расщепление РНК и высвобождение зондов.** Обработали срезы РНКазной смесью (из расчета на два стекла, 8 зон захвата – 290,4 мкл воды, 330 мкл 2X RNase Buffer, 39,6 мкл RNase Enzyme), по 75 мкл, при 37° С 30 мин, затем Permeabilization Mix (из расчета на два стекла, 8 зон захвата – 618,8 мкл Perm Buffer B, 41,2 мкл Perm Enzyme B), по 75 мкл, при 37° С 40 мин. Завершили двумя отмывками 2X SSC (по 175 мкл в каждую лунку).

**4. Удлинение зондов за счет соединения с праймерами, расположенными в зоне захвата на стекле Visium.** Добавили в каждую лунку по 75 мкл Probe Extension Mix (подготовленного из расчета на два стекла, 8 зон захвата – 646,8 мкл Extension Buffer, 13,2 мкл Extension Enzyme), инкубировали при 45°С 15 мин.

**5. Отмывка зондов.** Провели отмывку в 2X SSC буфере, обработали срезы 0,08 М КОН (по 40 мкл в каждую лунку, комнатная температура, 10 мин), перенесли продукты в стрип-пробирки, добавили по 5 мкл 1М Tris-HCl (pH 7) в каждую пробирку, поместили пробирки на лед.

**6. Проведение qPCR для определения числа циклов (Cq).** Приготовили qPCR Mix (из расчета на два стекла, 8 зон захвата, и один негативный контроль – 39,6 мкл воды, 49,5 мкл KAPA SYBR FAST, 9,9 мкл TS Primer Mix). В лунки планшета внесли по 9 мкл qPCR Mix, по 1 мкл образцов и 1 мкл воды в лунку негативного контроля, поместили планшет в термоциклер и запустили программу (шаг 1 – 98° С, 3 мин; шаг 2 – 98° С, 5 сек; шаг 3 – 63° С, 30 сек; шаг 4 – считать сигнал; шаги 2-4 повторить еще 24 раза, всего 25 циклов). Определили Cq-значение с порогом детекции 25 % от пика флуоресценции.

**7. Индексирование образцов.** Выбрали для каждого образца индивидуальные индексы, которые необходимы для того, чтобы избежать перекрытия образцов в ходе секвенирования. Добавили по 50 мкл Amp Mix в каждую пробирку с образцом, а затем – по 5 мкл Dual Index TS Set A. Затем инкубировали образцы в термоциклере (шаг 1 – 98°C, 1 мин; шаг 2 – 98°C, 15 сек; шаг 3 – 63°C, 20 сек; шаг 4 – 72°C, 30 сек; шаг 5 – повтор шагов 2-4; шаг 6 – 72°C, шаг 7 – 4°C). Количество повторений шагов 2-4 должно соответствовало значению  $C_q+2$ , округленному до целых.

**8. Очистка образцов – SPRIselect.** Добавили по 85 мкл SPRIselect, инкубировали 5 мин. После магнитной очистки промыли 80 % этанолом (2×200 мкл). Добавили по 25,5 мкл EB-буфера, перенесли в новые пробирки.

**9. Контроль качества готовых библиотек.** Концентрация библиотек, измеренная с помощью набора dsDNA High-Sensitivity Kit на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США), варьировалась от 0,717 до 7,9 нг/мкл. Качество библиотек оценивали с помощью высокочувствительного сканера D1000 ScreenTape на 4150 TapeStation. Размер пика варьировался от 251 до 261 п.н. (Agilent, США).

#### **IV. Секвенирование.**

Библиотеки загружали в концентрации 1,8 пМ и секвенировали на системе NextSeq 500 (Illumina, США) с использованием парных конечных считываний по 150 п.н. в соответствии со следующим протоколом считывания: считывание 1, 28 циклов; считывание индекса i7, 10 циклов; считывание индекса i5, 10 циклов; считывание 2, 50 циклов. Медианная глубина секвенирования составила 28153 пары считываний на спот. Данные секвенирования доступны базе Gene Expression Omnibus NCBI, номер GEO GSE242311 [59].

## 2.2.4 Биоинформатический анализ

Первичная обработка данных в формате FASTQ выполнялась с помощью программы Space Ranger 1.3.1 (10x Genomics, США) со стандартными параметрами. Прочтения выравнивались на референсный геном человека (GRCh38). Для последующей ручной аннотации срезы объединяли с использованием функции «Spaceranger Aggr».

Ручная аннотация срезов проводилась с использованием программного обеспечения Loupe Browser 8.0.0 (10x Genomics, США). Этот этап включал в себя выделение двух групп стромальных спотов: первая включала споты с экспрессией гена *CD68*, а вторая споты с экспрессией гена *CD163*, а также спотов с ко-экспрессией *PD-1 (PDCD1)* и *PD-L1 (CD274)*.

Дальнейший анализ выполнялся в среде R с использованием пакета Seurat 5.0.0 [69]. Данные каждого образца преобразовывали в Seurat Object с помощью функции `Load10X_Spatial`. Предварительная фильтрация включала отбор спотов с `nCount_Spatial > 200` и `nFeature_Spatial > 15`, что позволило исключить участки с низким количеством прочтений (<200) и малым числом детектируемых генов (<15). Результаты ручной аннотации были импортированы из Loupe Browser 8.0.0 в виде таблицы и добавлены в раздел метаданных для каждого исследуемого образца.

Нормализация данных проводилась при помощи функции `SCTransform` [66] с параметрами по умолчанию. Анализ главных компонент (PCA) использовался для снижения размерности данных, визуализация клеточных кластеров проводилась при помощи метода UMAP. Интеграция данных 11 срезов опухолевой ткани и коррекция батч-эффекта проводилась с использованием пакета Harmony 0.1.1 [92].

Для поиска дифференциально экспрессированных генов между двумя аннотированными кластерами (позитивный и негативный PD-L1 статус)

использовалась функция «FindAllMarkers», в рамках которой для оценки различий в экспрессии применялся ранговый тест Вилкоксона с поправкой на множественные сравнения. В качестве порога для поиска дифференциально экспрессированных генов использовались показатели  $|LFC| > 0,58$  и скорректированные значения  $p\text{-value (p.adj)} < 0,05$ . Результаты были визуализированы при помощи встроенных в пакет Seurat функций и пакета EnhancedVolcano 1.24.0 [15].

Анализ обогащения по функциональным путям проводился при помощи программного пакета clusterProfiler v4.16.0 с использованием списков генов, ранжированных по уровню экспрессии и скорректированным значениям  $p\text{-value (FDR q-value)}$ , полученными в результате анализа дифференциальной экспрессии. Значимыми считались биологические процессы со значением  $FDR q\text{-value} < 0.05$ .

Для аннотации клеток, входящих в PD1+PDL1+ споты, на основе данных об экспрессии генов (значения  $\log_2 FC$ ) использовался алгоритм CIBERSORTx [31].

### 2.2.5 Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения Prism 8.0.1 (GraphPad, США). Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. Так как большинство исследуемых показателей не соответствовало нормальному закону распределения, количественные данные (процентное содержание иммунных клеток различных фенотипов в опухолевом микроокружении) представляли в виде медианы и межквартильного интервала — Me (Q1–Q3). Для межгрупповых сравнений применяли непараметрические методы статистики. Частотные характеристики (доля иммунных клеток определённого фенотипа) выражали в процентах и относительных величинах (% (n/N)).

В работе использованы следующие методы статистического анализа:

- критерий Манна–Уитни — для сравнения количественных данных в двух независимых группах;
- критерий Краскела–Уоллиса — для сравнения трёх и более независимых групп;
- критерий Вилкоксона — для парных сравнений зависимых выборок;
- точный критерий Фишера и критерий  $\chi^2$  Пирсона — для анализа качественных признаков;
- ROC-анализ — для оценки прогностической значимости количественных параметров;
- простая логистическая регрессия — для построения математической модели вероятности события.

Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## **ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Опухолевое микроокружение представляет собой сложную и гетерогенную систему, свойства которой могут значительно варьировать как в пределах злокачественного новообразования у одного пациента, так и при сравнении между разными больными. Среди многочисленных клеточных популяций, формирующих эту среду, особое место занимают макрофаги – не только как наиболее многочисленная, но и как функционально разнородная группа клеток. Их роль в опухолевой прогрессии не сводится к единому механизму: макрофаги участвуют в лиганд-рецепторных взаимодействиях с иммунными и опухолевыми клетками, в том числе через механизм иммунных контрольных точек, а также оказывают паракринное влияние посредством секреции цитокинов, формируя специфический цитокиновый ландшафт.

Традиционно макрофаги классифицируют на два полярных подтипа – про- (M1) и противовоспалительные (M2) – однако эта упрощенная модель отражает лишь склонность клеток к поддержанию иммунного ответа или иммуносупрессии, а не их полный функциональный спектр. В данном исследовании мы рассматриваем ассоциацию различных функциональных типов макрофагов микроокружения с клинико-морфологическими параметрами РМЖ, прогрессией, PD-L1 статусом и ответом на иммунотерапию.

### **3.1 Макрофагальный состав и транскриптомный профиль микроокружения опухоли у больных раком молочной железы**

Для изучения макрофагального состава была отобрана опухолевая ткань 39 пациентов с РМЖ, фиксированная формалином залитая в парафин. Срезы этой ткани были окрашены методом TSA-модифицированной иммунофлуоресценции (Рисунок 2).

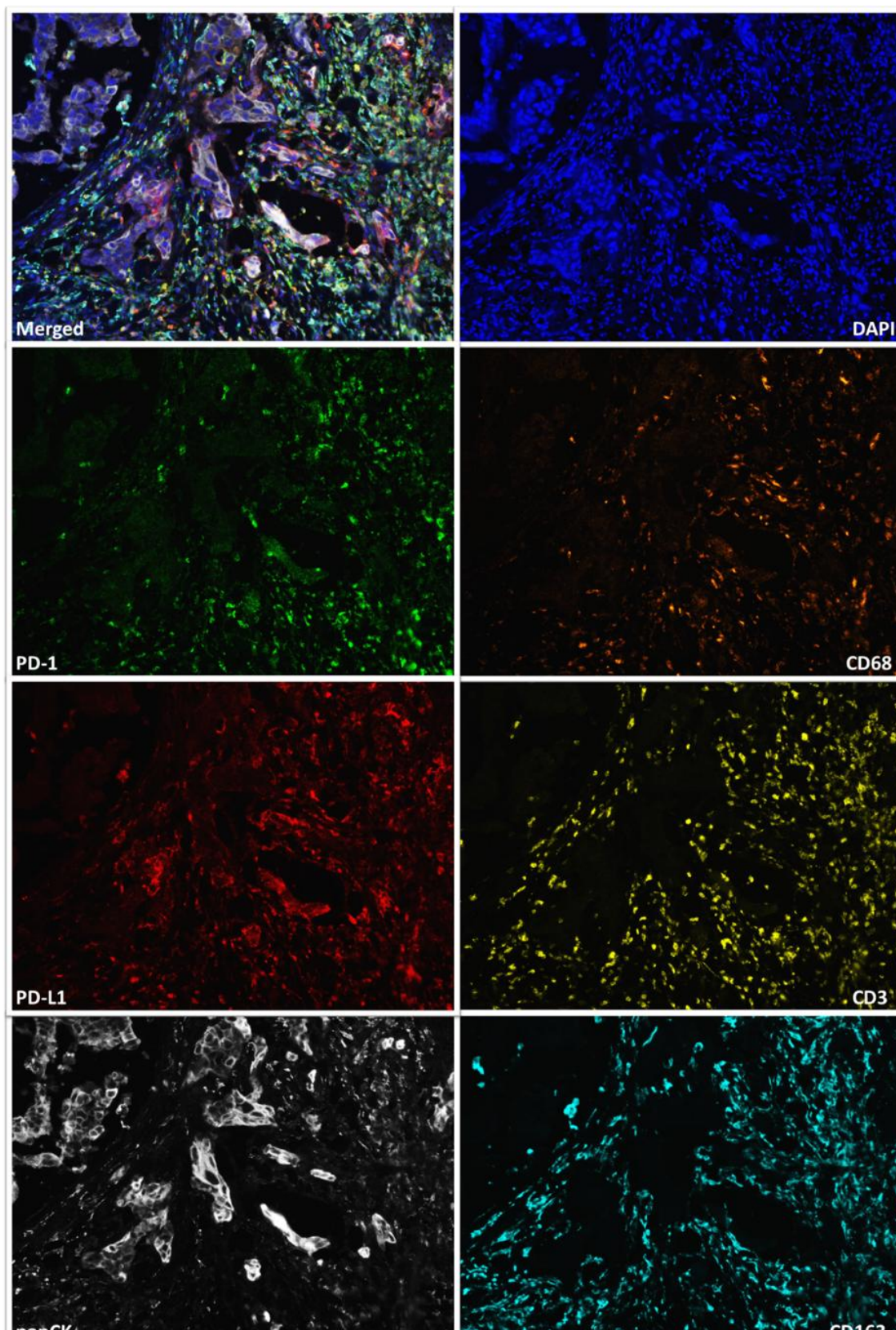


Рисунок 2 – TSA-модифицированная иммунофлуоресценция рака молочной железы, увеличение  $\times 200$

### **3.1.1 Частота встречаемости и количество макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы**

Была оценена доля M1 и M2 макрофагов в микроокружении РМЖ и распределение функциональных типов внутри общей макрофагальной популяции. Функциональные типы M1 и M2 макрофагов были выделены на основе экспрессии ими рецептора или/и лиганда иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1. Предполагается, что экспрессия рецептора PD-1 макрофагов ассоциирована с «истощенным» состоянием, а лиганда PD-L1 – с «истощающим».

Относительное количество макрофагов в микроокружении опухоли от общего количества клеток стромы составило 13,16 (9,95-24,75) %. M2 макрофаги были обнаружены у всех (39/39) включенных в исследование пациентов, а M1 макрофаги – у 94,87 % (37/39). Значительно чаще макрофаги имели фенотип M2 – 10,6 (8,13-12,88) % от всех клеток стромы, а доля M1 составила 1,81 (1,1-3,69) % ( $p < 0,0001$ ).

PD1–PDL1– M2 макрофаги присутствовали в микроокружении опухоли у 100% пациентов, PD1–PDL1– M1 макрофаги – у 94,87 %. PD1+PDL1+ M1 макрофаги обнаруживались чаще, чем PD1+PDL1+ M2 макрофаги. У части пациентов в строме опухоли присутствовали PD1+PDL1– M1 макрофаги и PD1+PDL1– M2 макрофаги, а PD1–PDL1+ M1 и M2 фенотипы присутствовали у большинства пациентов, причём их частота встречаемости не различалась (Таблица 5).

Таблица 5 – Частоты встречаемости макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы (представлены в % (n/N), N=39)

|                |    | Экспрессия PD1/PDL1                                                     |                                                      |                                   |                |
|----------------|----|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------|
|                |    | PD1–PDL1–                                                               | PD1+PDL1–                                            | PD1–PDL1+                         | PD1+PDL1+      |
|                |    | 1                                                                       | 2                                                    | 3                                 | 4              |
| Тип макрофагов | M1 | 94,87% (37/39)<br>$p_{12}<0,0001$<br>$p_{13}=0,6748$<br>$p_{14}=0,0006$ | 46,15% (18/39)<br>$p_{23}<0,0001$<br>$p_{24}=0,2560$ | 89,74% (35/39)<br>$p_{34}=0,0073$ | 61,53% (24/39) |
|                | M2 | 100% (39/39)<br>$p_{12}<0,0001$<br>$p_{13}>0,9999$<br>$p_{14}<0,0001$   | 30,77% (12/39)<br>$p_{23}<0,0001$<br>$p_{24}>0,9999$ | 100% (39/39)<br>$p_{34}<0,0001$   | 30,77% (12/39) |
| $p_{M1-M2}$    |    | 0,4935                                                                  | 0,2444                                               | 0,1153                            | 0,0120         |

В наибольшем количестве среди макрофагов стромы обнаруживались макрофаги с фенотипом PD1–PDL1– M2 макрофаги (69,39 (54,17-80,41) % от общего числа макрофагов стромы) (Таблица 6). Следующим по количеству был фенотип PD1–PDL1+ M2 (12,15 (5,05-20,86) % от общего числа макрофагов стромы), затем фенотипы PD1–PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 (6,7 (5,05-11,5) %, 5,09 (1,79-11,11) % и 1,18 (0-4,63) % от общего числа макрофагов стромы соответственно). В наименьшем количестве встречались макрофаги PD1+PDL1– M1, PD1+PDL1– M2 и PD1+PDL1+ M2 (0 (0-0,48) %, 0 (0-0,3) % и 0 (0-0,31) % от общего числа макрофагов стромы соответственно).

Среди всех макрофагов стромы доля PD1–PDL1+ M2 макрофагов преобладала над долей PD1–PDL1+ M1 макрофагов (12,15 (5,05-20,86) % и 5,09 (1,79-11,11) % соответственно,  $p<0,0001$ ). Доля PD1+PDL1+ M1 макрофагов была выше доли PD1+PDL1+ M2 макрофагов (1,18 (0-4,63) % и 0 (0-0,31) % соответственно,  $p < 0,0001$ ).

Таблица 6 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы (Me (Q1-Q3) % от общего числа макрофагов стромы, N=39)

|                |    | Экспрессия PD1/PDL1                                                          |                                                  |                                       |               |
|----------------|----|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------|
|                |    | PD1–PDL1–                                                                    | PD1+PDL1–                                        | PD1–PDL1+                             | PD1+PDL1+     |
|                |    | 1                                                                            | 2                                                | 3                                     | 4             |
| Тип макрофагов | M1 | 6,7 (5,05-11,5)<br>$p_{12}<0,0001$<br>$p_{13}=0,2874$<br>$p_{14}<0,0001$     | 0 (0-0,48)<br>$p_{23}<0,0001$<br>$p_{24}<0,0001$ | 5,09 (1,79-11,11)<br>$p_{34}<0,0001$  | 1,18 (0-4,63) |
|                | M2 | 69,39 (54,17-80,41)<br>$p_{12}<0,0001$<br>$p_{13}<0,0001$<br>$p_{14}<0,0001$ | 0 (0-0,3)<br>$p_{23}<0,0001$<br>$p_{24}=0,3303$  | 12,15 (5,05-20,86)<br>$p_{34}<0,0001$ | 0 (0-0,31)    |
| $p_{M1-M2}$    |    | $<0,0001$                                                                    | 0,2684                                           | $<0,0001$                             | $<0,0001$     |

Таким образом, результаты анализа макрофагального состава опухолевого микроокружения при РМЖ свидетельствуют о доминировании иммуносупрессивных M2 макрофагов, выявленных у всех пациенток и значительно преобладающих по численности над M1 макрофагами ( $p < 0,0001$ ). Характер распределения подтипов, определённых на основе экспрессии иммунных контрольных точек PD-1 и PD-L1, продемонстрировал выраженное преобладание PD1–PDL1– M2 макрофагов, составляющих основную часть всей макрофагальной популяции. Среди M1 макрофагов наибольшая доля также приходилась на PD1–PDL1– и PD1–PDL1+ фенотипы. Напротив, фенотипы PD1+PDL1+ и PD1+PDL1– выявлялись в минимальном количестве, особенно среди M2-клеток.

Наличие PD-1+ и/или PD-L1+ макрофагов у значительной части пациенток указывает на их потенциальное участие в формировании иммунного истощения в опухолевом микроокружении. Эти данные подтверждают важную роль макрофагов в регуляции противоопухолевого иммунного ответа и подчёркивают перспективность макрофагов с экспрессией PD-1 и PD-L1 как потенциальных мишеней для иммунотерапевтических подходов.

### **3.1.2 Взаимосвязь количества и частоты встречаемости макрофагов в микроокружении опухоли с различными клинико-морфологическими параметрами при раке молочной железы**

На данном этапе исследования нами была изучена взаимосвязь количества и частоты встречаемости макрофагов различных функциональных типов (фенотипов) в микроокружении РМЖ с такими клинико-морфологическими параметрами, как возраст, менструальная функция, молекулярно-биологический подтип новообразования, параметр Т, стадия, степень гистологической злокачественности, лимфогенное метастазирование, гематогенное метастазирование. Фенотипы макрофагов были выделены на основе их принадлежности к М1 (CD68+CD163–) или М2 (CD68+/-CD163+) типу и экспрессии рецептора и лиганда иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1, что позволило провести сравнительный анализ их распределения в зависимости от исследуемых параметров для выявления возможных корреляций с агрессивностью течения заболевания.

Согласно статистическим данным, в 2023 году среди заболевших РМЖ около 80 % человек имели возраст 50 лет и старше [1]. Этот возраст связан с наступлением менопаузы, кроме того, по мере старения происходит накопление соматических мутаций и снижение функции иммунной системы [30]. Возрастными факторами, связанными с прогрессированием опухолей, являются феномены инфламмейджинга (системное хроническое воспаление) и иммуносенесценции (старение иммунной системы с атрофией тимуса, приводящее к снижению количества наивных Т-клеток, снижению функции Т-клеток памяти и ухудшению распознавания антигенов Т-клетками) [52]. Эти факторы, вероятно, влияют на клеточный состав микроокружения у пациентов старшего возраста. В нашем исследовании был сделан акцент на сравнение макрофагальной популяции микроокружения, с учетом экспрессии PD-1 и PD-

L1 ими. Сравнительный анализ частоты встречаемости макрофагов различных фенотипов между группами пациентов младше и старше 50 лет не выявил статистически значимых возраст-зависимых различий (Таблица 7).

Таблица 7 – Частота встречаемости макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от возраста

| Фенотип макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N) |                      | p       |
|--------------------|---------------------------------------|----------------------|---------|
|                    | До 50 лет (N=13)                      | Старше 50 лет (N=26) |         |
| PD1–PDL1– M1       | 100 % (13/13)                         | 92,31 % (24/26)      | 0,5439  |
| PD1+PDL1– M1       | 53,85 % (7/13)                        | 42,31 % (11/26)      | 0,5196  |
| PD1–PDL1+ M1       | 92,31 % (12/13)                       | 88,46 % (23/26)      | >0,9999 |
| PD1+PDL1+ M1       | 53,85 % (7/13)                        | 65,38 % (17/26)      | 0,5084  |
| PD1–PDL1– M2       | 100 % (13/13)                         | 100 % (26/26)        | >0,9999 |
| PD1+PDL1– M2       | 30,77 % (4/13)                        | 30,77 % (8/26)       | >0,9999 |
| PD1–PDL1+ M2       | 100 % (13/13)                         | 100 % (26/26)        | >0,9999 |
| PD1+PDL1+ M2       | 30,77 % (4/13)                        | 30,77 % (8/26)       | >0,9999 |

При сравнении количества макрофагов рассмотренных функциональных фенотипов в зависимости от возраста пациентов статистически значимых различий также не было обнаружено (Таблица 8).

Таблица 8 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от возраста больных

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Ме (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                      | p      |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------|--------|
|                    | До 50 лет (N=13)                                              | Старше 50 лет (N=26) |        |
| Все макрофаги      | 13,75 (11,06-16,43)                                           | 12,24 (8,94-17,61)   | 0,3970 |
| M1 макрофаги       | 1,81 (1,25-4,19)                                              | 1,82 (0,88-3,23)     | 0,3966 |
| M2 макрофаги       | 10,6 (8,66-13,14)                                             | 10,41 (6,68-12,67)   | 0,5815 |
| PD1–PDL1– M1       | 0,95 (0,49-1,65)                                              | 1,04 (0,33-1,51)     | 0,4479 |
| PD1+PDL1– M1       | 0,04 (0-0,3)                                                  | 0 (0-0,06)           | 0,2983 |
| PD1–PDL1+ M1       | 1,03 (0,32-1,36)                                              | 0,6 (0,19-1,06)      | 0,3261 |
| PD1+PDL1+ M1       | 0,1 (0-0,7)                                                   | 0,2 (0-0,54)         | 0,5799 |

Продолжение таблицы 8

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                      | p      |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------|--------|
|                    | До 50 лет (N=13)                                              | Старше 50 лет (N=26) |        |
| PD1–PDL1– M2       | 9,38 (5,82-11,4)                                              | 7,61 (5,25-10,27)    | 0,4566 |
| PD1+PDL1– M2       | 0 (0-0,07)                                                    | 0 (0-0,04)           | 0,8103 |
| PD1–PDL1+ M2       | 1,95 (0,75-2,68)                                              | 1,76 (0,48-3,11)     | 0,7746 |
| PD1+PDL1+ M2       | 0 (0-0,04)                                                    | 0 (0-0,1)            | 0,7725 |

Отсутствие выявленных различий указывает на то, что макрофагальный состав стромы опухоли не ассоциирован с возрастом пациентов. Согласно литературным данным, сравнение клеточных популяций стромы опухоли у взрослых и молодых мышей с трижды негативным РМЖ после терапии выявило существенные различия: у взрослых было меньше CD4 + Т-клеток, В-naïve и NK-клеток и больше В-клеток памяти, фибробласты были более распространены у молодых мышей, в то время как провоспалительные стромальные популяции и миофибробласты были более представлены у взрослых [51]. Анализ транскриптомных данных, проведенный R. Erbe и соавт., показал, что для пациентов с РМЖ характерно значительное увеличение инфильтрации макрофагов M2 с увеличением возраста, но не меняется распространенность инфильтрирующих Т-клеток. Кроме того, они предположили, что ассоциированное с возрастом снижение разнообразия рецепторов Т-клеток может снижать эффективность иммунотерапии [49]. Однако в нашем исследовании мы впервые провели сравнение состава макрофагов, включая их иммуносупрессорные фенотипы, идентифицированные на основе экспрессии белков, в зависимости от возраста пациентов.

Известно, что для молодых пациентов с РМЖ характерно более агрессивное течение заболевания, чем для пациентов старшего возраста [32]. РМЖ характеризуется выраженной гормональной зависимостью: ключевую

роль в прогрессии РМЖ играют эстрогены и прогестерон, воздействующие через соответствующие рецепторы (ER/PR). Снижение уровня эстрогенов и прогестерона в период менопаузы может ассоциироваться с уменьшением митотической активности опухолевых клеток. [73, 119] Эти различия в гормональном фоне у пациентов с менопаузой и сохранной менструальной функцией могут не только влиять на выбор терапии, но и потенциально приводить к изменениям в составе микроокружения опухоли, которые могут коррелировать с ответом на лечение [9]. Проведенное в нашем исследовании сравнение частоты встречаемости макрофагов в группах пациентов с менопаузой и сохранной менструальной функцией статистически значимых различий не показало (Таблица 9).

Таблица 9 – Частота встречаемости макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от менструальной функции

| Фенотип макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N) |                                        | p       |
|--------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|---------|
|                    | Менопауза (N=25)                      | Менструальная функция сохранена (N=14) |         |
| PD1–PDL1– M1       | 92 % (23/25)                          | 100 % (14/14)                          | 0,5277  |
| PD1+PDL1– M1       | 44 % (11/25)                          | 50 % (7/14)                            | 0,7496  |
| PD1–PDL1+ M1       | 88 % (22/25)                          | 92,86 % (13/14)                        | >0,9999 |
| PD1+PDL1+ M1       | 68 % (17/25)                          | 50 % (7/14)                            | 0,3182  |
| PD1–PDL1– M2       | 100 % (25/25)                         | 100 % (14/14)                          | >0,9999 |
| PD1+PDL1– M2       | 32 % (8/25)                           | 28,57 % (4/14)                         | >0,9999 |
| PD1–PDL1+ M2       | 100 % (25/25)                         | 100 % (14/14)                          | >0,9999 |
| PD1+PDL1+ M2       | 32 % (8/25)                           | 28,57 % (4/14)                         | >0,9999 |

Также не было обнаружено статистически значимых различий в количестве макрофагов различных функциональных фенотипов в зависимости от менструальной функции (Таблица 10).

Таблица 10 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от менструальной функции

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                                        | p      |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------|
|                    | Менопауза (N=25)                                              | Менструальная функция сохранена (N=14) |        |
| Все макрофаги      | 11,38 (8,77-16,54)                                            | 14,01 (11,56-18,2)                     | 0,2248 |
| M1 макрофаги       | 1,88 (0,99-3,35)                                              | 1,81 (1,1-4,08)                        | 0,7123 |
| M2 макрофаги       | 10,21 (6,68-12,41)                                            | 11,1 (8,75-14,52)                      | 0,3423 |
| PD1–PDL1– M1       | 1,05 (0,37-1,56)                                              | 0,91 (0,38-1,58)                       | 0,7669 |
| PD1+PDL1– M1       | 0 (0-0,06)                                                    | 0,02 (0-0,21)                          | 0,4629 |
| PD1–PDL1+ M1       | 0,62 (0,18-1,08)                                              | 0,85 (0,32-1,28)                       | 0,4643 |
| PD1+PDL1+ M1       | 0,24 (0-0,58)                                                 | 0,05 (0-0,65)                          | 0,3660 |
| PD1–PDL1– M2       | 7,43 (5,08-9,86)                                              | 9,51 (5,84-12,35)                      | 0,2081 |
| PD1+PDL1– M2       | 0 (0-0,06)                                                    | 0 (0-0,06)                             | 0,6738 |
| PD1–PDL1+ M2       | 1,76 (0,5-3,13)                                               | 1,69 (0,59-2,65)                       | 0,9366 |
| PD1+PDL1+ M2       | 0 (0-0,13)                                                    | 0 (0-0,04)                             | 0,6343 |

Согласно данным, опубликованным L.J. Hodson и соавт., гормоны яичников влияют на фенотип макрофагов в нормальной молочной железе [71]. Это связано, с тем, что иммунные клетки, в том числе макрофаги, могут экспрессировать ядерные рецепторы гормонов [144]. Однако, согласно полученным нами данным, при РМЖ не выявляется связь между макрофагальным составом стромы опухоли и менструальной функцией больных. Исследование изменений состава микроокружения в целом, не только макрофагов, в зависимости от возраста и менструальной функции пациентов имеет важное значение, поскольку эти данные могут быть использованы для персонализации терапии. Но в настоящий момент такие исследования редки.

Затем была изучена взаимосвязь частоты встречаемости макрофагов M1 и M2, экспрессирующих PD-1/PD-L1, с молекулярно-биологическим подтипом опухоли (Таблица 11). Молекулярно-биологический подтип является одним из основных факторов, определяющих стратегию терапии при РМЖ, а клеточный

состав микроокружения влияет на течение заболевания и ответ на лечение. PD1+PDL1– M2 макрофаги встречались чаще у пациентов с трижды негативным РМЖ, чем у пациентов с люминальным РМЖ (у 58,82% (10/17) пациентов с трижды негативным РМЖ и у 9,09% (2/22) пациентов с люминальным РМЖ,  $p=0,0014$ ). Частота встречаемости и количество макрофагов остальных фенотипов в опухолевом микроокружении не были связаны с молекулярно-биологическим подтипом.

Таблица 11 – Частота встречаемости макрофагов в опухолевом микроокружении в зависимости от молекулярно-биологического подтипа рака молочной железы

| Фенотип макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N) |                                 | p             |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------------|
|                    | Люминальные А и В подтипы (N=22)      | Трижды негативный подтип (N=17) |               |
| PD1–PDL1– M1       | 90,91 % (20/22)                       | 100 % (17/17)                   | 0,4953        |
| PD1+PDL1– M1       | 36,36 % (8/22)                        | 58,82 % (10/17)                 | 0,2057        |
| PD1–PDL1+ M1       | 90,91 % (20/22)                       | 88,24 % (15/17)                 | >0,9999       |
| PD1+PDL1+ M1       | 72,72 % (16/22)                       | 47,06 % (8/17)                  | 0,1837        |
| PD1–PDL1– M2       | 100 % (22/22)                         | 100 % (17/17)                   | >0,9999       |
| PD1+PDL1– M2       | 9,09 % (2/22)                         | 58,82 % (10/17)                 | <b>0,0014</b> |
| PD1–PDL1+ M2       | 100 % (22/22)                         | 100 % (17/17)                   | >0,9999       |
| PD1+PDL1+ M2       | 18,18 % (4/22)                        | 47,06 % (8/17)                  | 0,0820        |

PD1+PDL1– M2 макрофаги и PD1+PDL1+ M2 макрофаги обнаруживались малых количествах, однако у пациентов с трижды негативным РМЖ их было больше, чем у пациентов с люминальными формами РМЖ (0,03 (0-0,14) % и 0 (0-0) %; 0 (0-0,25) % и 0 (0-0) % от общего числа клеток стромы соответственно,  $p=0,0007$ ;  $p=0,0335$ ). Также у пациентов с трижды негативным РМЖ в строме опухоли обнаруживалось большее количество M2 макрофагов, однако на уровне тенденции (11,94 (9,65-15,88) % при трижды негативном РМЖ и 9,8 (6,57-11,63) % при люминальных формах,  $p=0,0684$ ) (Таблица 12).

Таблица 12 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от молекулярно-биологического подтипа

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                                 | p             |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------|
|                    | Люминальные А и В подтипы (N=22)                              | Трижды негативный подтип (N=17) |               |
| Все макрофаги      | 11,25 (8,15-16,05)                                            | 13,75 (11,62-20,12)             | 0,1290        |
| M1 макрофаги       | 1,68 (0,85-3,72)                                              | 2,44 (1,28-3,54)                | 0,4280        |
| M2 макрофаги       | 9,8 (6,57-11,63)                                              | 11,94 (9,65-15,88)              | 0,0684        |
| PD1–PDL1– M1       | 0,81 (0,28-1,44)                                              | 1,29 (0,78-1,7)                 | 0,0640        |
| PD1+PDL1– M1       | 0 (0-0,07)                                                    | 0,04 (0-0,09)                   | 0,4398        |
| PD1–PDL1+ M1       | 0,71 (0,35-1,28)                                              | 0,51 (0,17-1,04)                | 0,3956        |
| PD1+PDL1+ M1       | 0,19 (0-0,47)                                                 | 0 (0-0,85)                      | 0,5392        |
| PD1–PDL1– M2       | 7,59 (5,36-9,45)                                              | 9,56 (6,64-13,23)               | 0,1605        |
| PD1+PDL1– M2       | 0 (0-0)                                                       | 0,03 (0-0,14)                   | <b>0,0007</b> |
| PD1–PDL1+ M2       | 1,52 (0,45-2,85)                                              | 1,76 (0,82-3,05)                | 0,4119        |
| PD1+PDL1+ M2       | 0 (0-0)                                                       | 0 (0-0,25)                      | <b>0,0335</b> |

Обнаруженные особенности макрофагальной инфильтрации в зависимости от молекулярно-биологического подтипа указывают на возможность преобладания иммуносупрессивного M2-фенотипа макрофагов при трижды негативном РМЖ, что согласуется с его более агрессивным течением.

Также было проведено сравнение частот встречаемости и количества M1 и M2 макрофагов, экспрессирующих PD-1 или/и PD-L1, у пациентов с различным значением параметра Т (размером опухоли): Т1 (опухоль  $\leq 20$  мм в наибольшем измерении), Т2 (опухоль  $> 20$  мм, но  $\leq 50$  мм в наибольшем измерении), Т3 (опухоль  $> 50$  мм в наибольшем измерении) и Т4 (опухоль любого размера с прямым распространением на грудную стенку и/или кожу). Частота встречаемости макрофагов различных фенотипов не была связана с параметром Т (размером опухоли) (Таблица 13).

Таблица 13 – Частота встречаемости макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от размера первичной опухоли (критерий Т)

| Фенотип макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N) |              |                  | p       |
|--------------------|---------------------------------------|--------------|------------------|---------|
|                    | T1<br>(N=10)                          | T2<br>(N=25) | T3 и T4<br>(N=3) |         |
| PD1–PDL1– M1       | 100% (10/10)                          | 92% (23/25)  | 100% (3/3)       | >0,9999 |
| PD1+PDL1– M1       | 70% (7/10)                            | 40% (10/25)  | 33,33% (1/3)     | 0,2999  |
| PD1–PDL1+ M1       | 100% (10/10)                          | 84% (21/25)  | 100% (3/3)       | 0,5055  |
| PD1+PDL1+ M1       | 90% (9/10)                            | 56% (14/25)  | 33,33% (1/3)     | 0,0940  |
| PD1–PDL1– M2       | 100% (10/10)                          | 100% (25/25) | 100% (3/3)       | >0,9999 |
| PD1+PDL1– M2       | 30% (3/10)                            | 32% (8/25)   | 33,33% (1/3)     | >0,9999 |
| PD1–PDL1+ M2       | 100% (10/10)                          | 100% (25/25) | 100% (3/3)       | >0,9999 |
| PD1+PDL1+ M2       | 40% (4/10)                            | 32% (8/25)   | 0% (0/3)         | 0,5519  |

При сравнении количества макрофагов в строме опухоли у пациентов с различным параметром Т (размером опухоли) было обнаружено, что в случаях с T1 M1 макрофагов в строме больше, чем в случаях с T3 или T4 (3,07 (1,12-5,73) % и 0,7 (0,53-1,76) % соответственно,  $p=0,0490$ ). Кроме того, в случаях с T1, было больше PD1–PDL1+ M1 макрофагов, в сравнении со случаями с T2 и T3 или T4 (0,96 (0,81-2,29) %, 0,51 (0,14-1,18) % и 0,33 (0,2-0,35) % соответственно,  $p_{12}=0,0200$ ,  $p_{13}=0,0105$ ). PD1+PDL1+ M1 макрофагов было больше у пациентов с T1, чем у пациентов с T2 (0,47 (0,15-1,12) % и 0,07 (0-0,51) % соответственно,  $p=0,0329$ ). Количество макрофагов других фенотипов не различалось в зависимости от параметра Т (Таблица 14).

Таблица 14 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от параметра Т (размер первичной опухоли)

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                                      |                    |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
|                    | T1 (N=10)                                                     | T2 (N=25)                            | T3 и T4 (N=3)      |
| Все макрофаги      | 14,51 (9,74-19,05)<br>$p_{12}=0,4342$<br>$p_{13}=0,5734$      | 13,16 (9,67-15,1)<br>$p_{23}=0,7735$ | 10,99 (6,32-18,43) |

Продолжение таблицы 14

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Ме (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы            |                                      |                   |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
|                    | T1 (N=10)                                                                | T2 (N=25)                            | T3 и T4 (N=3)     |
| M1 макрофаги       | 3,07 (1,12-5,73)<br>$p_{12}=0,2224$<br>$p_{13}=\mathbf{0,0490}$          | 1,81 (1,03-3,64)<br>$p_{23}=0,1645$  | 0,7 (0,53-1,76)   |
| M2 макрофаги       | 11,68 (6,57-14,05)<br>$p_{12}=0,7118$<br>$p_{13}=0,8112$                 | 10,6 (8,31-13,08)<br>$p_{23}=0,8339$ | 9,24 (5,62-17,91) |
| PD1-PDL1- M1       | 1,26 (0,38-1,75)<br>$p_{12}=0,6083$<br>$p_{13}=0,2063$                   | 1,02 (0,48-1,47)<br>$p_{23}=0,2427$  | 0,2 (0,2-1,3)     |
| PD1+PDL1- M1       | 0,05 (0-0,1)<br>$p_{12}=0,2377$<br>$p_{13}=0,6154$                       | 0 (0-0,07)<br>$p_{23}=0,8339$        | 0 (0-0,11)        |
| PD1-PDL1+ M1       | 0,96 (0,81-2,29)<br>$p_{12}=\mathbf{0,0200}$<br>$p_{13}=\mathbf{0,0105}$ | 0,51 (0,14-1,18)<br>$p_{23}=0,5119$  | 0,33 (0,2-0,35)   |
| PD1+PDL1+ M1       | 0,47 (0,15-1,12)<br>$p_{12}=\mathbf{0,0329}$<br>$p_{13}=0,1119$          | 0,07 (0-0,51)<br>$p_{23}=0,5308$     | 0 (0-0,29)        |
| PD1-PDL1- M2       | 8,99 (5,35-10,47)<br>$p_{12}=0,9285$<br>$p_{13}=0,9371$                  | 7,78 (5,52-11,24)<br>$p_{23}=0,8889$ | 7,35 (5,42-17,45) |
| PD1+PDL1- M2       | 0 (0-0,03)<br>$p_{12}=0,7059$<br>$p_{13}=0,8741$                         | 0 (0-0,08)<br>$p_{23}=0,8956$        | 0 (0-0,13)        |
| PD1-PDL1+ M2       | 2,39 (1,43-5,18)<br>$p_{12}=0,2397$<br>$p_{13}=0,1119$                   | 1,55 (0,57-2,91)<br>$p_{23}=0,1471$  | 0,46 (0,2-1,76)   |
| PD1+PDL1+ M2       | 0 (0-0,32)<br>$p_{12}=0,4187$<br>$p_{13}=0,4650$                         | 0 (0-0,05)<br>$p_{23}=0,5238$        | 0 (0-0)           |

Таким образом, у пациентов с крупными опухолями иммунный инфильтрат стромы опухоли содержал меньшее количество M1 макрофагов, чем у пациентов с опухолями, соответствующими T1, при этом не было различий в количестве M2 макрофагов. Это может указывать на то, что по мере

роста опухоли макрофагальное звено с противоопухолевой функцией в большей степени подвержено истощению, чем проопухолевые макрофаги.

Также было проведено сравнение макрофагального состава микроокружения в зависимости от стадии. Стадия была определена исходя из значения параметров TNM в соответствии с клиническими рекомендациями. Включенные в исследование пациенты имели стадии I, IА, IВ, IIIА и IIIC. При сравнении частот встречаемости макрофагов различных фенотипов у пациентов в зависимости от стадии статистически значимых различий обнаружено не было (Таблица 15).

Таблица 15 – Частота встречаемости макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от клинической стадии заболевания

| Фенотип макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N) |                   |                  |                          | p       |
|--------------------|---------------------------------------|-------------------|------------------|--------------------------|---------|
|                    | I стадия (N=8)                        | IIА стадия (N=20) | IIВ стадия (N=5) | IIIА и IIIC стадии (N=5) |         |
| PD1–PDL1– M1       | 100% (8/8)                            | 95% (19/20)       | 100% (5/5)       | 80% (4/5)                | 0,5021  |
| PD1+PDL1– M1       | 62,5% (5/8)                           | 50% (10/20)       | 20% (1/5)        | 40% (2/5)                | 0,6040  |
| PD1–PDL1+ M1       | 100% (8/8)                            | 85% (17/20)       | 100% (5/5)       | 80% (4/5)                | 0,6705  |
| PD1+PDL1+ M1       | 87,5% (7/8)                           | 50% (10/20)       | 80% (4/5)        | 60% (3/5)                | 0,2954  |
| PD1–PDL1– M2       | 100% (8/8)                            | 100% (20/20)      | 100% (5/5)       | 100% (5/5)               | >0,9999 |
| PD1+PDL1– M2       | 25% (2/8)                             | 40% (8/20)        | 20% (1/5)        | 20% (1/5)                | 0,7595  |
| PD1–PDL1+ M2       | 100% (8/8)                            | 100% (20/20)      | 100% (5/5)       | 100% (5/5)               | >0,9999 |
| PD1+PDL1+ M2       | 37,5% (3/8)                           | 35% (7/20)        | 40% (2/5)        | 0% (0/5)                 | 0,5295  |

Затем сравнивались количества макрофагов различных функциональных фенотипов в строме опухоли у пациентов с различными стадиями опухолевого роста. PD1–PDL1+ M1 макрофаги обнаруживались у пациентов с I стадией в большем количестве, чем у пациентов с IIА стадией и IIIА/IIIC стадиями (0,96 (0,86-2,08) % от общего числа клеток стромы, 0,51 (0,16-1,17) % и 0,2 (0,06-1,1) % соответственно,  $p = 0,0204$ ,  $p = 0,0295$ ). PD1–PDL1+ M2 макрофагов

было больше у пациентов с I стадией, чем у пациентов с IIA стадией (2,7 (1,8-5,63) % и 1,21 (0,49-2,33) % соответственно,  $p = 0,0487$ ). Количество в строме опухоли макрофагов остальных фенотипов не различалось в зависимости от стадии (Таблица 16).

Таблица 16 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от стадии заболевания

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы               |                                                          |                                        |                          |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|
|                    | I стадия (N=8)                                                              | IIA стадия (N=20)                                        | IIIB стадия (N=5)                      | IIIA и IIIC стадии (N=5) |
| Все макрофаги      | 16,74 (10,2-20,91)<br>$p_{12}=0,1781$<br>$p_{13}=0,9433$<br>$p_{14}=0,1709$ | 13,13 (8,81-14,63)<br>$p_{23}=0,3645$<br>$p_{24}=0,5670$ | 14,65 (10,58-19,47)<br>$p_{34}=0,2222$ | 10,99 (7,83-14,45)       |
| M1 макрофаги       | 3,07 (1,44-5,05)<br>$p_{12}=0,3811$<br>$p_{13}=0,4351$<br>$p_{14}=0,0653$   | 1,85 (1,14-3,89)<br>$p_{23}=0,9215$<br>$p_{24}=0,1324$   | 1,55 (0,95-5,75)<br>$p_{34}=0,5476$    | 0,77 (0,35-2,67)         |
| M2 макрофаги       | 12,06 (7,91-17,22)<br>$p_{12}=0,2217$<br>$p_{13}=0,8329$<br>$p_{14}=0,2844$ | 10,27 (5,82-12,65)<br>$p_{23}=0,5304$<br>$p_{24}>0,9999$ | 10,9 (8,86-15,6)<br>$p_{34}=0,6905$    | 9,34 (7,43-12,27)        |
| PD1–PDL1–M1        | 1,26 (0,38-1,72)<br>$p_{12}=0,9503$<br>$p_{13}=0,4545$<br>$p_{14}=0,1181$   | 1,26 (0,61-1,62)<br>$p_{23}=0,2366$<br>$p_{24}=0,0737$   | 0,82 (0,24-1,31)<br>$p_{34}=0,7302$    | 0,35 (0,1-1,16)          |
| PD1+PDL1–M1        | 0,05 (0-0,11)<br>$p_{12}=0,5017$<br>$p_{13}=0,4071$<br>$p_{14}=0,5470$      | 0,02 (0-0,07)<br>$p_{23}=0,5113$<br>$p_{24}=0,7595$      | 0 (0-0,52)<br>$p_{34}>0,9999$          | 0 (0-0,09)               |
| PD1–PDL1+M1        | 0,96 (0,86-2,08)<br>$p_{12}=0,0204$<br>$p_{13}=0,4351$<br>$p_{14}=0,0295$   | 0,51 (0,16-1,17)<br>$p_{23}=0,2945$<br>$p_{24}=0,4355$   | 0,75 (0,41-2,21)<br>$p_{34}=0,1508$    | 0,2 (0,06-1,1)           |

Продолжение таблицы 16

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Ме (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы                                            |                                                                          |                                              |                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------|
|                    | I стадия (N=8)                                                                                           | IIA стадия (N=20)                                                        | IIIB стадия (N=5)                            | IIIA и IIIC стадии (N=5) |
| PD1+PDL1+ M1       | 0,47 (0,18-0,88)<br>p <sub>12</sub> =0,0629<br>p <sub>13</sub> =0,3737<br>p <sub>14</sub> =0,2611        | 0,03 (0-0,55)<br>p <sub>23</sub> =0,4644<br>p <sub>24</sub> = 0,7971     | 0,1 (0,04-1,91)<br>p <sub>34</sub> =0,9524   | 0,29 (0-0,47)            |
| PD1-PDL1- M2       | 9,36 (5,88-12,13)<br>p <sub>12</sub> =0,6005<br>p <sub>13</sub> =0,8329<br>p <sub>14</sub> =0,6216       | 7,76 (4,19-11,28)<br>p <sub>23</sub> = 0,4876<br>p <sub>24</sub> >0,9999 | 7,92 (6,48-14,48)<br>p <sub>34</sub> =0,6905 | 7,43 (6,39-9,54)         |
| PD1+PDL1- M2       | 0 (0-0,02)<br>p <sub>12</sub> =0,3834<br>p <sub>13</sub> =0,8368<br>p <sub>14</sub> =0,8368              | 0 (0-0,11)<br>p <sub>23</sub> =0,4199<br>p <sub>24</sub> =0,5170         | 0 (0-0,04)<br>p <sub>34</sub> >0,9999        | 0 (0-0,07)               |
| PD1-PDL1+ M2       | 2,7 (1,8-5,63)<br>p <sub>12</sub> = <b>0,0487</b><br>p <sub>13</sub> =0,2844<br>p <sub>14</sub> = 0,2844 | 1,21 (0,49-2,33)<br>p <sub>23</sub> =0,5304<br>p <sub>24</sub> =0,8267   | 1,78 (0,86-2,96)<br>p <sub>34</sub> =0,8413  | 1,76 (0,32-3,48)         |
| PD1+PDL1+ M2       | 0 (0-0,24)<br>p <sub>12</sub> =0,6915<br>p <sub>13</sub> >0,9999<br>p <sub>14</sub> =0,2308              | 0 (0-0,07)<br>p <sub>23</sub> =0,9262<br>p <sub>24</sub> =0,2570         | 0 (0-0,24)<br>p <sub>34</sub> =0,4444        | 0 (0-0)                  |

Учитывая, что стадирование РМЖ включает оценку параметра Т (размера опухоли), выявленные различия в макрофагальном составе между стадиями согласуются с результатами, описанными выше. В частности, у пациентов с I стадией заболевания наблюдалась тенденция к повышенному содержанию в опухолевой строме PD1-PDL1+ M1 макрофагов по сравнению с более поздними стадиями.

Затем было проведено сравнение частот встречаемости макрофагов различных функциональных фенотипов в микроокружении опухоли в

зависимости от степени злокачественности опухоли. Оценка степени злокачественности учитывает способность опухоли к формированию железистых и тубулярных структур, ядерный плеоморфизм и митотическую активность. Было показано, что частоты встречаемости макрофагов в строме не различаются в опухолях с 1, 2 и 3 степенями злокачественности (Таблица 17).

Таблица 17 – Частота встречаемости макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от степени злокачественности

| Фенотип макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N) |                     |                    | p       |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------|--------------------|---------|
|                    | 1 степень<br>(N=3)                    | 2 степень<br>(N=25) | 3 степень<br>(N=8) |         |
| PD1–PDL1– M1       | 100% (3/3)                            | 96% (24/25)         | 100% (8/8)         | >0,9999 |
| PD1+PDL1– M1       | 66,67% (2/3)                          | 44% (11/25)         | 50% (4/8)          | 0,8730  |
| PD1–PDL1+ M1       | 100% (3/3)                            | 92% (23/25)         | 100% (8/8)         | >0,9999 |
| PD1+PDL1+ M1       | 100% (3/3)                            | 60% (15/25)         | 75% (6/8)          | 0,5457  |
| PD1–PDL1– M2       | 100% (3/3)                            | 100% (25/25)        | 100% (8/8)         | >0,9999 |
| PD1+PDL1– M2       | 0% (0/3)                              | 24% (6/25)          | 50% (4/8)          | 0,2741  |
| PD1–PDL1+ M2       | 100% (3/3)                            | 100% (25/25)        | 100% (8/8)         | >0,9999 |
| PD1+PDL1+ M2       | 0% (0/3)                              | 24% (6/25)          | 62,5% (5/8)        | 0,0968  |

Количество PD1–PDL1+ M1 макрофагов в микроокружении было выше у пациентов с опухолями 1 степени злокачественности, чем у пациентов с опухолями 2 степени злокачественности (1,9 (1,04-2,14) % от общего числа клеток стромы и 0,57 (0,24-1,15) % соответственно,  $p = 0,0488$ ). PD1+PDL1+ M2 макрофаги обнаруживались в большем количестве в случаях с 3 степенью злокачественности, чем в случаях с 2 степенью злокачественности (0,15 (0-0,6) % и 0 (0-0,02) %, соответственно,  $p = 0,0129$ ). В остальном, количество макрофагов в микроокружении опухоли не варьировало в зависимости от степени злокачественности опухоли (Таблица 18).

Таблица 18 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от степени гистологической злокачественности

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Ме (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                                       |                     |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
|                    | 1 степень (N=3)                                               | 2 степень (N=25)                      | 3 степень (N=8)     |
| Все макрофаги      | 18,12 (15,56-21,84)<br>$p_{12}=0,0897$<br>$p_{13}=0,1333$     | 11,38 (9,65-16,08)<br>$p_{23}=0,1757$ | 14,25 (13,23-17,69) |
| M1 макрофаги       | 3,8 (3,03-6,53)<br>$p_{12}=0,0751$<br>$p_{13}=0,3758$         | 1,76 (1,08-3,35)<br>$p_{23}=0,3138$   | 2,7 (1,28-4,39)     |
| M2 макрофаги       | 11,76 (11,59-18,81)<br>$p_{12}=0,1917$<br>$p_{13}=0,2788$     | 10,05 (7,19-13,08)<br>$p_{23}=0,4203$ | 11,02 (10,24-12,25) |
| PD1–PDL1– M1       | 1,66 (1,46-2,62)<br>$p_{12}=0,0772$<br>$p_{13}=0,0727$        | 0,87 (0,38-1,55)<br>$p_{23}=0,9099$   | 1,17 (0,39-1,46)    |
| PD1+PDL1– M1       | 0,1 (0-0,98)<br>$p_{12}=0,2534$<br>$p_{13}=0,7879$            | 0 (0-0,06)<br>$p_{23}=0,4321$         | 0,02 (0-0,65)       |
| PD1–PDL1+ M1       | 1,9 (1,04-2,14)<br>$p_{12}=0,0488$<br>$p_{13}=0,2788$         | 0,57 (0,24-1,15)<br>$p_{23}=0,1860$   | 0,87 (0,42-1,94)    |
| PD1+PDL1+ M1       | 0,42 (0,24-0,79)<br>$p_{12}=0,1343$<br>$p_{13}=0,8182$        | 0,1 (0-0,35)<br>$p_{23}=0,0959$       | 0,65 (0,04-1,09)    |
| PD1–PDL1– M2       | 9,64 (9,38-12,96)<br>$p_{12}=0,2509$<br>$p_{13}=0,1939$       | 7,92 (5,82-11,04)<br>$p_{23}=0,8209$  | 7,45 (5,66-10,82)   |
| PD1+PDL1– M2       | 0 (0-0)<br>$p_{12}=0,5769$<br>$p_{13}=0,3212$                 | 0 (0-0,01)<br>$p_{23}=0,1402$         | 0,02 (0-0,13)       |
| PD1–PDL1+ M2       | 2,38 (1,95-5,85)<br>$p_{12}=0,1447$<br>$p_{13}=0,6303$        | 1,26 (0,48-2,68)<br>$p_{23}=0,2364$   | 2,57 (0,91-3,24)    |
| PD1+PDL1+ M2       | 0 (0-0)<br>$p_{12}=0,5769$<br>$p_{13}=0,1697$                 | 0 (0-0,02)<br>$p_{23}=0,0129$         | 0,15 (0-0,6)        |

Хотя и были обнаружены количественные различия, полученные данные не позволяют установить значимую взаимосвязь между особенностями макрофагальной инфильтрации стромы и степенью злокачественности опухоли. В литературе мало данных, которые бы описывали связь степени злокачественности опухоли и состава микроокружения, однако было показано, что при РМЖ наличие интратуморальных пролиферирующих макрофагов связано с высокой степенью злокачественности, и трижды негативным подтипом [25]. Кроме того, в исследовании М Pytlarz и соавт. описан подход к созданию инструмента для классификации глиом, сочетающий определение гистологической характеристики опухоли (степени злокачественности) и состояние микроокружения [133]. Это подчеркивает необходимость дальнейшего изучения взаимодействия опухолевых клеток с иммунным микроокружением для разработки более точных прогностических моделей и персонализированных методов лечения.

В дальнейшем был сопоставлен состав макрофагального инфильтрата у пациентов в зависимости от статуса лимфогенного и гематогенного метастазирования. Считается, что опухоль-ассоциированные макрофаги стимулируют прогрессирование РМЖ, включая рост опухолевых клеток, инвазию и метастазирование, а также вызывают устойчивость к нескольким типам лечения в моделях рака молочной железы. Основные механизмы включают: индукцию и поддержание фенотипа, способствующего развитию опухоли, ингибирование функции Т-клеток CD8+, деградацию внеклеточного матрикса, стимуляцию ангиогенеза и ингибирование фагоцитоза. В нескольких исследованиях сообщалось, что высокая инфильтрация макрофагами стромы РМЖ коррелирует с худшим прогнозом для пациента [134]. Однако в нашем исследовании было обнаружено, что частота встречаемости различных макрофагов в опухолевом микроокружении не различаются в зависимости от наличия у пациентов лимфогенных метастазов (Таблица 19).

Таблица 19 – Частота встречаемости макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от статуса регионарных лимфатических узлов

| Фенотип макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N)    |                                           | p       |
|--------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|---------|
|                    | Лимфогенные метастазы отсутствуют (N=25) | Лимфогенные метастазы присутствуют (N=14) |         |
| PD1–PDL1– M1       | 96 % (24/25)                             | 92,86 % (13/14)                           | >0,9999 |
| PD1+PDL1– M1       | 44 % (11/25)                             | 50 % (7/14)                               | 0,7496  |
| PD1–PDL1+ M1       | 88 % (22/25)                             | 92,86 % (13/14)                           | >0,9999 |
| PD1+PDL1+ M1       | 52 % (13/25)                             | 78,57 % (11/14)                           | 0,1706  |
| PD1–PDL1– M2       | 100 % (25/25)                            | 100 % (14/14)                             | >0,9999 |
| PD1+PDL1– M2       | 32 % (8/25)                              | 28,57 % (4/14)                            | >0,9999 |
| PD1–PDL1+ M2       | 100 % (25/25)                            | 100 % (14/14)                             | >0,9999 |
| PD1+PDL1+ M2       | 32 % (8/25)                              | 28,57 % (4/14)                            | >0,9999 |

Доли макрофагов рассмотренных фенотипов от общего числа клеток микроокружения также не различались статистически значимо в зависимости от статуса лимфогенного метастазирования (Таблица 20).

Таблица 20 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от статуса регионарных лимфатических узлов

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                                           | p      |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------|
|                    | Лимфогенные метастазы отсутствуют (N=25)                      | Лимфогенные метастазы присутствуют (N=14) |        |
| Все макрофаги      | 13,45 (8,77-15,51)                                            | 11,82 (10,02-18,57)                       | 0,7127 |
| M1 макрофаги       | 1,81 (1,07-3,75)                                              | 1,83 (1,03-4,05)                          | 0,7892 |
| M2 макрофаги       | 10,6 (6,68-12,62)                                             | 9,98 (8,75-13,44)                         | 0,8455 |
| PD1–PDL1– M1       | 1,05 (0,38-1,47)                                              | 0,95 (0,33-1,74)                          | 0,9481 |
| PD1+PDL1– M1       | 0 (0-0,09)                                                    | 0,02 (0-0,07)                             | 0,8318 |
| PD1–PDL1+ M1       | 0,66 (0,24-1,16)                                              | 0,62 (0,25-2,07)                          | 0,6801 |

## Продолжение таблицы 20

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                                           | p      |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------|
|                    | Лимфогенные метастазы отсутствуют (N=25)                      | Лимфогенные метастазы присутствуют (N=14) |        |
| PD1+PDL1+ M1       | 0,05 (0-0,56)                                                 | 0,27 (0,05-0,71)                          | 0,1894 |
| PD1-PDL1- M2       | 9,33 (4,96-11,24)                                             | 7,68 (6,09-10,5)                          | 0,9140 |
| PD1+PDL1- M2       | 0 (0-0,1)                                                     | 0 (0-0,03)                                | 0,5972 |
| PD1-PDL1+ M2       | 1,42 (0,5-2,56)                                               | 2,09 (1,05-3,41)                          | 0,3060 |
| PD1+PDL1+ M2       | 0 (0-0,06)                                                    | 0 (0-0,09)                                | 0,9147 |

Частота встречаемости макрофагов различных функциональных фенотипов в опухолевом микроокружении не различались в зависимости от наличия у пациентов гематогенных метастазов (Таблица 21).

Таблица 21 – Частота встречаемости макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от статуса гематогенного метастазирования

| Фенотип макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N)     |                                           | p       |
|--------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|---------|
|                    | Гематогенные метастазы отсутствуют (N=31) | Гематогенные метастазы присутствуют (N=8) |         |
| PD1-PDL1- M1       | 93,55 % (29/31)                           | 100 % (8/8)                               | >0,9999 |
| PD1+PDL1- M1       | 48,39 % (15/31)                           | 37,5 % (3/8)                              | 0,7023  |
| PD1-PDL1+ M1       | 87,1 % (27/31)                            | 100 % (8/8)                               | 0,5628  |
| PD1+PDL1+ M1       | 58,06 % (18/31)                           | 75 % (6/8)                                | 0,4499  |
| PD1-PDL1- M2       | 100 % (31/31)                             | 100 % (8/8)                               | >0,9999 |
| PD1+PDL1- M2       | 35,48 % (11/31)                           | 12,5 % (1/8)                              | 0,3938  |
| PD1-PDL1+ M2       | 100 % (31/31)                             | 100 % (8/8)                               | >0,9999 |
| PD1+PDL1+ M2       | 32,26 % (10/31)                           | 25 % (2/8)                                | >0,9999 |

Кроме того, при сравнении количества макрофагов в строме опухоли у пациентов с гематогенными метастазами и без них не было обнаружено статистически значимых различий (Таблица 22).

Таблица 22 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы в зависимости от статуса гематогенного метастазирования

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                                           | p      |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------|
|                    | Гематогенные метастазы отсутствуют (N=31)                     | Гематогенные метастазы присутствуют (N=8) |        |
| Все макрофаги      | 13,1 (9,95-15,45)                                             | 17,58 (7,25-23,25)                        | 0,3254 |
| M1 макрофаги       | 1,81 (1,04-3,8)                                               | 2,29 (1,25-3,11)                          | 0,7920 |
| M2 макрофаги       | 10,32 (8,13-12,35)                                            | 12,09 (6,34-20,18)                        | 0,4379 |
| PD1–PDL1– M1       | 1,05 (0,38-1,51)                                              | 0,71 (0,31-1,67)                          | 0,7653 |
| PD1+PDL1– M1       | 0 (0-0,06)                                                    | 0 (0-0,11)                                | 0,9345 |
| PD1–PDL1+ M1       | 0,66 (0,18-1,19)                                              | 0,75 (0,32-1,14)                          | 0,6883 |
| PD1+PDL1+ M1       | 0,12 (0-0,6)                                                  | 0,2 (0,02-1,41)                           | 0,4756 |
| PD1–PDL1– M2       | 7,92 (5,78-10,16)                                             | 9,3 (5,53-14,86)                          | 0,5691 |
| PD1+PDL1– M2       | 0 (0-0,07)                                                    | 0 (0-0)                                   | 0,2251 |
| PD1–PDL1+ M2       | 1,75 (0,5-2,74)                                               | 2,2 (0,66-4,54)                           | 0,4869 |
| PD1+PDL1+ M2       | 0 (0-0,05)                                                    | 0 (0-0,14)                                | 0,8242 |

Отсутствие статистически значимых различий в частоте встречаемости и численности макрофагов анализируемых фенотипов между группами пациентов с лимфогенными и гематогенными метастазами и без таковых позволяет заключить, что количественные параметры PD-1/PD-L1-положительных макрофагов стромы не имеют прямой ассоциации с показателями прогрессирования заболевания. Вероятно, ключевую роль в этих процессах играют другие фенотипы макрофагов опухолевого микроокружения.

В исследовании Jeong и соавт. было показано, что большее количество макрофагов (CD68, CD11c или CD163) в строме опухоли было связано с более высокой степенью злокачественности, более высоким индексом пролиферации

Ki-67, отрицательностью эстрогеновых рецепторов и отрицательностью прогестероновых рецепторов, а также что большее количество макрофагов (CD11c или CD163) было связано с большим размером опухоли [88]. Однако в этом исследовании не была учтена экспрессия макрофагами PD-1 и PD-L1. Мы показали, что частоты встречаемости и доли среди клеток стромы опухоли функциональных фенотипов M1 и M2 макрофагов, определенных исходя из оценки экспрессии ими PD-1 и PD-L1, не различались в зависимости от возраста пациентов, менструальной функции, статуса лимфогенного и гематогенного метастазирования. Эти же параметры макрофагального состава стромы опухоли по большей части не были сопряжены со степенью злокачественности опухоли. Однако наблюдались различия у пациентов с T1 и T3-4: в крупных опухолях (T3-4) в строме M1 макрофаги в целом, а также PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 макрофаги содержались в меньшем количестве, что может указывать на истощение этих популяций с ростом опухоли. При этом у пациентов с РМЖ трижды негативного молекулярного подтипа в микроокружении опухоли в большем количестве, чем у пациентов с люминальными формами РМЖ, обнаруживались PD1+(PDL1–/PDL1+) M2 макрофаги, а также у пациентов с трижды негативным РМЖ содержание в строме общей популяции M2 макрофагов было выше, но на уровне тенденции и не различалось число M1 макрофагов, экспрессирующих PD-1/PD-L1. Shinohara и соавт. продемонстрировали, что у больных трижды негативным РМЖ в строме опухоли регистрировалась более высокая плотность CD163+, CD68+CD163+, CD68+PD-L1+ и CD163+PD-L1+ макрофагов по сравнению с пациентками с люминальными подтипами РМЖ, при этом различий в числе CD68+ макрофагов выявлено не было [146]. Как наши данные, так и литературные указывают на то, что трижды негативный РМЖ характеризуется более иммуносупрессивным микроокружением за счет увеличения M2 макрофагов и их PD-1/PD-L1-ассоциированных популяций.

### 3.1.3 Частота встречаемости и количество макрофагов в опухолевом микроокружении при трижды негативном раке молочной железы

Ввиду того, что РМЖ трижды негативного молекулярного подтипа (ТНРМЖ) чаще, чем РМЖ люминальных подтипов, характеризуется как иммунологически «горячая» опухоль, особое внимание в исследовании было уделено оценке количества и частоты встречаемости различных функциональных типов макрофагов в его микроокружении.

В опухолевом микроокружении при ТНРМЖ медиана количества М1 макрофагов составляла 2,44 (1,28-3,53) % от всех клеток стромы, а М2 макрофагов – 11,94 (9,64-15,88) % ( $p < 0,0001$ ). Причем как М1, так и М2 макрофаги были обнаружены в опухолевом микроокружении у всех включенных в исследование больных ТНРМЖ. Общая доля макрофагов в строме при ТНРМЖ составила 13,75 (11,62-20,12) %.

У 100% пациентов с ТНРМЖ в строме встречались PD1–PDL1– М1 макрофаги, PD1–PDL1– М2 макрофаги и PD1–PDL1+ М2 макрофаги, у большинства – PD1–PDL1+ М1 макрофаги, у части пациентов PD1+PDL1– и PD1+PDL1+ М1 макрофаги и PD1+PDL1– и PD1+PDL1+ М2 макрофаги (Таблица 23).

Таблица 23 – Частота встречаемости макрофагов в опухолевом микроокружении при трижды негативном раке молочной железы (N=17, частоты встречаемости представлены в n/N (%))

|                |    | Экспрессия PD1/PDL1                                                    |                                                       |                                    |                |
|----------------|----|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------|
|                |    | PD1–PDL1–                                                              | PD1+PDL1–                                             | PD1–PDL1+                          | PD1+PDL1+      |
|                |    | 1                                                                      | 2                                                     | 3                                  | 4              |
| Тип макрофагов | М1 | 100 % (17/17)<br>$p_{12}=0,0072$<br>$p_{13}=0,4848$<br>$p_{14}=0,0009$ | 58,82 % (10/17)<br>$p_{23}=0,1175$<br>$p_{24}=0,7319$ | 88,24 % (15/17)<br>$p_{34}=0,0255$ | 47,06 % (8/17) |

Продолжение таблицы 23

|             |    | Экспрессия PD1/PDL1                                                    |                                                       |                                  |                |
|-------------|----|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------|
|             |    | PD1–PDL1–                                                              | PD1+PDL1–                                             | PD1–PDL1+                        | PD1+PDL1+      |
|             |    | 1                                                                      | 2                                                     | 3                                | 4              |
|             | M2 | 100 % (17/17)<br>$p_{12}=0,0072$<br>$p_{13}>0,9999$<br>$p_{14}=0,0009$ | 58,82 % (10/17)<br>$p_{23}=0,0072$<br>$p_{24}=0,7319$ | 100 % (17/17)<br>$p_{34}=0,0009$ | 47,06 % (8/17) |
| $p_{M1-M2}$ |    | $>0,9999$                                                              | $>0,9999$                                             | 0,4848                           | $>0,9999$      |

При ТНPMЖ большая часть макрофагов стромы (69,39 (52,2-81,1) %) имела фенотип PD1–PDL1– M2, еще 9,82 (5,98-12,25) % составляли PD1–PDL1– M1 макрофаги. Остальные макрофаги (около 20 %) экспрессировали PD-1 или/и PD-L1. Доля PD1–PDL1+ M2 макрофагов была выше доли PD1–PDL1+ M1 макрофагов (15,98 (4,53-20,4) % и 3,56 (1,04-7,99) % соответственно,  $p=0,0002$ ). Не различались доли PD1+PDL1– M1 макрофагов и PD1+PDL1– M2 макрофагов (0,3 (0-0,52) % и 0,18 (0-1,41) % соответственно,  $p=0,3054$ ), а также PD1+PDL1+ M1 макрофагов и PD1+PDL1+ M2 макрофагов (0 (0-5,8) % и 0 (0-1,51) % соответственно,  $p=0,0742$ ) (Таблица 24).

Таблица 24 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при трижды негативном PMЖ (N=17, доли представлены в % от общего числа макрофагов стромы)

|                |    | Экспрессия PD1/PDL1                                                        |                                                     |                                      |            |
|----------------|----|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|------------|
|                |    | PD1–PDL1–                                                                  | PD1+PDL1–                                           | PD1–PDL1+                            | PD1+PDL1+  |
|                |    | 1                                                                          | 2                                                   | 3                                    | 4          |
| Тип макрофагов | M1 | 9,82 (5,98-12,25)<br>$p_{12}<0,0001$<br>$p_{13}=0,1089$<br>$p_{14}=0,0008$ | 0,3 (0-0,52)<br>$p_{23}=0,0001$<br>$p_{24}=0,0771$  | 3,56 (1,04-7,99)<br>$p_{34}=0,0026$  | 0 (0-5,8)  |
|                | M2 | 69,39 (52,2-81,1)<br>$p_{12}<0,0001$<br>$p_{13}<0,0001$<br>$p_{14}<0,0001$ | 0,18 (0-1,41)<br>$p_{23}<0,0001$<br>$p_{24}=0,4922$ | 15,98 (4,53-20,4)<br>$p_{34}<0,0001$ | 0 (0-1,51) |
| $p_{M1-M2}$    |    | $<0,0001$                                                                  | 0,3054                                              | 0,0002                               | 0,0742     |

Таким образом, при ТНРМЖ, как и в общей группе больных РМЖ, в опухолевом микроокружении наблюдается преобладание иммуносупрессивного фенотипа макрофагов: больше общая доля M2 макрофагов, а также PD1–PDL1– M2 и PD1–PDL1+ M2 фенотипов, в сравнении с M1.

### **3.1.4 Взаимосвязь количества и частоты встречаемости макрофагов в микроокружении опухоли с PD-L1 статусом при трижды негативном раке молочной железы**

PD-L1+ иммунные клетки в опухолевом микроокружении обладают иммуносупрессорным потенциалом, который может реализоваться при взаимодействии этих клеток с клетками, экспрессирующими рецептор (PD-1). PD-L1 статус при РМЖ – это параметр, который отражает уровень экспрессии белка PD-L1 в иммунных клетках стромы опухоли. Согласно критериям, установленным по интерпретации результатов иммуногистохимического окрашивания PD-L1 (SP142) [163], PD-L1 статус считается положительным, если окрашенные PD-L1 иммунные клетки, инфильтрирующие опухоль, покрывают  $\geq 1$  % площади опухоли (включая зону опухолевых клеток, интраопухолевую и перитуморальную строму). Негативным PD-L1 статус считается в тех случаях, когда не наблюдается иммуногистохимического окрашивания PD-L1, либо выявляется окрашивание любой интенсивности в иммунных клетках, инфильтрирующих опухоль и покрывающих  $< 1$  % площади опухоли. Стоит отметить, что у большинства больных ТНРМЖ с негативным PD-L1 статусом, включенных в данное исследование, в строме опухоли обнаруживались единичные клетки с экспрессией PD-L1, что позволяет оценивать их фенотип и сравнивать с таковым у пациентов с PD-L1 позитивным ТНРМЖ.

Согласно полученным нами данным, у больных ТНРМЖ с позитивным PD-L1 статусом количество PD-L1+ иммунных клеток составляло 14,63 (7,21-18,68) % от общего числа клеток стромы опухоли, а у больных ТНРМЖ с негативным PD-L1 статусом – 2,06 (0,89-3,11) % ( $p = 0,0006$ ).

В связи с тем, что у пациентов с позитивным PD-L1 статусом в строме опухоли заведомо больше PD-L1+ клеток в строме опухоли, чем у больных с негативным PD-L1 статусом, на данном этапе исследования мы не сравнивали количество PD-L1+ M1 и M2 макрофагов в строме опухоли в зависимости от PD-L1 статуса, но сравнили доли M1 и M2 макрофагов, занимаемые среди PD-L1+ клеток стромы, в зависимости от PD-L1 статуса.

Было показано, что у пациентов с позитивным PD-L1 статусом в опухолевом микроокружении чаще, чем у пациентов с негативным PD-L1 статусом обнаруживались PD-1+ M2 макрофаги (100 % (9/9) против 25 % (2/8),  $p = 0,0023$ ). Частота встречаемости PD-1+ M1 макрофагов не различалась в зависимости от PD-L1 статуса, а PD-1– M1 макрофаги и PD-1– M2 макрофаги обнаруживались в строме опухоли у всех включенных в исследование пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом (Таблица 25).

Таблица 25 – Частота встречаемости макрофагов в опухолевом микроокружении при трижды негативном раке молочной железы в зависимости от PD-L1 статуса

| Фенотип макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N) |                               | p             |
|--------------------|---------------------------------------|-------------------------------|---------------|
|                    | Негативный PD-L1 статус (N=8)         | Позитивный PD-L1 статус (N=9) |               |
| PD1– M1            | 100 % (8/8)                           | 100 % (9/9)                   | >0,9999       |
| PD1+ M1            | 50 % (4/8)                            | 88,89 % (8/9)                 | 0,1312        |
| PD1– M2            | 100 % (8/8)                           | 100 % (9/9)                   | >0,9999       |
| PD1+ M2            | 25 % (2/8)                            | 100 % (9/9)                   | <b>0,0023</b> |

При сравнении количества макрофагов стромы опухоли у пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом было обнаружено, что в рассмотренных группах пациентов количество M1 и M2 макрофагов не различается (Таблица 26). При этом в опухолевом микроокружении у пациентов с позитивным PD-L1 статусом было больше PD-1+ M1 макрофагов (при позитивном PD-L1 статусе: 0,95 (0,15-1,42) % от общего числа клеток стромы, при негативном PD-L1 статусе: 0,02 (0-0,1) % от общего числа клеток стромы,  $p = 0,0073$ ) и PD-1+ M2 макрофагов (при позитивном PD-L1 статусе: 0,27 (0,15-0,73) % от общего числа клеток стромы, при негативном PD-L1 статусе: 0 (0-0,15) % от общего числа клеток стромы,  $p = 0,0085$ ), чем у пациентов с негативным PD-L1 статусом, но не различалось количество PD-1– M1 макрофагов и PD-1– M2 макрофагов. Кроме того, было обнаружено, что у пациентов с позитивным PD-L1 статусом общая доля PD-1+ клеток в микроокружении выше, чем у пациентов с негативным PD-L1 статусом (6,7 (3,55-8,32) % и 0,41 (0,2-0,9) %),  $p = 0,0002$ ).

Таблица 26 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при трижды негативном раке молочной железы в зависимости от PD-L1 статуса

| Фенотип макрофагов | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                               | p             |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------|
|                    | Негативный PD-L1 статус (N=8)                                 | Позитивный PD-L1 статус (N=9) |               |
| Все макрофаги      | 13,6 (11,46-20,31)                                            | 13,75 (11,62-20,66)           | 0,8884        |
| M1 макрофаги       | 1,52 (1,12-2,78)                                              | 2,96 (2,1-4,89)               | 0,1139        |
| M2 макрофаги       | 12,14 (10,4-16,99)                                            | 11,14 (7,96-17,01)            | 0,7430        |
| PD1– M1            | 1,25 (0,95-2,79)                                              | 1,99 (1,45-3,93)              | 0,2766        |
| PD1+ M1            | 0,02 (0-0,1)                                                  | 0,95 (0,15-1,42)              | <b>0,0073</b> |
| PD1– M2            | 12,15 (10,32-16,99)                                           | 10,86 (7,46-16,84)            | 0,6058        |
| PD1+ M2            | 0 (0-0,15)                                                    | 0,27 (0,15-0,73)              | <b>0,0085</b> |

Таким образом, у пациенток с трижды негативным раком молочной железы (ТНРМЖ) и положительным PD-L1 статусом в опухолевом

микроокружении определяется большее количество PD-1+ клеток, включая M1- и M2-макрофаги, по сравнению с пациентками с отрицательным PD-L1 статусом. Следует отметить, что в доступной литературе отсутствуют данные о процентном содержании PD-1+ макрофагов в строме опухоли у больных с PD-L1-положительным и PD-L1-отрицательным ТНPMЖ, сопоставимые с полученными в настоящем исследовании. Вместе с тем имеются отдельные наблюдения: так, в работе G. Brockhoff и соавт., выполненной на когорте пациенток с ТНPMЖ, была установлена достоверная положительная корреляция между экспрессией PD-1 на TILs и PD-L1 на опухолевых клетках и лимфоцитах. Авторы подчеркивают, что высокая экспрессия PD-1 на TILs ассоциировалась с более длительной выживаемостью без прогрессирования [23]. Кроме того, в обзоре M. Yerolatsite и соавт. приводятся данные, согласно которым при раке пищевода высокий уровень PD-1+ опухоль-ассоциированных макрофагов сопряжён с неблагоприятным прогнозом [174].

В проведённом нами исследовании показано, что при ТНPMЖ экспрессия PD-1 выявляется как на M1-, так и на M2-макрофагах, причём чаще в PD-L1-позитивных случаях, однако их роль в формировании иммуносупрессивного микроокружения остаётся неясной.

В последующем мы изучили распространенность макрофагов среди PD-L1+ клеток стромы опухоли. Было обнаружено, что при ТНPMЖ значительная часть PD-L1+ клеток стромы являются макрофагами (50 (37,07-59,41) % от общего числа PD-L1+ клеток стромы). При этом M1 макрофаги от общего числа PD-L1+ клеток стромы составляют 10,57 (7,05-17,7) %, а M2 – 34,68 (23,61-53,68) % ( $p = 0,0002$ ).

Помимо того, было проведено сравнение доли макрофагов среди PD-L1+ клеток стромы опухоли у пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом (Таблица 27). У пациентов с негативным PD-L1 статусом на уровне тенденции макрофаги составляли большую долю PD-L1+ клеток, чем у

пациентов с позитивным PD-L1 статусом (59,41 (42,81-76,51) % и 41,84 (33,25-53,26) %,  $p = 0,0927$ ). Доля M2 макрофагов среди PD-L1+ клеток стромы была выше у пациентов с негативным PD-L1 статусом (53,68 (32,65-59,66) % и 27,76 (18,77-38,05) %,  $p = 0,0274$ ), а доля M1 не различалась в зависимости от PD-L1 статуса опухоли. Кроме того, как в PD-L1-негативных, так и в PD-L1-позитивных опухолях среди стромальных PD-L1+ клеток количество M2 макрофагов значительно преобладало над количеством M1 макрофагов.

Таблица 27 – Доля PD-L1+ макрофагов среди всех PD-L1+ клеток стромы в зависимости от PD-L1 статуса опухоли

| Тип клеток         | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от PD-L1+ клеток стромы |                                           | p             |
|--------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------|
|                    | Негативный PD-L1 статус (N=8)                           | Позитивный PD-L1 статус (N=9)             |               |
| PDL1+ макрофаги    | 59,41 (42,81-76,51)                                     | 41,84 (33,25-53,26)                       | 0,0927        |
| PDL1+ M1 макрофаги | 10,1 (5,87-18,22)                                       | 14,08 (7,05-17,7)                         | 0,6256        |
| PDL1+ M2 макрофаги | 53,68 (32,65-59,66)<br>$p_{M1-M2}=0,0078$               | 27,76 (18,77-38,05)<br>$p_{M1-M2}=0,0273$ | <b>0,0274</b> |

Таким образом, по результатам исследования было показано, что у пациенток с отрицательным PD-L1 статусом макрофаги, в особенности субпопуляция M2, достоверно чаще составляют часть PD-L1-положительных клеток опухолевой стромы по сравнению с PD-L1-позитивными случаями. При этом, вне зависимости от статуса PD-L1, значительная доля PD-L1+ клеток микроокружения представлена макрофагами, преимущественно M2-фенотипа, а не M1. Это позволяет предположить, что в микроокружении ТНРМЖ именно M2-макрофаги в большей степени, чем M1, вовлечены в реализацию PD-1/PD-L1-зависимых механизмов иммуносупрессии.

Интересно, что для колоректального рака описаны иные закономерности. В исследовании Н. Elomaa и соавт. показано, что PD-L1-положительные макрофаги обладают поляризационным профилем, более сходным с M1, чем с

M2, демонстрируют пространственную ко-локализацию с опухолевыми клетками и PD-1+ Т-лимфоцитами и ассоциированы с благоприятным клиническим исходом [47]. Дополнительно, по данным F.S. Ahmed и соавт., у пациенток с трижды негативным РМЖ, получавших неоадьювантную химиоиммунотерапию в комбинации с дурвалумабом, достижение полного патологического ответа коррелировало не только с более высокой экспрессией PD-L1 в опухоли и строме, но и с повышенной экспрессией PD-L1 в CD68+ макрофагах по сравнению с больными, у которых полный ответ отсутствовал [7].

Совокупность полученных нами данных и литературных сведений позволяет убедительно заключить, что для повышения точности прогноза эффективности иммунотерапии при трижды негативном РМЖ необходимо учитывать не только общий PD-L1 статус, но и фенотипическую принадлежность клеток, являющихся источником экспрессии PD-L1.

### **3.1.5 Транскриптомные характеристики макрофагов микроокружения опухоли у пациентов с трижды негативным раком молочной железы в зависимости от PD-L1 статуса опухоли**

Для изучения транскриптомных особенностей макрофагов у пациентов с PD-L1-позитивным и PD-L1-негативным ТНРМЖ был взят опухолевый материал 11 пациентов. PD-L1 статус был определен иммуногистохимическим методом с использованием анти-PD-L1 антитела (клон SP142, Ventana). С помощью технологии пространственного профилирования транскриптома Visium 10x был определен набор РНК в участках (спотах) опухолевой ткани. Для аннотации спотов была использована программа Loupe Browser 8.0.0 (10x Genomics, США). Для выбора CD68+(CD163–) спотов и CD163+(CD68+/-) спотов были установлены пороги экспрессии генов CD68 ( $\text{LogNorm} \geq 2$ ) и

CD163 ( $\text{LogNorm} \geq 1,7$ ), соответствующие 1/3 части шкалы экспрессии и позволяющие отобрать споты со средней и сильной экспрессией. Отбор стромальных спотов был проведен вручную, на основе морфологии опухолевой ткани, окрашенной гематоксилином и эозином. Для анализа было выбрано 378 CD68+(CD163–) спотов (2 % от общего числа спотов) и 682 CD163+(CD68+/-) спотов (3 % от общего числа спотов), включающих только клетки микроокружения опухоли. Споты, соответствующие набору данных условий, были обнаружены в ткани всех 11 включенных в исследование пациентов (Рисунок 3).

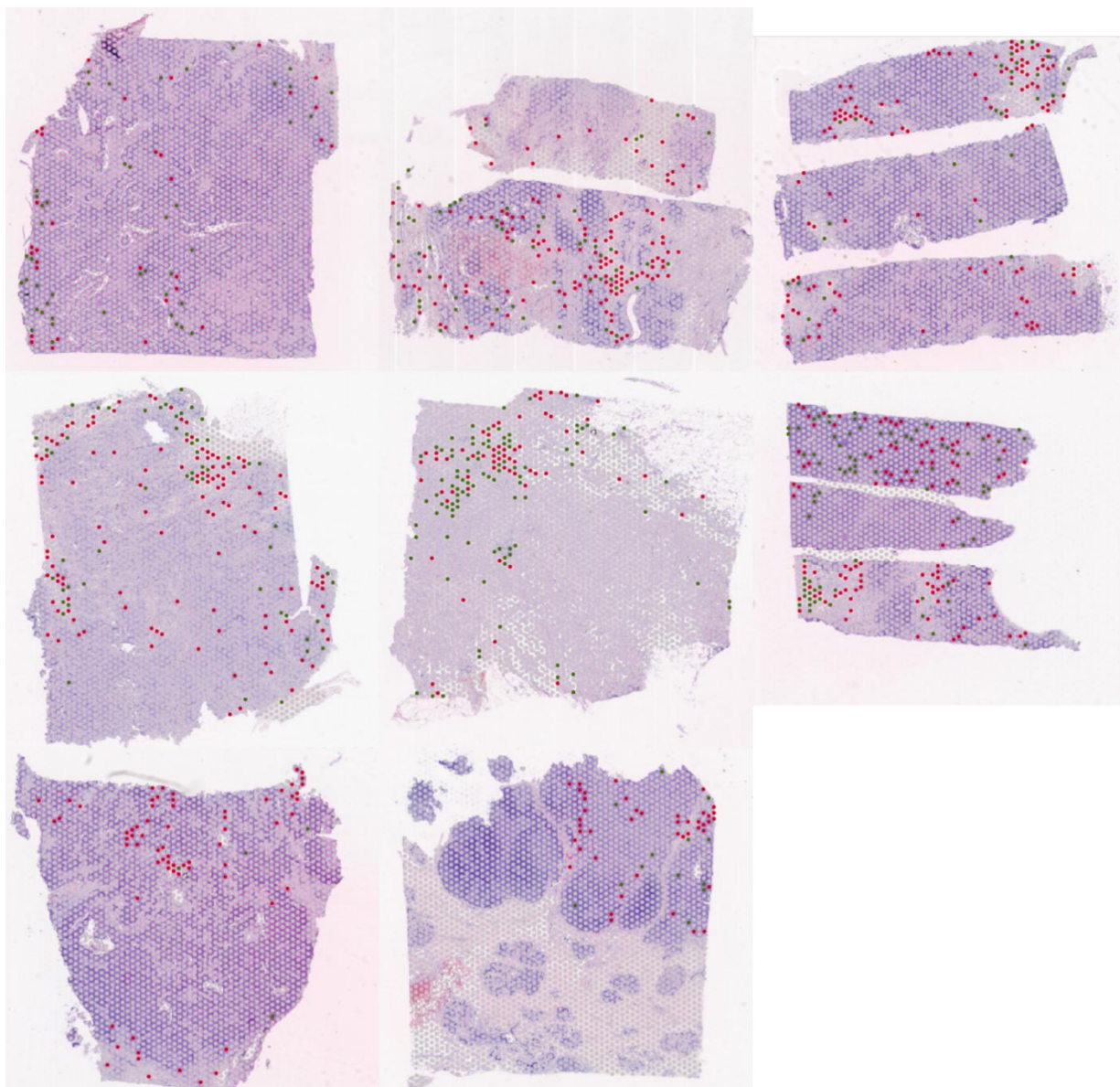


Рисунок 3 – Аннотация спотов в Loupe Browser (зеленые точки – стромальные CD68+ споты, красные точки – стромальные CD163+ споты)

Следующим этапом был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов в CD68+ спотах и в CD163+ спотах между группами пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом (Рисунки 4 и 5). Для CD68+ кластера было выявлено 324 дифференциально экспрессирующихся гена, а для CD163+ – 437.

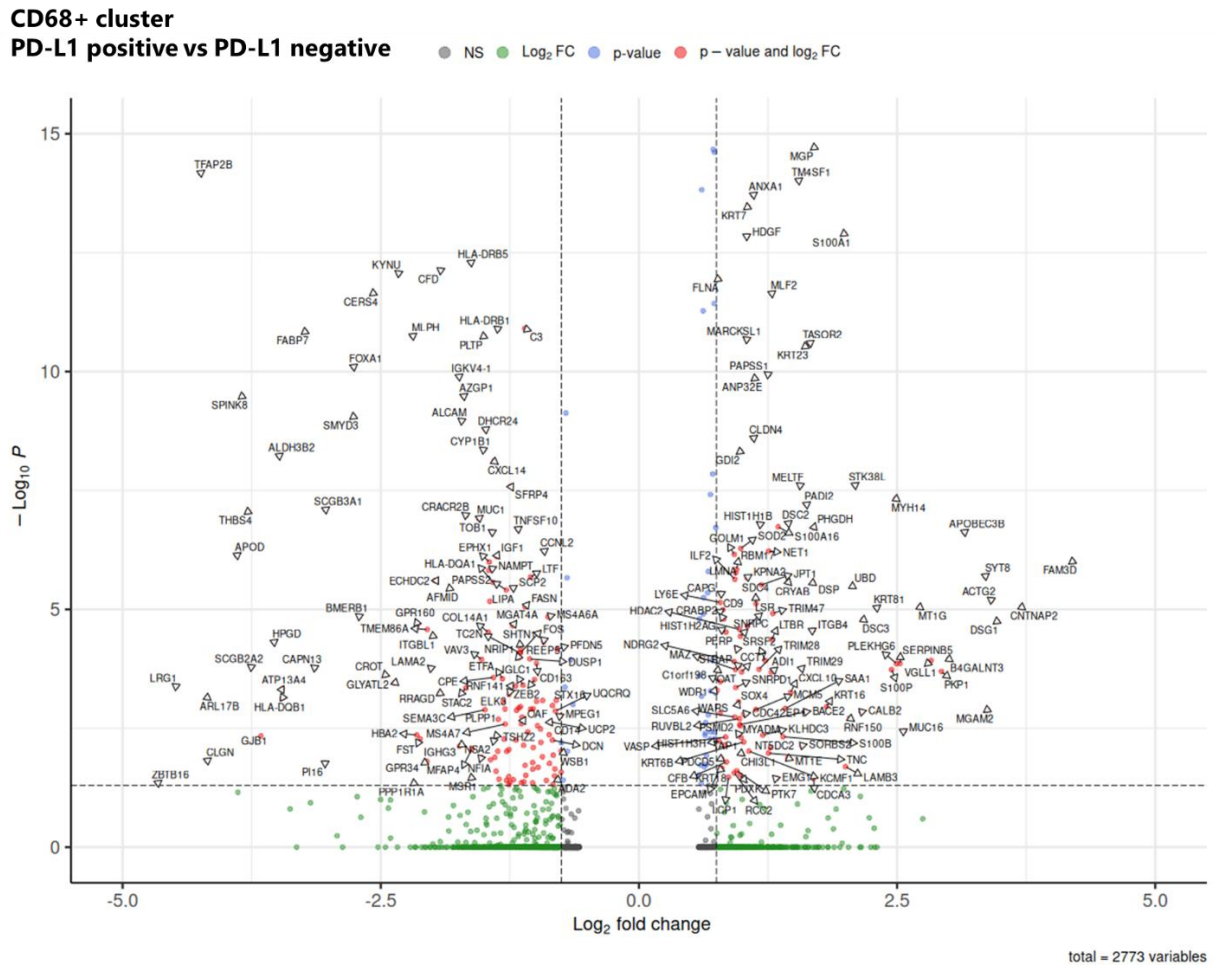


Рисунок 4 – Диаграмма рассеяния (volcano plot), иллюстрирующая результаты анализа дифференциальной экспрессии генов в кластере CD68<sup>+</sup> клеток стромы опухоли у пациенток с положительным и отрицательным PD-L1 статусом

**CD163+ cluster**  
**PD-L1 positive vs PD-L1 negative**

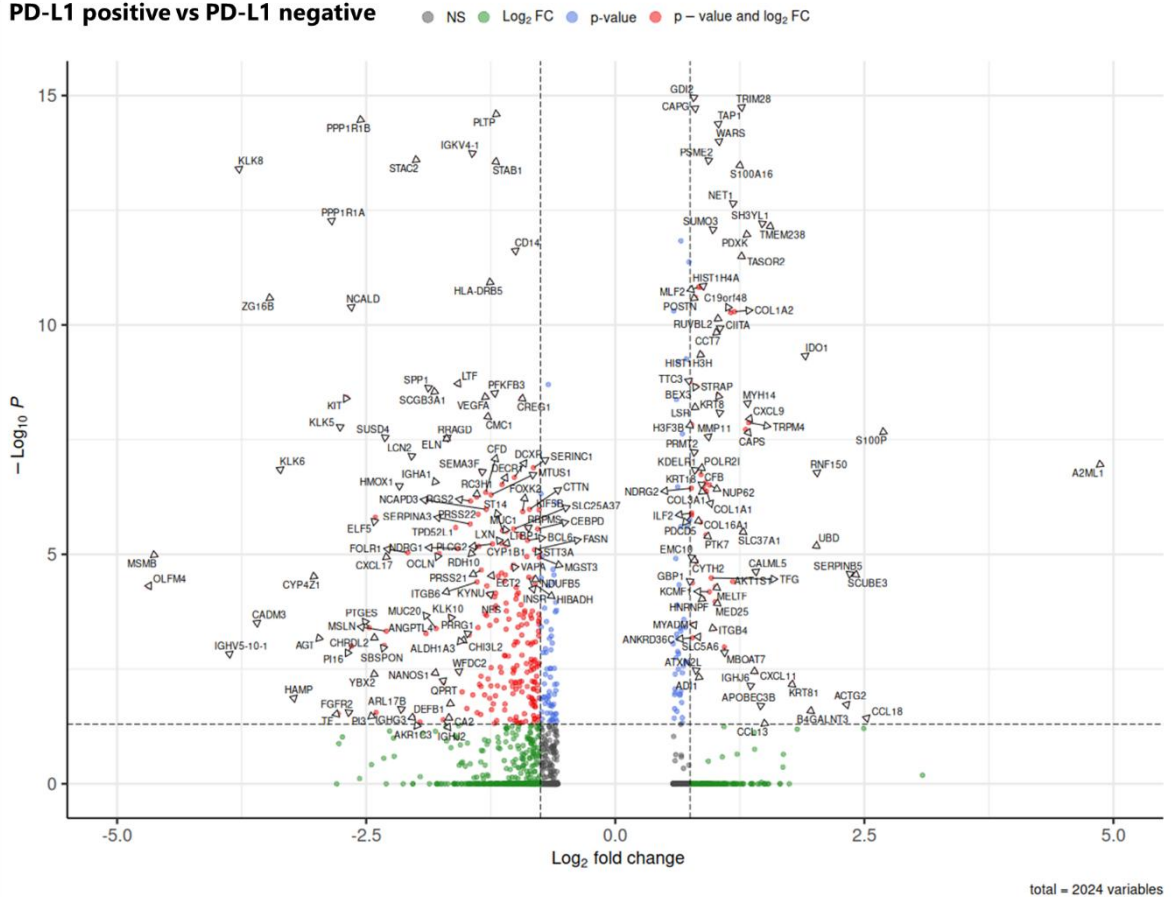


Рисунок 5 – Диаграмма рассеяния разности экспрессии генов (volcano plot), полученная в результате анализа дифференциальной экспрессии генов в CD163+ кластере стромы опухоли между группами с позитивным и негативным PD-L1 статусом

Биологические процессы, в значительной степени обогащенные ( $p\text{-value.adj} < 0,05$ ) в CD68+ и CD163+ кластерах у пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом, были определены с помощью анализа функционального обогащения дифференциально экспрессированных генов. В результате, в CD68+ кластере у пациентов с позитивным PD-L1 статусом опухоли нами было выявлено обогащение 84 биологических процессов, у пациентов с негативным PD-L1 статусом – 83. В CD163+ кластере у пациентов с позитивным PD-L1 статусом было выявлено обогащение 21 биологического

процесса, у пациентов с негативным PD-L1 статусом – 163. Для последующего анализа были отобраны только процессы, связанные с реализацией иммунного ответа и привлечением иммунных клеток, функционированием и привлечением фибробластов, а также осуществлением неоангиогенеза (Рисунки 6 и 7).

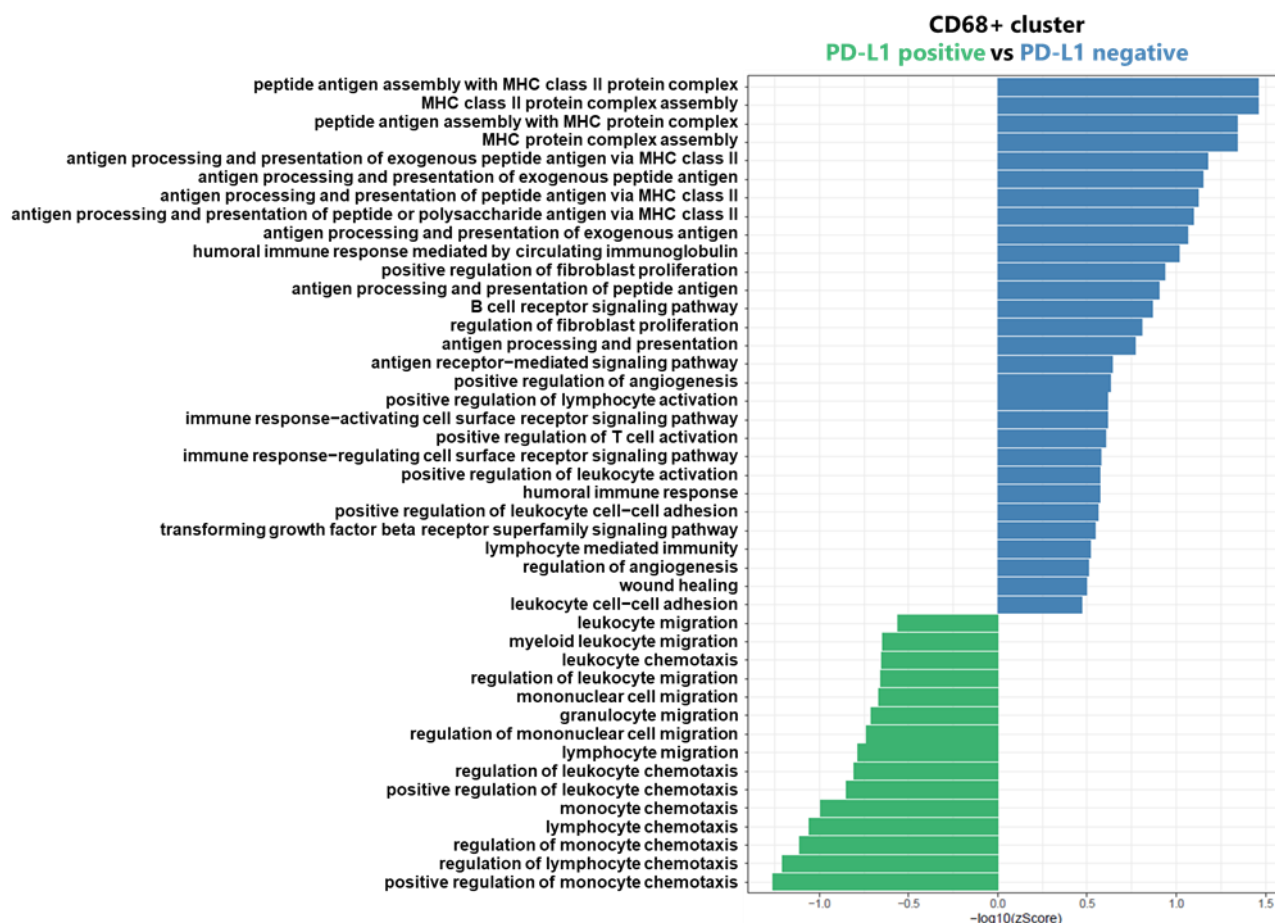


Рисунок 6 – Обогащенные биологические процессы в CD68+ кластере в зависимости от PD-L1 статуса (зеленым цветом показаны процессы, обогащенные у пациентов с позитивным PD-L1 статусом, синим – у пациентов с негативным PD-L1 статусом)

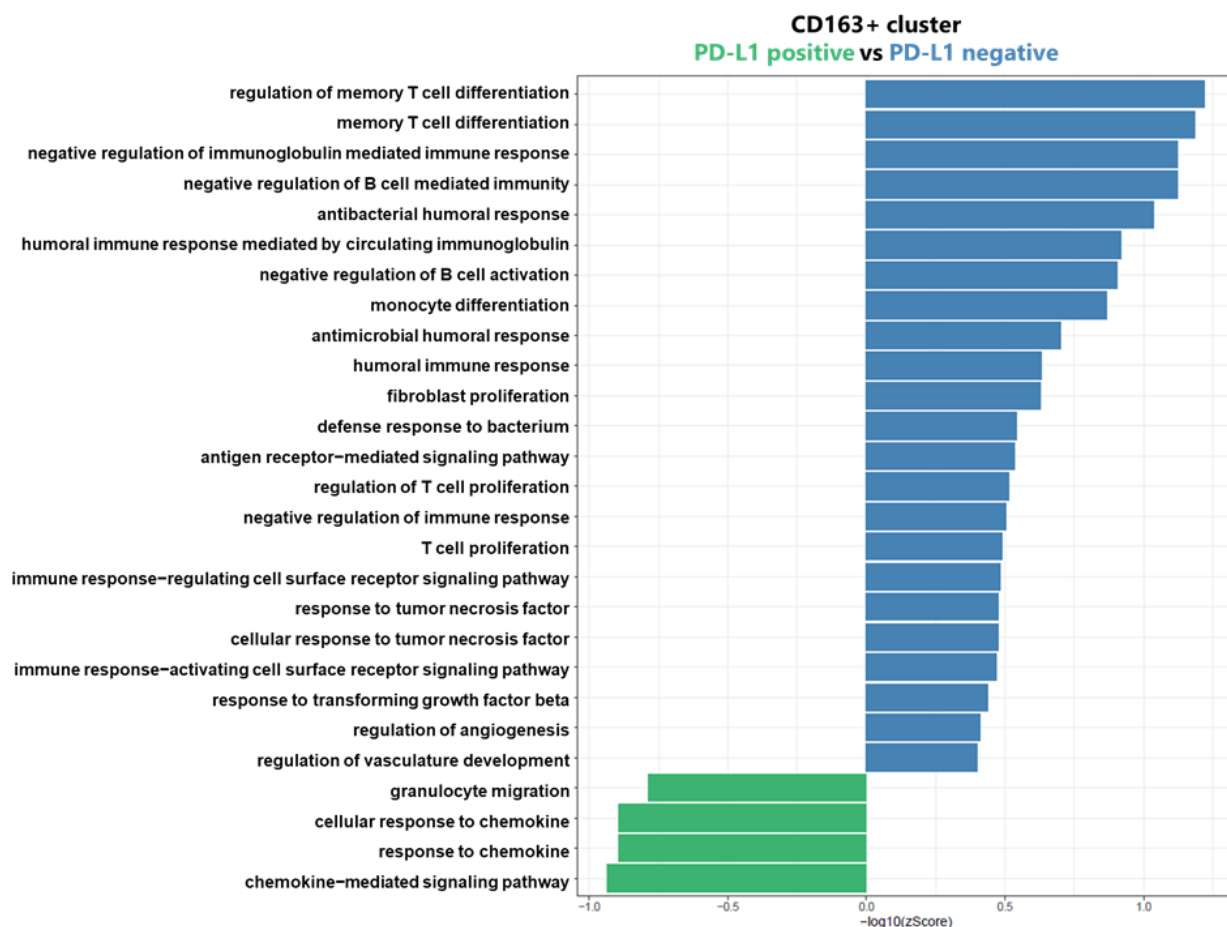


Рисунок 7 – Обогащенные биологические процессы в CD163+ кластере в зависимости от PD-L1 статуса (зеленым цветом показаны процессы, обогащенные у пациентов с позитивным PD-L1 статусом, синим – у пациентов с негативным PD-L1 статусом)

По результатам исследования нами было обнаружено, что в CD68+ кластере у пациентов с позитивным PD-L1 статусом обогащены биологические процессы, связанные с миграцией и хемотаксисом лимфоцитов и миелоидных клеток и их регуляцией. В CD68+ кластере у пациентов с негативным PD-L1 статусом были обогащены биологические процессы, связанные со сборкой молекул главного комплекса гистосовместимости МНС-II, презентацией с их помощью антигенов, позитивной регуляцией активации лимфоцитов, в том числе Т-клеток, работой сигнальных путей иммунных рецепторов,

осуществлением гуморального иммунного ответа и регуляцией воспалительных и репаративных процессов. При этом в CD68<sup>+</sup> кластере у пациентов с негативным PD-L1 статусом были подавлены процессы миграции и хемотаксиса лейкоцитов.

Интерпретировать обнаруженные различия в транскриптомном профиле и активации иммунных биологических процессов у пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом в CD68<sup>+</sup> кластере можно следующим образом. Позитивный PD-L1 статус предполагает, что в микроокружении опухоли активно функционирует иммунная контрольная точка PD-1/PD-L1, что приводит к истощению Т-клеток и других иммунных клеток и ограничению противоопухолевого иммунного ответа. На этом фоне возможно усиление привлечения иммунных клеток в опухоль для поддержания иммунного ответа. CD68<sup>+</sup> макрофаги в данном механизме могут быть задействованы как клетки, секретирующие провоспалительные цитокины и хемокины, привлекающие Т-клетки и гранулоциты. При негативном PD-L1 статусе механизм PD-1/PD-L1 не активен и не ограничивает иммунный ответ против опухоли, в результате наблюдаются процессы, указывающие на его активность – презентация антигенов с помощью МНС-II, активация иммунных клеток, присутствующих в опухоли, а также процессы, ограничивающие воспаление. CD68<sup>+</sup> макрофаги в этих процессах могут участвовать как клетки, презентующие антигены Т-клеткам, секретирующие провоспалительные цитокины и факторы, стимулирующие ангиогенез.

В CD163<sup>+</sup> кластере у пациентов с позитивным PD-L1 статусом были обогащены только четыре значимых с точки зрения изучения иммунологических механизмов процесса: три из них связаны с ответом на хемокины и один – с миграцией гранулоцитов. В CD163<sup>+</sup> кластере у пациентов с негативным PD-L1 статусом были обогащены процессы, ассоциированные с гуморальным иммунным ответом, активацией и супрессией иммунных клеток,

реакцией на TGF- $\beta$ , TNF, регуляцией ангиогенеза и пролиферацией фибробластов. Закономерности, обнаруженные в CD163<sup>+</sup> кластере имеют сходство с таковыми в CD68<sup>+</sup> кластере, однако, например, у PD-L1-негативных пациентов в CD163<sup>+</sup> кластере не обнаруживалось активации процессов, связанных с презентацией антигенов, а у PD-L1-позитивных пациентов в CD163<sup>+</sup> кластере в меньшей степени были выражены процессы привлечения и хемотаксиса лейкоцитов, чем в CD68<sup>+</sup> кластере.

Таким образом, обнаруженные различия в транскриптомном профиле и активации биологических процессов в CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup> кластерах у пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом позволяют предположить, что позитивный PD-L1 статус ассоциирован с попыткой компенсаторного рекрутинга иммунных клеток в опухолевое микроокружение на фоне их истощения, в который могут быть вовлечены CD68<sup>+</sup> макрофаги, а негативный PD-L1 статус характеризуется активным адаптивным иммунным ответом (в котором CD68<sup>+</sup> макрофаги могут участвовать как антиген-презентирующие клетки), но с элементами негативной регуляции воспаления (в которую могут быть вовлечены CD163<sup>+</sup> макрофаги).

Также нами была изучена экспрессия генов рецепторов иммунных контрольных точек в CD68<sup>+</sup> кластере и в CD163<sup>+</sup> кластере в зависимости от PD-L1 статуса. Помимо *PDCD1* (PD-1) были исследованы следующие гены: *CTLA4* (CTLA-4), *LAG3* (LAG-3), *HAVCR2* (TIM-3), *TIGIT* (TIGIT), *SIRPA* (SIRP- $\alpha$ ) (Рисунок 8).

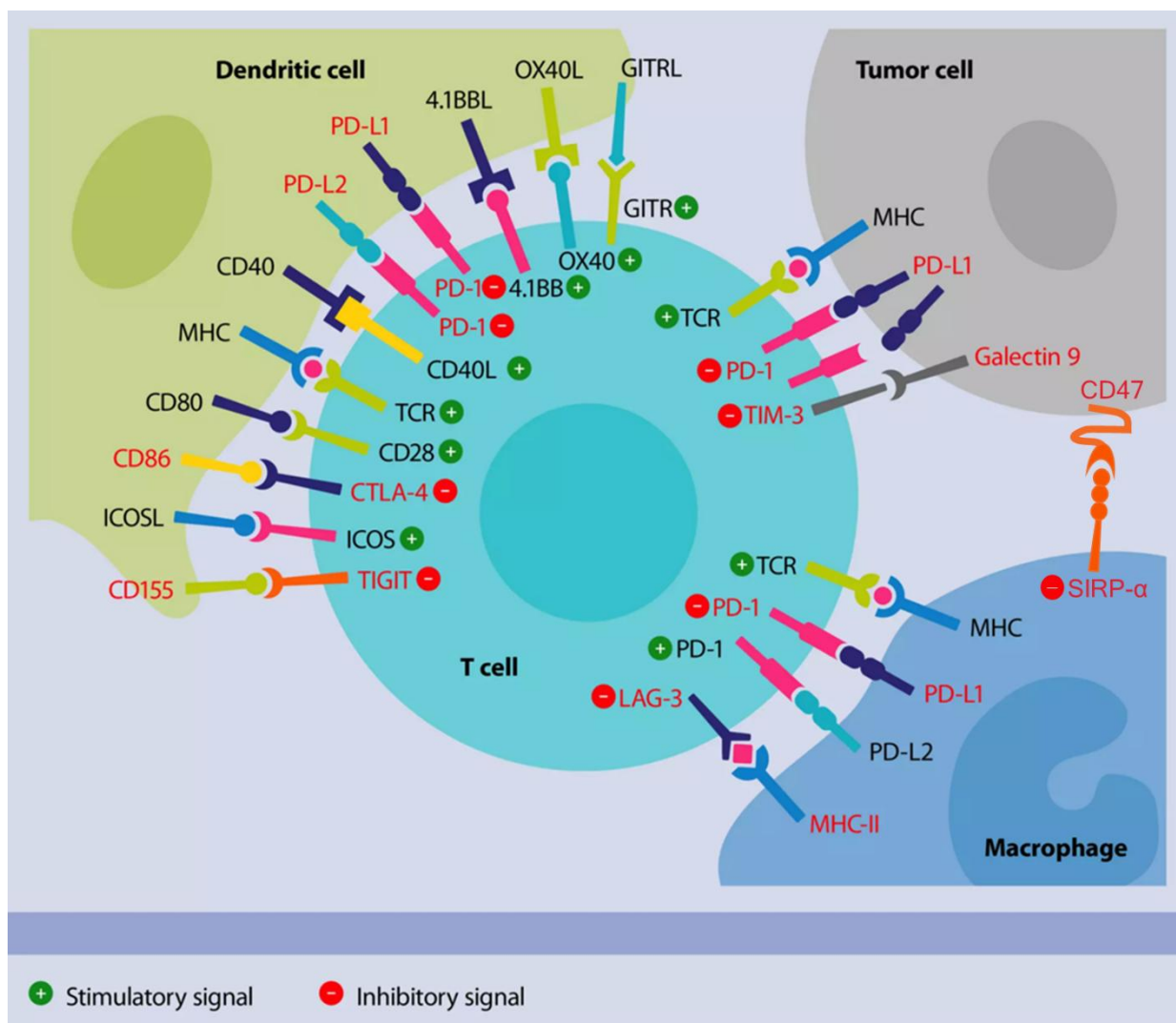


Рисунок 8 – Иммунные контрольные точки (обозначены красным цветом) [87]

Результаты были получены с помощью анализа GSEA (gene set enrichment analysis, анализ обогащения генного набора).

В CD68<sup>+</sup> кластере у пациентов с позитивным PD-L1 статусом экспрессия гена *HAVCR2* (TIM-3) была статистически значимо ниже, чем у пациентов с негативным PD-L1 статусом ( $p=0,023$ ). Экспрессия генов других рассмотренных рецепторов иммунных контрольных точек в CD68<sup>+</sup> кластере не различалась в зависимости от PD-L1 статуса (Рисунок 9).

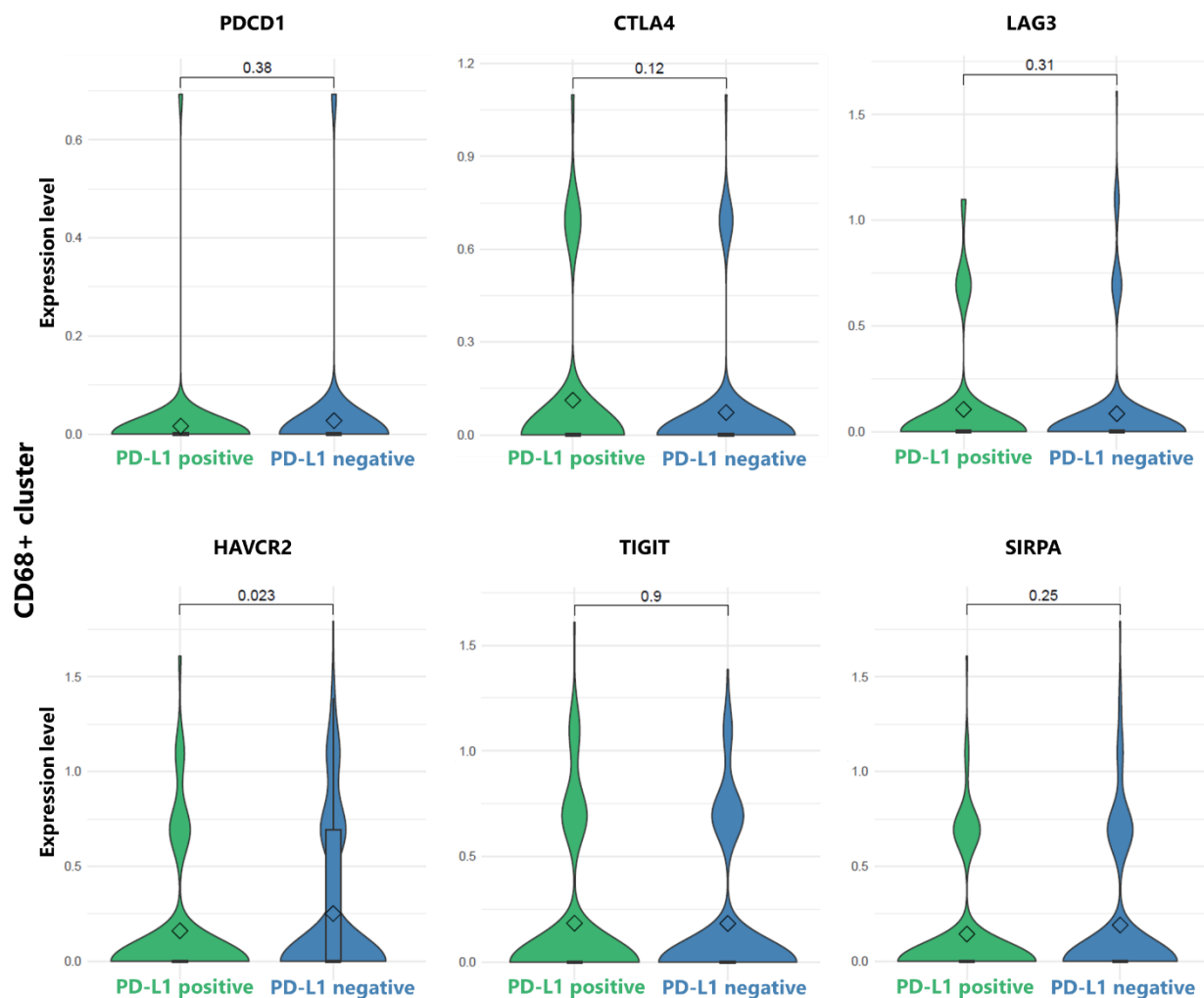


Рисунок 9 – Сравнение экспрессии генов рецепторов иммунных контрольных точек у пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом в CD68+ кластере

В CD163+ кластере у пациентов с позитивным PD-L1 статусом экспрессия гена *CTLA4* (CTLA-4) была статистически значимо выше ( $p=0,021$ ), а гена *SIRPA* (SIRP- $\alpha$ ) – ниже ( $p=0,0001$ ), чем у пациентов с негативным PD-L1 статусом. Экспрессия генов других рассмотренных рецепторов иммунных контрольных точек в CD163+ кластере не различалась в зависимости от PD-L1 статуса (Рисунок 10).

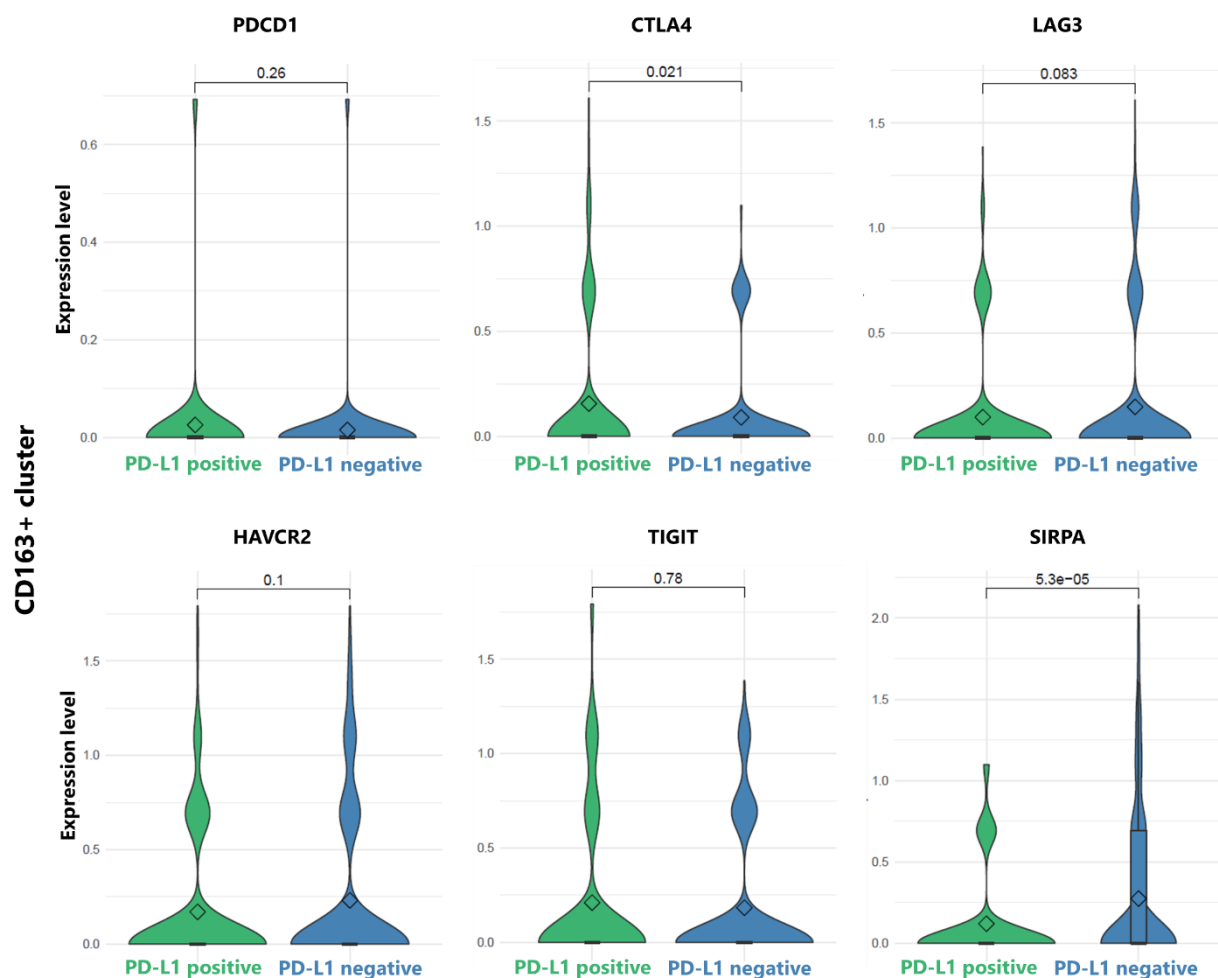


Рисунок 10 – Сравнение экспрессии генов рецепторов иммунных контрольных точек у пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом в CD163+ кластере

Стоит отметить, что наиболее яркими экспрессионными различиями в зависимости от типа макрофагов и PD-L1 статуса опухоли характеризуется ген *SIRPA* (*SIRP-α*): в CD68+ кластере его экспрессия не различается у пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом, а в CD163+ его экспрессия существенно выше при негативном PD-L1 статусе. Также на приведенных выше рисунках видно, что экспрессия всех генов рассмотренных рецепторов иммунных контрольных точек в той или иной мере обнаруживается в участках опухолевой стромы, содержащих CD68+ или CD163+ макрофаги. Это

указывает на то, что макрофаги могут участвовать в реализации этих иммуносупрессорных механизмов как в качестве клеток, экспрессирующих рассмотренные рецепторы, так и в качестве клеток, экспрессирующих лиганды к рецепторам иммунных контрольных точек, причем как при позитивном, так и при негативном PD-L1 статусе.

### **3.2 Ко-локализации клеток микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1**

В опухолевом микроокружении лишь ограниченная часть иммунных клеток экспрессирует PD-1 или PD-L1, и ещё меньшая их доля вступает во взаимный контакт. Визуализация взаимодействия этих молекул рассматривается как прямое свидетельство активности иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 в опухоли.

Ко-локализованными считались непосредственно контактирующие иммунные клетки, одна из которых несёт рецептор PD-1, а вторая лиганд PD-L1. У пациентов с РМЖ, срезы опухолевой ткани которых были окрашены методом TSA-модифицированной многоцветной иммунофлуоресценции (Рисунок 11), оценивались ко-локализации M1 макрофагов и CD3+ Т-клеток, M2 макрофагов и CD3+ Т-клеток, M1 и M2 макрофагов, M1 макрофагов и «других» клеток, M2 макрофагов и «других» клеток, CD3+ Т-клеток и «других» клеток. К «другим» относились такие клетки микроокружения, которые не экспрессировали ни CD68, ни CD163, ни CD3.

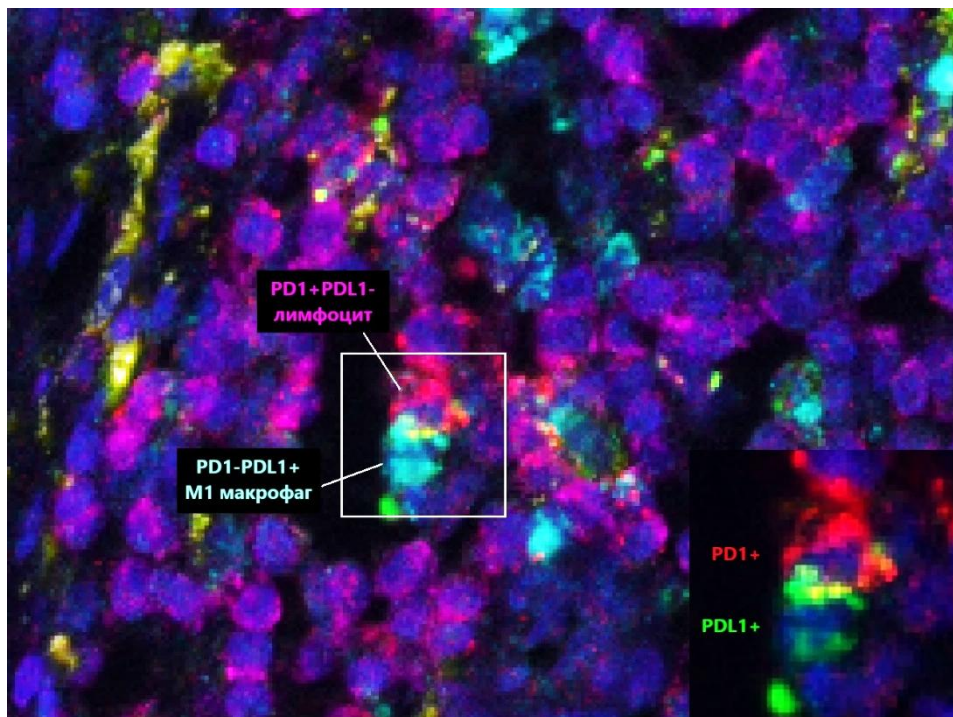


Рисунок 11 – TSA-модифицированная иммунофлуоресценция, маркеры с присвоенными им псевдоцветами (CD68 – голубой, CD163 – жёлтый, CD3 – фиолетовый, PD-1 – красный, PD-L1 – зелёный), увеличение  $\times 400$

### 3.2.1 Частота встречаемости и количество ко-локализованных клеток микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1

Ко-локализации иммунных клеток, одна из которых несет лиганд (PD-L1), а другая рецептор (PD-1), в микроокружении РМЖ: не были обнаружены у 28,21 % пациентов (у 11 пациентов из 39), были обнаружены в небольшом количестве (менее 5 ко-локализаций на 1000 клеток стромы) у 43,59 % пациентов (у 17 пациентов из 39), были обнаружены в большом количестве (более 5 ко-локализаций на 1000 клеток стромы) у 28,21 % пациентов (у 11 пациентов из 39).

У пациенток, в опухолевом микроокружении которых выявлялись прямые контакты между PD-1+ и PD-L1+ клетками, лишь небольшая доля PD-L1-позитивных элементов участвовала в данных взаимодействиях. Так,

медианное значение составило 4,91 % (3,0–6,6) от общего числа PD-L1+ клеток микроокружения. Это свидетельствует о том, что, несмотря на наличие экспрессии PD-L1, только ограниченная часть клеток реально вовлечена во взаимодействие с PD-1+ лимфоцитами, что может иметь принципиальное значение для понимания механизмов иммунной регуляции.

Дополнительно установлено, что вероятность формирования контактов определяется соотношением PD-1+ и PD-L1+ клеток в опухолевой ткани. Чем выше отношение числа PD-1+ клеток к количеству PD-L1+ клеток (показатель PD-1/PD-L1), тем выше вероятность выявления их ко-локализаций. У пациентов с наличием таких контактов соотношение PD-1/PD-L1 оказалось достоверно выше, чем у больных без них: медианные значения составили 0,46 (0,19–0,74) и 0,16 (0,02–0,42) соответственно ( $p = 0,0071$ ).

Таким образом, выявленные данные указывают на то, что не только абсолютное количество PD-L1+ клеток, но и соотношение PD-1/PD-L1 в микроокружении опухоли может определять вероятность межклеточных взаимодействий и, возможно, отражать активность иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1.

### **3.2.2 Частота встречаемости ко-локализованных макрофагов микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1**

Под термином «ко-локализованные макрофаги» подразумевались макрофаги микроокружения, которые несут PD-1 или PD-L1 и контактируют с другими иммунными клетками микроокружения, несущими соответствующий лиганд или рецептор. Ко-локализованные макрофаги были обнаружены у 64,1 % (у 25 из 39 пациентов). Частоты встречаемости ко-локализованных M1 макрофагов и ко-локализованных M2 макрофагов статистически значимо не различались (M1 – у 48,72 % пациентов (у 19 из 39 пациентов), M2 – у 56,41 %

(у 22 из 39 пациентов),  $p=0,6505$ ). Также нами было оценено участие M1 и M2 макрофагов в PD-1/PD-L1 контактах как в качестве клеток, несущих рецептор (PD-1), так и в качестве клеток, несущих лиганд (PD-L1) (Таблица 28).

Таблица 28 – Частота встречаемости ко-локализованных макрофагов в опухолевом микроокружении при раке молочной железы, (N=39, частоты встречаемости представлены в % (n/N))

|                       |    | Экспрессия PD-1/PD-L1                                                |                                            |                |
|-----------------------|----|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------|
|                       |    | PD1+                                                                 | PDL1+                                      | PD1+PDL1+      |
|                       |    | 1                                                                    | 2                                          | 3              |
| Тип ко-локализованных | M1 | 7,69% (3/39)<br>$p_{12}=\mathbf{0,0101}$<br>$p_{13}=\mathbf{0,0362}$ | 33,33% (13/39)<br>$p_{23}=0,8066$          | 28,21% (11/39) |
|                       | M2 | 5,13% (2/39)<br>$p_{12}<\mathbf{0,0001}$<br>$p_{13}=0,2626$          | 51,28% (20/39)<br>$p_{23}=\mathbf{0,0015}$ | 15,38% (6/39)  |
| pM1-M2                |    | $>0,9999$                                                            | 0,1687                                     | 0,2725         |

M1 макрофаги чаще участвовали в рассмотренных клеточных контактах в роли клеток, несущих лиганд PD-L1, а также клеток, несущих и PD-1, и PD-L1. M2 макрофаги были чаще ко-локализованы как клетки, несущие лиганд PD-L1. M1 и M2 макрофаги, несущие рецептор PD-1, одинаково редко контактировали с клетками, несущими лиганд PD-L1.

### 3.2.3 Взаимосвязь частоты встречаемости ко-локализованных клеток микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1, с различными клинико-морфологическими параметрами

Была изучена взаимосвязь частоты встречаемости ко-локализованных клеток микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1, в том числе макрофагов, с такими клинико-морфологическими параметрами, как молекулярно-

биологический подтип опухоли, лимфогенное и гематогенное метастазирование.

При сравнении частот встречаемости ко-локализованных клеток у пациентов с люминальным РМЖ и трижды негативным РМЖ статистически значимых различий обнаружено не было (Таблица 29).

Таблица 29 – Частота встречаемости ко-локализованных PD1+ и PDL1+ клеток у пациентов с раком молочной железы в зависимости от молекулярно-биологического подтипа опухоли

| Наличие ко-локализаций | Частота встречаемости ко-локализованных клеток, % (n/N) |                                 | p      |
|------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------|--------|
|                        | Люминальные А и В подтипы (N=22)                        | Трижды негативный подтип (N=17) |        |
| Нет                    | 22,73 % (5/22)                                          | 35,29 % (6/17)                  | 0,4824 |
| Есть                   | 77,27 % (17/22)                                         | 64,71 % (11/17)                 |        |

При этом сравнение числа пациентов с РМЖ люминальных А и В подтипов, у которых ко-локализации PD1+ и PDL1+ клеток встречались в количестве более 5 на 1000 клеток стромы и менее 5 на 1000 клеток стромы, показало, что у пациентов с трижды негативным РМЖ на уровне тенденции, близком к статистически значимому различию, чаще обнаруживаются ко-локализации PD1+ и PDL1+ клеток в количестве, превышающем 5 ко-локализаций на 1000 клеток стромы опухоли (у 41,18 % (7/11) пациентов с трижды негативным РМЖ и у 18,18 % (4/17) пациентов с люминальным А или В РМЖ,  $p = 0,0527$ ) (Таблица 30).

Таблица 30 – Количество ко-локализованных PD1+ и PDL1+ клеток у пациентов с раком молочной железы в зависимости от молекулярно-биологического подтипа опухоли

| Число ко-локализаций     | Частота встречаемости ко-локализованных клеток, % (n/N) |                                 | p      |
|--------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------|--------|
|                          | Люминальные А и В подтипы (N=22)                        | Трижды негативный подтип (N=17) |        |
| <5 на 1000 клеток стромы | 59,09% (13/17)                                          | 23,53% (4/11)                   | 0,0527 |
| >5 на 1000 клеток стромы | 18,18% (4/17)                                           | 41,18% (7/11)                   |        |

Затем было проведено сравнение частот встречаемости различных ко-локализованных макрофагов в строме опухоли у пациентов с люминальными подтипами и трижды негативным подтипом РМЖ, которое не показало статистически значимых различий (Таблица 31).

Таблица 31 – Частота встречаемости ко-локализованных макрофагов у пациентов с раком молочной железы в зависимости от молекулярно-биологического подтипа

| Тип ко-локализованных макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N) |                                 | p       |
|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------|
|                                  | Люминальные А и В подтипы (N=22)      | Трижды негативный подтип (N=17) |         |
| M1                               | 54,55 % (12/22)                       | 41,18 % (7/17)                  | 0,5231  |
| M2                               | 54,55 % (12/22)                       | 58,82 % (10/17)                 | >0,9999 |
| PD1+ M1                          | 0 % (0/22)                            | 17,65 % (3/17)                  | 0,0744  |
| PDL1+ M1                         | 36,36 % (8/22)                        | 29,41 % (5/17)                  | 0,7401  |
| PD1+PDL1+ M1                     | 22,73 % (5/22)                        | 35,29 % (6/17)                  | 0,4824  |
| PD1+ M2                          | 4,55 % (1/22)                         | 5,88 % (1/17)                   | >0,9999 |
| PDL1+ M2                         | 45,45 % (10/22)                       | 58,82 % (10/17)                 | 0,5231  |
| PD1+PDL1+ M2                     | 4,55 % (1/22)                         | 29,41 % (5/17)                  | 0,0684  |

Сравнение частот встречаемости ко-локализованных клеток у пациентов с метастазами в лимфатических узлах и без метастазов показало, что наличие

ко-локализованных клеток не было ассоциировано со статусом регионарных лимфатических узлов (Таблица 32).

Таблица 32 – Частота встречаемости ко-локализованных PD1+ и PDL1+ клеток у пациентов с раком молочной железы в зависимости от наличия метастазов в лимфатических узлах

| Число ко-локализаций     | Частота встречаемости клеток, % (n/N)    |                                           | p      |
|--------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|--------|
|                          | Лимфогенные метастазы отсутствуют (N=25) | Лимфогенные метастазы присутствуют (N=14) |        |
| Нет                      | 36 % (9/25)                              | 14,29 % (2/14)                            | 0,4425 |
| <5 на 1000 клеток стромы | 40 % (10/25)                             | 50 % (7/14)                               |        |
| >5 на 1000 клеток стромы | 24 % (6/25)                              | 35,71 % (5/14)                            |        |

При этом у пациентов с метастазами в лимфатических узлах ко-локализованные PD1+PDL1+ M1 макрофаги обнаруживаются чаще (50 % (7/14) и 16 % (4/25),  $p = 0,0331$ ) (Таблица 33).

Таблица 33 – Частота встречаемости ко-локализованных макрофагов у пациентов с раком молочной железы в зависимости от наличия метастазов в лимфатических узлах

| Тип ко-локализованных макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N)    |                                           | p             |
|----------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------|
|                                  | Лимфогенные метастазы отсутствуют (N=25) | Лимфогенные метастазы присутствуют (N=14) |               |
| M1                               | 44 % (11/25)                             | 57,14 % (8/14)                            | 0,4425        |
| M2                               | 48 % (12/25)                             | 71,43 % (10/14)                           | 0,1935        |
| PD1+ M1                          | 8 % (2/25)                               | 7,14 % (1/14)                             | >0,9999       |
| PDL1+ M1                         | 44 % (11/25)                             | 14,29 % (2/14)                            | 0,0826        |
| PD1+PDL1+ M1                     | 16 % (4/25)                              | 50 % (7/14)                               | <b>0,0331</b> |
| PD1+ M2                          | 4 % (1/25)                               | 7,14 % (1/14)                             | >0,9999       |
| PDL1+ M2                         | 48 % (12/25)                             | 57,14 % (8/14)                            | 0,7411        |
| PD1+PDL1+ M2                     | 12 % (3/25)                              | 21,43 % (3/14)                            | 0,6472        |

Также было показано, что контакты клеток, несущих PD-1 и PD-L1, у пациентов с отдаленными метастазами и без них встречались с частотами, не различающимися статистически значимо (Таблица 34).

Таблица 34 – Частота встречаемости ко-локализованных PD1+ и PDL1+ клеток у пациентов с раком молочной железы в зависимости от наличия отдаленных метастазов

| Число ко-локализаций     | Частота встречаемости клеток, % (n/N)     |                                           | p       |
|--------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|---------|
|                          | Гематогенные метастазы отсутствуют (N=31) | Гематогенные метастазы присутствуют (N=8) |         |
| Нет                      | 29,03 % (9/31)                            | 25 % (2/8)                                | >0,9999 |
| <5 на 1000 клеток стромы | 41,94 % (13/31)                           | 50 % (4/8)                                |         |
| >5 на 1000 клеток стромы | 29,03 % (9/31)                            | 25 % (2/8)                                |         |

Частоты встречаемости ко-локализованных макрофагов также не различались в зависимости от статуса гематогенного метастазирования (Таблица 35).

Таблица 35 – Частота встречаемости ко-локализованных макрофагов у пациентов с раком молочной железы в зависимости от наличия отдаленных метастазов

| Тип ко-локализованных макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N)     |                                           | p       |
|----------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|---------|
|                                  | Гематогенные метастазы отсутствуют (N=31) | Гематогенные метастазы присутствуют (N=8) |         |
| M1                               | 48,39 % (15/31)                           | 50 % (4/8)                                | >0,9999 |
| M2                               | 54,84 % (17/31)                           | 62,5 % (5/8)                              | >0,9999 |
| PD1+ M1                          | 9,68 % (3/31)                             | 0 % (0/8)                                 | >0,9999 |
| PDL1+ M1                         | 38,71 % (12/31)                           | 12,5 % (1/8)                              | 0,2286  |
| PD1+PDL1+ M1                     | 25,81 % (8/31)                            | 37,5 % (3/8)                              | 0,6632  |

Продолжение таблицы 35

| Тип ко-<br>локализованных<br>макрофагов | Частота встречаемости клеток, % (n/N)              |                                                    | p       |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------|
|                                         | Гематогенные<br>метастазы<br>отсутствуют<br>(N=31) | Гематогенные<br>метастазы<br>присутствуют<br>(N=8) |         |
| PD1+ M2                                 | 3,23 % (1/31)                                      | 12,5 % (1/8)                                       | 0,3725  |
| PDL1+ M2                                | 54,84 % (17/31)                                    | 37,5 % (3/8)                                       | 0,4506  |
| PD1+PDL1+ M2                            | 16,13 % (5/31)                                     | 12,5 % (1/8)                                       | >0,9999 |

Таким образом, у пациентов с трижды негативным РМЖ чаще (на уровне тенденции), чем у пациентов с РМЖ люминальных подтипов, обнаруживаются ко-локализации PD-1+ и PD-L1+ клеток в большом количестве (более 5 ко-локализаций на 1000 клеток стромы), но при этом не различается общая частота встречаемости ко-локализованных клеток. Следует отметить, что обнаруженные различия в количестве ко-локализованных PD-1+ и PD-L1+ клеток указывают на то, что в опухоли больных с трижды негативным РМЖ иммунная контрольная точка PD-1/PD-L1 более активна, а это важно, поскольку именно на этот механизм направлена анти-PD-1/PD-L1 иммунотерапия. С одной стороны, обнаруженная нами закономерность может дополнить перечень причин лучшего ответа на иммунотерапию у пациентов с трижды негативным РМЖ (более высокая мутационная нагрузка опухоли, повышенная экспрессия PD-L1 и более высокие уровни TILs в микроокружении по сравнению с другими подтипами РМЖ [151]). С другой стороны – ко-локализации PD-1+ и PD-L1+ клеток обнаруживаются в строме опухоли у пациентов с люминальными субтипами РМЖ, а это согласуется с данными о том, что у некоторых из них иммунотерапия, комбинированная с химиотерапией, улучшает ее эффект [27].

Сходные закономерности описаны и при других локализациях опухолей. Так, по данным J. Sánchez-Magraner и соавт., у пациентов с метастатическим

немелкоклеточным раком лёгкого, получавших анти-PD-1- или анти-PD-L1-терапию, показатели общей и безрецидивной выживаемости были выше при более частом выявлении взаимодействия PD-1/PD-L1 в опухоли, при этом данные различия не зависели от уровня экспрессии PD-L1 [141]. Аналогичные результаты продемонстрированы в исследовании A. Lindberg и соавт. [103]. Эти наблюдения подтверждают, что наличие в опухоли ко-локализованных PD-1+ и PD-L1+ клеток является более надёжным маркером активности иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1, чем положительный PD-L1 статус сам по себе. Предполагается, что в опухолях с частым взаимодействием PD-1 и PD-L1 именно данный путь играет ведущую роль в уклонении опухоли от иммунного надзора, что определяет более высокую вероятность ответа на терапию ингибиторами PD-1/PD-L1.

Вместе с тем проведённый нами анализ показал, что наличие ко-локализованных PD-1+ и PD-L1+ клеток в опухолевом микроокружении не ассоциировано с прогрессированием заболевания (возникновением гематогенных метастазов). Это может указывать на то, что рассматриваемые клеточные взаимодействия приводят преимущественно к функциональной дисфункции различных типов иммунных клеток микроокружения — не только M1- и M2-макрофагов, но также цитотоксических, хелперных и регуляторных Т-лимфоцитов, В-клеток и других, на которых также обнаруживается экспрессия PD-1 или PD-L1 [68]. В результате поддерживается определённый баланс проопухолевых и противоопухолевых популяций иммунных клеток стромы. Метастатическое же прогрессирование, вероятно, определяется совокупностью дополнительных факторов, не напрямую связанных с функционированием контрольной точки PD-1/PD-L1.

### 3.2.4 Клеточный состав PD1+PDL1+ спотов

Для пациентов с ТНPMЖ, которым был проведен пространственный анализ транскриптома Visium 10x, был проведен анализ клеточного состава PD1+PD1+ спотов. С помощью программы Loupe Browser 8.0.0 (10x Genomics, США) были отобраны споты, в которых сочетается экспрессия генов *PDCD1* (PD-1) и *CD274* (PD-L1). Всего было обнаружено 48 таких спотов у 9 пациентов из 11, включенных в исследование. Для определения типа клеток, составляющих каждый из выбранных спотов, был проведен анализ CIBERSORTx, для выполнения которого использовались данные scRNAseq из Атласа рака молочной железы в качестве референсного транскриптома [48]. На рисунке 12 представлено распределение различных типов иммунных клеток и фибробластов в PD1+PD-L1+ спотах у каждого из 9 пациентов с ТНPMЖ. Доли клеток рассчитаны относительно общего количества иммунных клеток и фибробластов в спотах. Кроме того, в анализируемых спотах также присутствовали опухолевые клетки, эндотелиальные клетки и другие типы, однако их количественное распределение в данном исследовании не оценивалось.

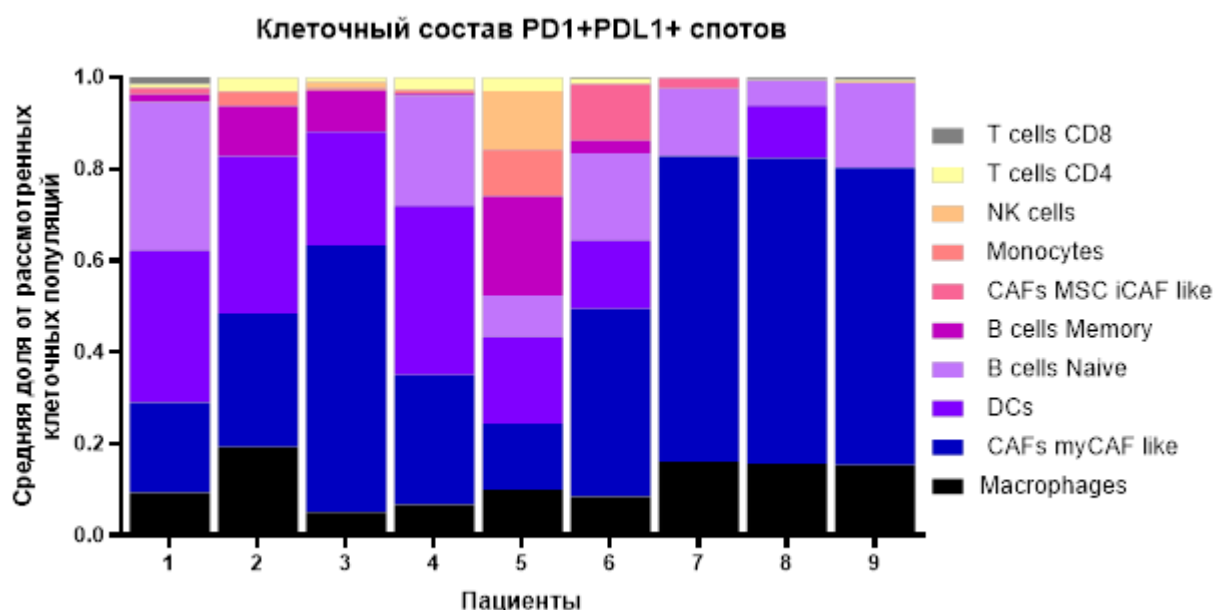


Рисунок 12 – Клеточный состав PD1+PDL1+ спотов у 9 пациентов с ТНРМЖ

Один спот представляет собой участок ткани диаметром 55 мкм, который обычно содержит несколько клеток. Поскольку пространственный транскриптомный анализ в данном случае имеет разрешение на уровне целого спота, а не отдельных клеток, данные об экспрессии генов (например, *PDCD1* и *CD274*) нельзя однозначно приписать конкретной клетке в пределах спота. В связи с этим для спотов с коэкспрессией генов *PDCD1* (PD-1) и *CD274* (PD-L1) возможны следующие сценарии:

- в состав спота входят клетки, одновременно экспрессирующие PD-1 и PD-L1 (PD1+PDL1+);
- в споте присутствуют PD1+ клетки, непосредственно контактирующие с PDL1+ клетками;
- в споте находятся PD-1+ и PD-L1+ клетки, которые не контактируют друг с другом, но расположены недалеко друг от друга.

Согласно полученным нами данным, макрофаги входят в состав PD1+PDL1+ спотов у всех пациентов и составляют до 20 % от общего числа иммунных клеток и фибробластов в этих спотах. Это подчеркивает, что роль

макрофагов в работе и регуляции иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 не ограничивается собственной экспрессией этих молекул, но также зачастую может включать влияние на соседние PD-1+ и PD-L1+ клетки (например, через паракринную сигнализацию или межклеточные взаимодействия).

### **3.3 Поиск предиктора длительности ответа на химиоиммунотерапию при PD-L1-позитивном метастатическом или прогрессирующем трижды негативном раке молочной железы**

В настоящее время известно, что положительный статус PD-L1 при РМЖ статистически достоверно ассоциирован с сокращением общей выживаемости, однако не демонстрирует значимой связи с показателями безметастатической выживаемости [36]. Ряд исследований продемонстрировал, что присутствие PD-L1-позитивных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов ассоциировано с улучшенными показателями выживаемости [75]. В то же время, значение экспрессии PD-L1 как прогностического маркера при раке остаётся предметом дискуссий, но именно этот показатель является единственным молекулярным маркером, служащим показателем возможной эффективности анти-PD-L1 иммунотерапии при метастатическом или прогрессирующем трижды негативном РМЖ. Однако, у части пациентов, получающих иммунотерапию, после непродолжительного улучшения возникает прогрессия. Была предпринята попытка изучить связь состава иммунных клеток микроокружения с длительностью ответа на химиоиммунотерапию, исходя из предположения, что различные типы иммунных клеток стромы опухоли играют различную роль в функционировании оси PD-1/PD-L1.

Для поиска предиктора длительности ответа была сформирована выборка, включающая 16 пациентов с метастатическим или прогрессирующим PD-L1-позитивным трижды негативным раком молочной железы, получавших

химиоиммунотерапию ингибитором PD-L1 атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом. У 6 пациентов продолжительность клинической эффективности данного типа терапии превышала 6 месяцев, а у 10 пациентов была короче 6 месяцев. Сформированные группы пациентов с коротким (КО) и длительным ответом (ДО) на терапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом сопоставимы по клиническим характеристикам и патологическим параметрам опухоли (Таблица 36).

Таблица 36 – Сравнение характеристик пациентов с длительным и коротким ответом на химиоиммунотерапию

|                                          |      | Длительный<br>ответ (N=6) | Короткий ответ<br>(N=10) | p       |
|------------------------------------------|------|---------------------------|--------------------------|---------|
| Возраст, Ме (Q1-Q3) лет                  |      | 52 (35,75-62)             | 41,5 (37,75-46,75)       | 0,4408  |
| НАХТ, % (n/N)                            |      | 83,33 % (5/6)             | 70 % (7/10)              | >0,9999 |
| Стадия, % (n/N)                          | I    | 16,67 % (1/6)             | 20 % (2/10)              | 0,9595  |
|                                          | IIA  | 0 % (0/6)                 | 10 % (1/10)              |         |
|                                          | IIB  | 33,33 % (2/6)             | 10 % (1/10)              |         |
|                                          | IIIB | 16,67 % (1/6)             | 30 % (3/10)              |         |
|                                          | IIIC | 16,67 % (1/6)             | 20 % (2/10)              |         |
|                                          | IV   | 16,67 % (1/6)             | 10 % (1/10)              |         |
| Степень<br>злокачественности,<br>% (n/N) | 2    | 66,67 % (4/6)             | 50 % (5/10)              | 0,6329  |
|                                          | 3    | 33,33 % (2/6)             | 50 % (5/10)              |         |
| Параметр Т, % (n/N)                      | 1    | 16,67 % (1/6)             | 30 % (3/10)              | >0,9999 |
|                                          | 2    | 33,33 % (2/6)             | 20 % (2/10)              |         |
|                                          | 4    | 50 % (3/6)                | 50 % (5/10)              |         |

Срезы ткани опухоли этих пациентов были окрашены методом TSA-модифицированной иммунофлуоресценции (Рисунок 13).

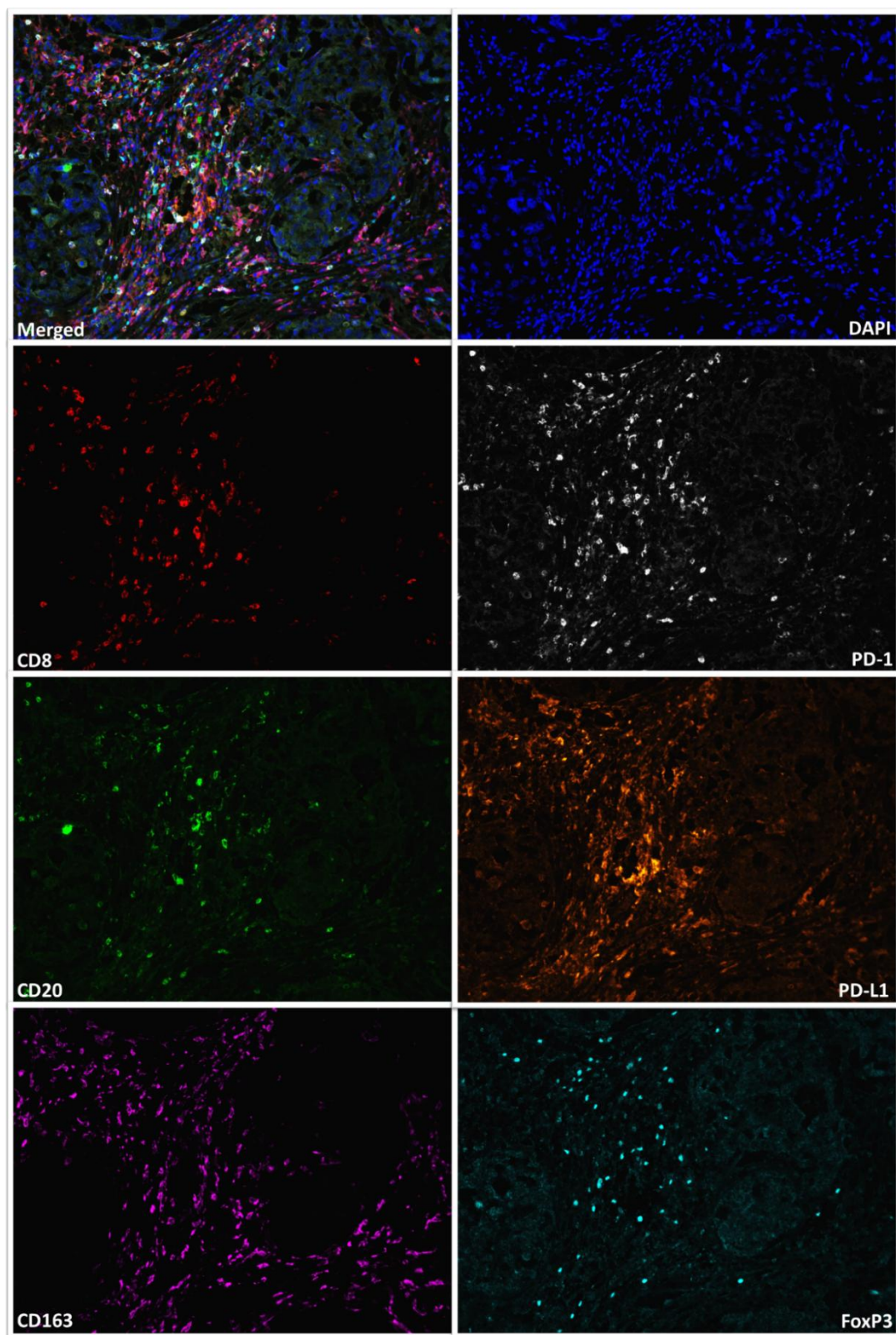


Рисунок 13 – TSA-модифицированная иммунофлуоресценция инвазивного рака молочной железы, увеличение  $\times 200$

Поскольку иммунотерапия направлена на взаимодействие PD-L1/PD-1, в исследовании были определены доли иммунных клеток в микроокружении опухоли, которые способны экспрессировать белки PD-L1 и PD-1, а также иммунных клеток, которые экспрессируют их. Эти показатели сравнивались между группами пациентов с длительным и коротким ответом на терапию атезолизумабом в сочетании с наб-паклитакселом.

### **3.3.1 Взаимосвязь количества и частоты встречаемости различных типов иммунных клеток в микроокружении опухоли с длительностью ответа на химиоиммунотерапию**

Различий в доле иммунных клеток стромы, экспрессирующих PD-L1 и PD-1, в зависимости от длительности ответа на химиоиммунотерапию не обнаружено (PD-L1: ДО против КО – 4,46 (2,28–8,12) % и 4,61 (2,81–11,73) %;  $p = 0,8896$ ; PD-1: ДО против КО – 2,94 (0,09–4,57) % и 2,93 (1,36–7,96) %;  $p = 0,6901$ ).

CD8<sup>+</sup> Т-клетки, CD163<sup>+</sup> макрофаги и FoxP3<sup>+</sup> Т-регуляторные клетки обнаруживались в опухолевом микроокружении 100 % пациенток независимо от длительности клинической эффективности терапии. Частота встречаемости В-клеток не различалась в группах пациентов с различной длительностью ответа на терапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом: у 83,33 % (5/6) пациентов с ДО и у 100 % (10/10) пациентов с КО;  $p = 0,3750$ .

Сравнение количества CD8<sup>+</sup> Т-клеток, CD20<sup>+</sup> В-клеток и FoxP3<sup>+</sup> Т-регуляторных клеток показало, что в опухолевом микроокружении доля указанных клеток не ассоциирована с длительностью ответа на терапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом. CD8<sup>+</sup> Т-клетки: ДО против КО – 2,39 (1,71–6,88) % и 8,21 (3,73–11,08) %;  $p = 0,2198$ ; CD20<sup>+</sup> В-клетки: ДО против КО – 2,34 (0,68–5,1) % и 2,34 (0,86–6,79) %;  $p = 0,6548$ ;

FoxP3+ Т-клетки: ДО против КО – 2,89 (1,01-5,06) % и 3,6 (1,89-5,08) %;  $p = 0,7128$ . В то же время обнаружено, что доля CD163+ макрофагов выше у пациентов с КО на терапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом: 12,43 (9,61-17,26) % у пациентов с КО против 5,8 (3,3-9,0) % у пациентов с ДО;  $p = 0,0160$  (Таблица 37).

Таблица 37 – Количество иммунных клеток в опухолевом микроокружении до начала химиоиммунотерапии у пациентов с длительным и коротким ответом

| Тип клеток                  | Количество клеток, Ме (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                       | p             |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------|
|                             | Длительный ответ (n=6)                                        | Короткий ответ (n=10) |               |
| CD8+ Т-клетки               | 2,39 (1,71-6,88)                                              | 8,21 (3,73-11,08)     | 0,2198        |
| CD20+ В-клетки              | 2,34 (0,68-5,1)                                               | 2,34 (0,86-6,79)      | 0,6548        |
| CD163+ макрофаги            | 5,8 (3,3-9,0)                                                 | 12,43 (9,61-17,26)    | <b>0,0160</b> |
| FoxP3+Т-регуляторные клетки | 2,89 (1,01-5,06)                                              | 3,6 (1,89-5,08)       | 0,7128        |

Обнаруженное различие в количестве CD163+ макрофагов в строме опухоли у пациентов с коротким и длительным ответом на химиоиммунотерапию было подтверждено с помощью permutation-теста (наблюдаемая разность медиан составила 6,625; количество permutation-выборок было равным 2000; количество permutation-выборок, для которых разность медиан была равной или превышала 6,625, составило 16;  $p = 0,008$ ).

Сравнение количества иммунных клеток микроокружения опухоли, экспрессирующих PD-1, у пациентов с длительным и коротким ответом на химиоиммунотерапию показало, что длительность ответа на данный тип терапии не ассоциирована ни с одним из этих параметров (PD1+ CD8+ Т-клетки: ДО – 1,37 (0,32-2,29) % и КО – 0,67 (0,12-3,19) %,  $p = 0,8591$ ; PD1+ CD20+ В-клетки: ДО – 0,25 (0,03-0,61) % и КО – 0,42 (0-1,24) %,  $p = 0,4539$ ; PD1+ CD163+ макрофаги: ДО – 0 (0-0,26) % и КО – 0,21 (0-0,38) %,  $p = 0,4079$ ;

PD1+ FoxP3+ Т-регуляторные клетки: ДО – 0,15 (0,05-2,81) % и КО – 0,48 (0-1,2) %,  $p > 0,9999$ ) (Таблица 38).

Таблица 38 – Количество иммунных клеток, экспрессирующих PD1, в опухолевом микроокружении до начала химиоиммунотерапии у пациентов с длительным и коротким ответом

| Тип клеток                       | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                       | p       |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------|---------|
|                                  | Длительный ответ (n=6)                                        | Короткий ответ (n=10) |         |
| PD1+ CD8+ Т-клетки               | 1,37 (0,32-2,29)                                              | 0,67 (0,12-3,19)      | 0,8591  |
| PD1+ CD20+ В-клетки              | 0,25 (0,03-0,61)                                              | 0,42 (0-1,24)         | 0,4539  |
| PD1+ CD163+ макрофаги            | 0 (0-0,26)                                                    | 0,21 (0-0,38)         | 0,4079  |
| PD1+ FoxP3+Т-регуляторные клетки | 0,15 (0,05-2,81)                                              | 0,48 (0-1,2)          | >0,9999 |

Доля иммунных клеток, экспрессирующих PD-L1, также не различалась у пациентов с длительным и коротким ответом (PDL1+ CD8+ Т-клетки: ДО – 0,33 (0,16-0,49) % и КО – 0,52 (0,11-0,99) %,  $p = 0,6571$ ; PDL1+ CD20+ В-клетки: ДО – 0,19 (0,11-2,18) % и КО – 0,11 (0,05-0,52) %,  $p = 0,3810$ ; PDL1+ CD163+ макрофаги: ДО – 2,63 (0,68-3,25) % и КО – 3,51 (1,76-9,62) %,  $p = 0,4762$ ; PDL1+ FoxP3+ Т-регуляторные клетки: ДО – 0,29 (0,1-1,74) % и КО – 0,17 (0,12-0,27) %,  $p = 0,8619$ ) (Таблица 39).

Таблица 39 – Количество иммунных клеток, экспрессирующих PD-L1, в опухолевом микроокружении до начала химиоиммунотерапии у пациентов с длительным и коротким ответом

| Тип клеток           | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от общего числа клеток стромы |                       | p      |
|----------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------|--------|
|                      | Длительный ответ (n=6)                                        | Короткий ответ (n=10) |        |
| PDL1+ CD8+ Т-клетки  | 0,33 (0,16-0,49)                                              | 0,52 (0,11-0,99)      | 0,6571 |
| PDL1+ CD20+ В-клетки | 0,19 (0,11-2,18)                                              | 0,11 (0,05-0,52)      | 0,3810 |

*Продолжение таблицы 39*

| Тип клеток                             | Количество клеток, Me (Q1-Q3) % от<br>общего числа клеток стромы |                          | p      |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------|
|                                        | Длительный ответ<br>(n=6)                                        | Короткий ответ<br>(n=10) |        |
| PDL1+ CD163+ макрофаги                 | 2,63 (0,68-3,25)                                                 | 3,51 (1,76-9,62)         | 0,4762 |
| PDL1+ FoxP3+ T-<br>регуляторные клетки | 0,29 (0,1-1,74)                                                  | 0,17 (0,12-0,27)         | 0,8619 |

Таким образом количество всех рассмотренных популяций иммунных клеток с учетом экспрессии на них PD-L1 и PD-1 не различалось в когортах пациентов с длительным и коротким ответом на химиоиммунотерапию. Только доля CD163+ макрофагов в опухолевом микроокружении являлась ассоциированной с длительностью ответа на химиоиммунотерапию у больных метастатическим или прогрессирующим ТНPMЖ.

### **3.3.2 Оценка предиктивной ценности параметров микроокружения**

Для оценки предиктивной ценности доли CD163+ макрофагов в строме опухоли как маркера длительности ответа на терапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом было определено пороговое значение и проведен ROC-анализ (Рисунок 14).

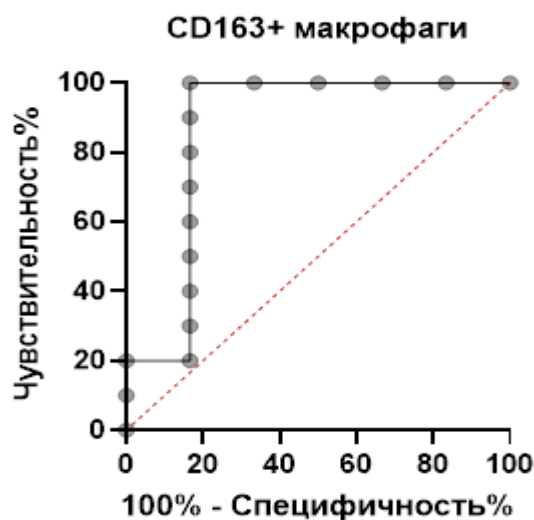


Рисунок 14 – ROC-анализ значимости количества CD163+ макрофагов в микроокружении опухоли в качестве предиктора эффективности терапии атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом у пациентов с трижды негативным раком молочной железы

Площадь под кривой составила 0,87 (95 % ДИ 0,62-1,00;  $p = 0,0170$ ), а пороговое значение эффективности предсказательного маркера (доля CD163+ макрофагов в клетках стромы, измеряемая в % от общего числа клеток стромы) равнялось 7,08 %. Доля CD163+ макрофагов в микроокружения превышала порог 7,08 % у 100 % пациентов (10/10) с коротким ответом на терапию атезолизумабом и наб-паклитакселом и у 16,67 % пациентов (1/6) с длительным ответом. Чувствительность предиктивного критерия составила 100 %, а специфичность – 83,33 %.

С помощью метода простой логистической регрессии была построена математическая модель, предсказывающая вероятность короткого ответа на терапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом у больных метастатическим или прогрессирующим ТНРМЖ с позитивным PD-L1 статусом.

Значение вероятности короткого ответа на химиоиммунотерапию  $P$  определяют по формуле:

$$P = \frac{e^{-2,935+0,3626 \times X}}{1 + e^{-2,935+0,3626 \times X}}$$

где

$e$  – математическая константа, равная 2,72,

$X$  – это доля CD163+ макрофагов в строме опухоли,

При значении  $P \geq 50\%$  определяют высокий риск короткого ответа на химиоиммунотерапию, а при  $P < 50\%$  – низкий риск короткого ответа на химиоиммунотерапию (Рисунок 15).

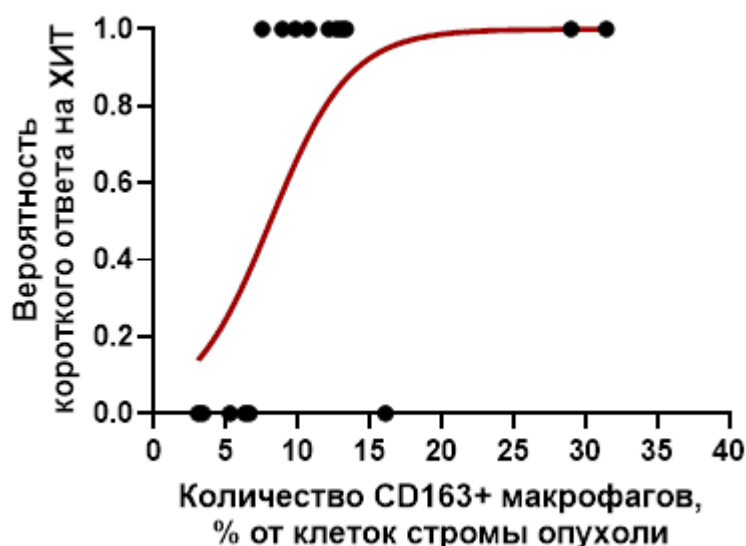


Рисунок 15 – Математическая модель, предсказывающая вероятность короткого ответа на терапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом у больных метастатическим или прогрессирующим ТНРМЖ с позитивным PD-L1 статусом первичной опухоли

Разработанная модель показала высокую степень достоверности ( $p = 0,0097$ ), что подтверждает её прогностическую ценность. Полученные

данные позволяют использовать её для стратификации пациенток с метастатическим или прогрессирующим ТНРМЖ и прогнозирования эффективности химиоиммунотерапии атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом.

### **3.4 Характеристики макрофагов, ассоциированных с длительностью ответа на химиоиммунотерапию при PD-L1-позитивном метастатическом или прогрессирующем трижды негативном раке молочной железы**

Популяция CD163+ макрофагов обнаруживается в строме у большинства больных РМЖ. Несмотря на то, что высокая доля CD163+ макрофагов является предиктором короткого ответа на химиоиммунотерапию, у пациентов с длительным ответом макрофаги в микроокружении также присутствуют. Однако мы предположили, что функциональное состояние макрофагов в строме опухоли у пациентов с длительным и коротким ответом может различаться.

#### **3.4.1 Сравнение функциональной характеристики макрофагов микроокружения у пациентов с раком молочной железы, стратифицированных в соответствии с вероятностью длительного и короткого ответа на терапию химиоиммунотерапию**

Были изучены транскриптомные особенности макрофагов у 11 пациентов с ТНРМЖ, стратифицированных в соответствии с длительностью вероятного ответа химиоиммунотерапию. Для стратификации пациентов на группы было проведено иммуногистохимическое окрашивание. Пациенты, у которых доля CD163+ макрофагов в строме была ниже 7 %, были отнесены в группу с вероятностью длительного ответа. Пациенты, у которых доля CD163+ макрофагов в строме превышала 7 %, были отнесены в группу с вероятностью короткого ответа (Рисунок 16).

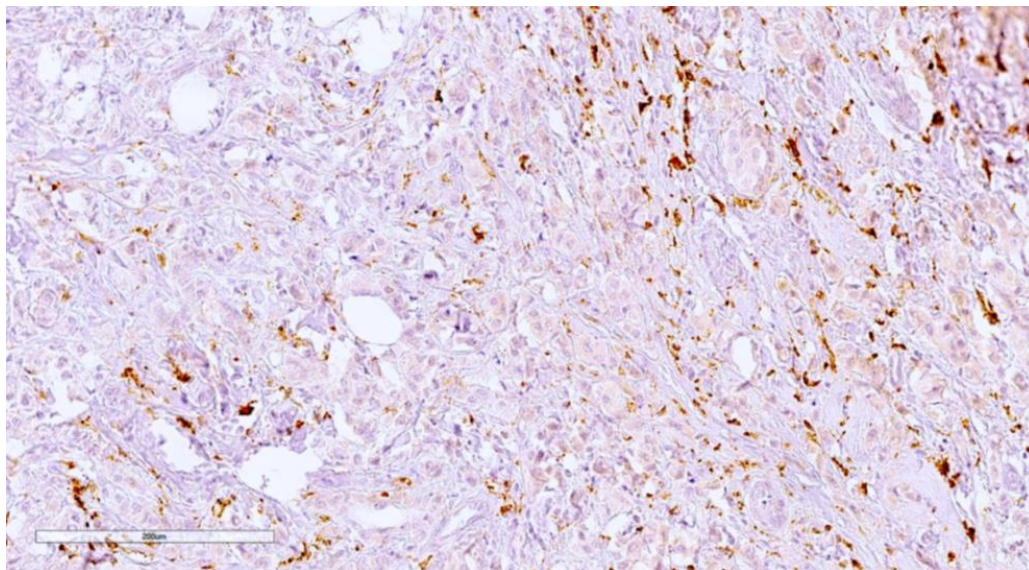


Рисунок 16 – Иммуногистохимическое окрашивание CD163+ клеток в строме опухоли при раке молочной железы, увеличение  $\times 200$

Основываясь на результатах пространственного анализа транскриптома Visium 10x, мы провели сравнение доли стромальных спотов, экспрессирующих гены функциональных маркеров макрофагов и цитокинов в двух группах больных: с вероятностью длительного и с вероятностью короткого ответа на химиоиммунотерапию (Таблица 40).

Таблица 40 – Экспрессия генов функциональных маркеров макрофагов в спотах опухолевой ткани в группах больных, стратифицированных в соответствии с вероятностью длительного и короткого ответа на химиоиммунотерапию

| Ген                  | Группа 1<br>(длительный ответ) | Группа 2<br>(короткий ответ) | p            |
|----------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------|
| <i>CD16 (FCGR3A)</i> | 1819/4645 (39,2 %)             | 1007/2839 (35,5 %)           | <b>0,001</b> |
| <i>CD64 (FCGR1A)</i> | 724/4645 (15,6 %)              | 358/2839 (12,6 %)            | <b>0,001</b> |
| <i>TREM-1</i>        | 316/4645 (6,8 %)               | 429/2839 (15,1 %)            | <b>0,001</b> |
| <i>VISTA (VSIR)</i>  | 1346/4645 (28,9 %)             | 843/2839 (29,7 %)            | 0,03         |
| <i>CD206 (MRC1)</i>  | 735/4645 (15,8 %)              | 531/2839 (18,7 %)            | <b>0,001</b> |

У больных с вероятностью длительного ответа на химиоиммунотерапию в стромальных спотах наблюдалась достоверно более высокая экспрессия генов

*CD16 (FCGR3A)* и *CD64 (FCGR1A)*, в большей степени ассоциированных с M1 фенотипом макрофагов. У пациентов с вероятностью короткого ответа преобладали маркеры M2 макрофагов *TREM-1*, *VISTA* и *CD206*.

Экспрессия генов цитокинов также определялась в стромальных спотах ткани РМЖ в двух группах больных (Таблица 41).

Таблица 41 – Экспрессия генов цитокинов в спотах ткани рака молочной железы в группах пациентов, стратифицированных в соответствии с вероятностью длительного и короткого ответа на химиоиммунотерапию

| Ген                            | Группа 1<br>(длительный ответ) | Группа 2<br>(короткий ответ) | p             |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------|
| <i>IL12</i>                    | 187/4240 (4,4 %)               | 33/2656 (1,2 %)              | <b>0,0001</b> |
| <i>IL10</i>                    | 102/4240 (2,4 %)               | 99/2656 (3,7 %)              | <b>0,002</b>  |
| <i>TNF-<math>\alpha</math></i> | 578/4240 (13,6 %)              | 324/2656 (12,2 %)            | 0,09          |
| <i>IL4</i>                     | 0/4240 (0,0 %)                 | 1/2656 (0,04 %)              | 0,39          |
| <i>TGF-<math>\beta</math></i>  | 1963/4240 (46,3 %)             | 1320/2656 (49,7 %)           | <b>0,006</b>  |

Экспрессия генов проопухолевых цитокинов *IL10* и *TGF- $\beta$*  достоверно чаще обнаруживалась в спотах опухолевой ткани у пациентов с вероятностью короткого ответа на химиоиммунотерапию. В спотах у пациентов с вероятностью длительного ответа на химиоиммунотерапию чаще обнаруживалась экспрессия гена противоопухолевого цитокина *IL12*.

### 3.4.2 Транскриптомные особенности микроокружения опухоли у пациентов с раком молочной железы, стратифицированных в соответствии с вероятностью длительного и короткого ответа на химиоиммунотерапию

Был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов в стромальных спотах у больных ТНРМЖ с вероятностью длительного и вероятностью

короткого ответа на химиоиммунотерапию. В результате был сформирован список топ-50 дифференциально экспрессирующихся генов, из которого были выбраны гены, ассоциированные с функцией макрофагов в опухолевом микроокружении.

В случаях с низкой долей CD163<sup>+</sup> макрофагов в строме, то есть вероятностью длительного ответа на химиоиммунотерапию, в стромальных спотах наблюдалось увеличение экспрессии генов *CXCL10*, *CXCL9*, *S100A14*, *APOC1*, *CHI3L2*, ассоциированных с функционалом макрофагов. Хемокины *CXCL10* и *CXCL9* регулируют миграцию, дифференцировку и активацию иммунных клеток, в свою очередь, привлечение лимфоцитов в опухолевое микроокружение может быть ключом к хорошему ответу на иммунотерапию [160]. В исследовании House и соавт. было показано, что экспрессия *CXCL9* и *CXCL10* в опухоли у мышей увеличивается после блокады иммунных контрольных точек и характерна для макрофагов микроокружения, а нейтрализация рецептора этих хемокинов (*CXCR3*) снижала эффективность блокады PD-1/PD-L1 [74]. С другой стороны, экспрессия *S100A14* тесно связана с экспрессией хемокинов *CCL2/CXCL5*, которые являются хемоаттрактантами макрофагов и влияют на их поляризацию. Показано, что высокая экспрессия этих белков коррелирует с худшими клиническими исходами РМЖ [101]. *APOC1* также способствует поляризации M2 макрофагов посредством взаимодействия с CD163 и CD206 [136]. *CHI3L2* принадлежит к семейству хитиназоподобных белков и играет роль в прогрессировании при некоторых видах рака, включая РМЖ и глиому. Кроме того, в литературе показана способность *CHI3L2* индуцировать апоптоз CD8<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов [107].

У пациенток с высокой долей CD163<sup>+</sup> макрофагов, что ассоциируется с вероятностью короткого ответа на химиоиммунотерапию, в опухолевом микроокружении выявлено повышение экспрессии генов *VEGFA*, *FN1*,

ANXA1, THBS1, участвующих в подавлении воспалительной реакции и ремоделировании стромы, а также одного из генов II класса HLA — HLA-DRB1.

Ген *VEGFA* (Vascular endothelial growth factor A) кодирует ангиогенный фактор, индуцирующий пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток сосудов. FN1 (Fibronectin 1), секретируемый опухоль-ассоциированными макрофагами и фибробластами, способствует метастазированию и изменяет транскриптом клеток через сигнальный путь JUN–Nippro, описанный при гепатоцеллюлярной карциноме, но, вероятно, обладающий универсальным значением при злокачественных новообразованиях [178]. ANXA1 (Annexin A1) обладает противовоспалительными свойствами и препятствует инфильтрации опухоли иммунными клетками; его экспрессия в мезенхимальных клетках положительно коррелирует с экспрессией PD-L1 [150]. Нокдаун *ANXA1* сопровождается увеличением соотношения M1/M2-макрофагов и способствует активации Т-лимфоцитов в опухолевом микроокружении. THBS1 (Thrombospondin 1) участвует в прогрессии опухоли за счёт истощения цитотоксических Т-клеток и нарушения васкуляризации; показано, что потеря THBS1 в микроокружении опухоли у мышей повышает чувствительность к терапии ингибиторами PD-1/PD-L1 [127].

Исходя из полученных данных можно предположить, что для макрофагов микроокружения у больных с предположительно длительным ответом на иммунотерапию характерна экспрессия хемокинов, привлекающих в микроокружение как противоопухолевые, так и проопухолевые популяции иммунных клеток, а также участие в механизмах прогрессирования заболевания. Макрофаги у больных с высокой вероятностью короткого ответа, предположительно, в большей степени секретируют факторы, способствующие ангиогенезу, истощению иммунных клеток микроокружения, а также поддержанию M2 поляризации макрофагов. Эти данные показывают, что не

только количество, но и функциональное состояние макрофагов является ключевой особенностью в определении ответов на ингибиторы иммунных контрольных точек.

### **3.4.3 Биологические процессы и молекулярные функции, характерные для иммунных клеток микроокружения опухоли у пациентов с раком молочной железы, стратифицированных в соответствии с вероятностью длительного и короткого ответа на химиоиммунотерапию**

С помощью анализа функционального обогащения дифференциально экспрессированных генов были выявлены биологические процессы (GOBP – Gene Ontology Biological Process), в которые вовлечены гены с повышенной экспрессией. Основные биологические процессы, которые в значительной степени были обогащены в иммунных клетках, в том числе макрофагах, опухолевого микроокружения (в стромальном кластере) у пациентов с РМЖ с вероятностью длительного ответа на химиоиммунотерапию представлены на рисунке 17.

| Entrez Gene Id | Gene Symbol                                                                               | GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_RESPONSE | GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS | HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE | GOBP_REGULATION_OF_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS | GOBP_INNATE_IMMUNE_RESPONSE | GOBP_REGULATION_OF_IMMUNE_RESPONSE | HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE | GOBP_BIOLOGICAL_PROCESS_INVOLVED_IN_INTERSPECIES_INTERACTION_BETWEEN_ORGANISMS | GOBP_DEFENSE_RESPONSE_TO_OTHER_ORGANISM | GOBP_DEFENSE_RESPONSE |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|
| 972            | CD74                                                                                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 9636           | ISG15                                                                                     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 54625          | PARP14                                                                                    |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 4792           | NFKB1A                                                                                    |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 3627           | CXCL10                                                                                    |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 684            | BST2                                                                                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 6772           | STAT1                                                                                     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 4599           | MX1                                                                                       |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 3429           | IFI27                                                                                     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 4939           | OAS2                                                                                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 10964          | IFI44L                                                                                    |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 4283           | CXCL9                                                                                     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 2207           | FCER1G                                                                                    |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 3113           | HLA-DPA1                                                                                  |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 1520           | CTSS                                                                                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 3134           | HLA-F                                                                                     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 2633           | GBP1                                                                                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 7305           | TYROBP                                                                                    |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 713            | C1QB                                                                                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 57402          | S100A14                                                                                   |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 348            | APOE                                                                                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 5788           | PTPRC                                                                                     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 3500           | IGHG1                                                                                     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 10537          | UBD                                                                                       |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 1536           | CYBB                                                                                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 2537           | IFI6                                                                                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 4069           | LYZ                                                                                       |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 23406          | COTL1                                                                                     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 6890           | TAP1                                                                                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 7805           | LAPTM5                                                                                    |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 9332           | CD163                                                                                     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
| 9335           | IL32                                                                                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | CD74 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1697]                                          |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | ISG15 ubiquitin like modifier [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4053]                          |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | poly(ADP-ribose) polymerase family member 14 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29232]          |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | NFKB inhibitor alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7797]                                   |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | C-X-C motif chemokine ligand 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10637]                       |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | bone marrow stromal cell antigen 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1119]                     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | signal transducer and activator of transcription 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11362]    |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | MX dynamin like GTPase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7532]                               |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | interferon alpha inducible protein 27 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5397]                  |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | 2'-5'-oligoadenylate synthetase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8087]                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | interferon induced protein 44 like [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17817]                    |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | C-X-C motif chemokine ligand 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7098]                         |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | Fe epsilon receptor 1g [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3611]                                 |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4938] |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | cathepsin S [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2545]                                            |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | major histocompatibility complex, class I, F [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4963]           |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | guanylate binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4182]                            |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | transmembrane immune signaling adaptor TYROBP [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12449]         |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | complement C1q B chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1242]                                 |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | S100 calcium binding protein A14 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18901]                      |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | apolipoprotein E [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:613]                                        |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | protein tyrosine phosphatase receptor type C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9666]           |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5525]     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | ubiquitin D [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18795]                                           |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | cytochrome b-245 beta chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2578]                            |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | interferon alpha inducible protein 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4054]                   |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | lysozyme [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6740]                                               |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | coactosin like F-actin binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18304]              |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | transporter 1, ATP binding cassette subfamily B member [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:43]   |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | lysosomal protein transmembrane 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29612]                     |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | CD163 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1631]                                         |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |
|                | Interleukin 32 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16830]                                        |                                             |                                                   |                                    |                                          |                             |                                    |                                    |                                                                                |                                         |                       |

Рисунок 17 – Биологические процессы с набором соответствующих им генов, активные в иммунных клетках стромы опухоли, у больных РМЖ с вероятностью длительного ответа на иммунотерапию

В таблице 42 представлены биологические процессы, которые имеют отношение к реализации иммунного ответа.

Таблица 42 – Биологические процессы, характерные для иммунных клеток стромы опухоли, у больных раком молочной железы с вероятностью длительного ответа на иммунотерапию

| Биологический процесс                             | Описание                                                                                                                                                                                                                              | p        |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| GOBP DEFENSE RESPONSE                             | Реакции, возникающие в ответ на присутствие инородного тела или возникновение травмы, которые приводят к ограничению повреждения организма, подвергшегося атаке, или предотвращению/выздоровлению от инфекции, вызванной атакой [77]. | 1,28e-27 |
| HALLMARK INTERFERON GAMMA RESPONSE                | Гены, активирующиеся в ответ на IFNG [86].                                                                                                                                                                                            | 2,38e-22 |
| GOBP REGULATION OF IMMUNE RESPONSE                | Любой процесс, который модулирует частоту, скорость или степень иммунного ответа, иммунологической реакции организма на иммуногенный стимул [80].                                                                                     | 1,83e-20 |
| GOBP INNATE IMMUNE RESPONSE                       | Врожденные иммунные реакции – это защитные реакции, опосредованные компонентами, кодируемыми зародышевой линией, которые напрямую распознают компоненты потенциальных патогенов [78].                                                 | 3,94e-20 |
| GOBP POSITIVE REGULATION OF IMMUNE SYSTEM PROCESS | Любой процесс, который активирует или увеличивает частоту, скорость или степень иммунного процесса [79].                                                                                                                              | 1,73e-16 |

Также были выявлены молекулярные функции (GOMF – Gene Ontology Molecular Function), характерные для стромального кластера у пациентов с вероятностью короткого и длительного ответа на химиоиммунотерапию. В группе пациентов с низкой долей CD163+ макрофагов в строме, то есть вероятностью длительного ответа на химиоиммунотерапию, иммунные клетки демонстрировали молекулярные функции, представленные на рисунке 18.

| Entrez Gene Id | Gene Symbol | Gene Description                                                                          |
|----------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3122           | HLA-DRA     | major histocompatibility complex, class II, DR alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4947]   |
| 3113           | HLA-DPA1    | major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4938] |
| 3108           | HLA-DMA     | major histocompatibility complex, class II, DM alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4934]   |
| 3109           | HLA-DMB     | major histocompatibility complex, class II, DM beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4935]    |
| 3115           | HLA-DPB1    | major histocompatibility complex, class II, DP beta 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4940]  |
| 6890           | TAP1        | transporter 1, ATP binding cassette subfamily B member [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:43]   |
| 3134           | HLA-F       | major histocompatibility complex, class I, F [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4963]           |
| 972            | CD74        | CD74 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1697]                                          |
| 348            | APOE        | apolipoprotein E [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:613]                                        |
| 4792           | NFKBIA      | NFkB inhibitor alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7797]                                   |
| 3500           | IGHG1       | immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5525]     |
| 6772           | STAT1       | signal transducer and activator of transcription 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11362]    |
| 5788           | PTPRC       | protein tyrosine phosphatase receptor type C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9666]           |
| 9636           | ISG15       | ISG15 ubiquitin like modifier [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4053]                          |
| 2207           | FCER1G      | Fc epsilon receptor Ig [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3611]                                 |
| 2633           | GBP1        | guanylate binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4182]                            |
| 1520           | CTSS        | cathepsin S [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2545]                                            |
| 23406          | COTL1       | coactosin like F-actin binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18304]              |
| 10537          | UBD         | ubiquitin D [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18795]                                           |
| 7305           | TYROBP      | transmembrane immune signaling adaptor TYROBP [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12449]         |
| 3627           | CXCL10      | C-X-C motif chemokine ligand 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10637]                       |
| 4283           | CXCL9       | C-X-C motif chemokine ligand 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7098]                         |
| 57402          | SX00A14     | S100 calcium binding protein A14 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18901]                      |
| 9235           | IL32        | interleukin 32 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16830]                                        |
| 684            | BST2        | bone marrow stromal cell antigen 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1119]                     |
| 7453           | WARS1       | tryptophanyl-tRNA synthetase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12729]                        |
| 8566           | PDXK        | pyridoxal kinase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8819]                                       |
| 1536           | CYBB        | cytochrome b-245 beta chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2578]                            |

Рисунок 18 – Молекулярные функции с набором соответствующих им генов, активные в иммунных клетках стромы, у больных раком молочной железы с вероятностью длительного ответа на иммунотерапию

В таблице 43 представлено описание молекулярных функций, связанных с реализацией иммунного ответа

Таблица 43 – Молекулярные функции, характерные для иммунных клеток стромы опухоли, у больных РМЖ с вероятностью длительного ответа на иммунотерапию

| Молекулярная функция                      | Описание                                                           | p        |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------|
| GOMF PEPTIDE ANTIGEN BINDING              | Связывание с антигенным пептидом [84].                             | 2,89e-10 |
| GOMF MHC CLASS II PROTEIN COMPLEX BINDING | Связывание с главным комплексом гистосовместимости класса II [82]. | 4,92e-10 |

Продолжение таблицы 43

| Молекулярная функция             | Описание                                                                                                                                                                                                                                   | p       |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| GOMF MHC PROTEIN COMPLEX BINDING | Связывание с главным комплексом гистосовместимости [83].                                                                                                                                                                                   | 2,55e-9 |
| GOMF PEPTIDE BINDING             | Связывание с пептидом – органическим соединением, состоящим из двух или более аминокислот, соединенных пептидными связями [85].                                                                                                            | 2,69e-9 |
| GOMF ANTIGEN BINDING             | Связывание с антигеном – любым веществом, способным вызывать специфический иммунный ответ и реагировать с продуктами этого ответа – специфическим антителом или специфически сенсibilизированными Т-лимфоцитами, или и тем, и другим [81]. | 9,8e-9  |

В нашем исследовании были изучены характеристики стромы опухоли у пациентов с ТНРМЖ, которым потенциально могла бы быть назначена иммунотерапия. Полученные данные о транскриптомных особенностях иммунных клеток, в том числе макрофагов, в совокупности с данными транскрипционной активности сигнальных путей говорят о том, что вероятность длительного ответа на иммунотерапию, определенная согласно обнаруженному нами критерию – доле в строме опухоли CD163+ макрофагов, ассоциирована с различными проявлениями иммунного ответа, включая активацию IFN $\gamma$ -зависимых генов, усиление врожденного иммунного ответа, повышение презентации антигена через главный комплекс гистосовместимости, а также усиленное связывание с антигенными пептидами. Также стоит отметить, что описанные биологические процессы и молекулярные функции были подавлены в иммунных клетках микроокружения опухоли у больных РМЖ с вероятностью короткого ответа. Это указывает на то, что у больных с вероятностью короткого ответа иммунные клетки формируют в

опухолевом микроокружении иммуносупрессорную среду с дефицитом иммунного ответа. В исследовании Shiao S.L. и соавт. была использована опухолевая ткань, пациентов с ТНРМЖ, которые получали иммунотерапию. В этом исследовании было обнаружено, что у пациентов с ТНРМЖ, ответивших на иммунотерапию, в опухолевой строме до лечения наблюдалась высокая экспрессия главного комплекса гистосовместимости, присутствовали третичные лимфоидные структуры и другие признаки функционирования противоопухолевого иммунитета [145]. В таком случае, низкая доля CD163+ макрофагов в строме опухоли может служить маркером активной иммунной среды, которая, в свою очередь, является необходимым условием для успешного ответа на иммунотерапию.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования анализировалась не только взаимосвязь функционального состояния макрофагов опухолевого микроокружения с клинико-морфологическими характеристиками опухоли и PD-L1 статусом, но также их возможная роль в формировании устойчивости и ограничении эффективности иммунотерапии. В проведенной нами работе, показано, что преобладание проопухолевого микроокружения и редкие контакты между PD-L1-позитивными и PD-1-позитивными клетками могут быть потенциальными причинами отсутствия эффекта иммунотерапии у пациенток с ТНРМЖ. Наши данные показывают, что макрофаги, будучи важнейшими регуляторами противоопухолевого иммунитета, участвуют в описанных выше механизмах.

Были изучены частота встречаемости и количество M1 и M2 макрофагов, экспрессирующих рецептор PD-1 или/и лиганд PD-L1, в микроокружении опухоли у пациентов с РМЖ. Установлено, что M1 макрофаги встречаются у 94,87 % пациентов в количестве 1,81 (1,1-3,69) % от общего числа клеток стромы, а M2 макрофаги у 100 % пациентов и в большем количестве – 10,6 (8,13-12,88) % от общего числа клеток стромы ( $p < 0,0001$ ). Причем среди общего числа макрофагов стромы опухоли было больше PD1–PDL1+ M2 макрофагов (12,15 (5,05-20,86) %), чем PD1–PDL1+ M1 макрофагов (5,09 (1,79-11,11) %) ( $p < 0,0001$ ), а доля PD1+PDL1– M2 макрофагов и PD1+PDL1– M1 макрофагов была низкой и не различалась. Данные литературы относительно роли PD-L1+ макрофагов в опухоли противоречивы, однако в большей степени демонстрируется их иммуносупрессивная роль: с одной стороны, они подавляют активность Т-клеток, поляризуясь в M2 фенотип и поддерживая свой иммуносупрессивный цитокиновый профиль, и защищают опухолевые клетки от иммунного ответа [100], с другой стороны, высокое количество

CD68+PD-L1+ макрофагов в опухолевой строме при ТНРМЖ ассоциировалось с более высокой общей выживаемостью [167]. Согласно полученным нами данным, частота встречаемости и количество PD1+PDL1– M2 макрофагов были выше при тройном негативном раке, чем при люминальных карциномах, частота встречаемости и количество PD1–PDL1+ и PD1+PDL1– макрофагов не ассоциированы с прогрессированием заболевания, то есть возникновением лимфогенных и гематогенных метастазов.

Особое значение в проведённом исследовании имело изучение функциональных характеристик макрофагов у пациенток с ТНРМЖ в зависимости от PD-L1 статуса. Доля M1- и M2-макрофагов в опухолевой строме не различалась между группами с позитивным и негативным PD-L1 статусом. Вместе с тем PD-L1-позитивные опухоли характеризовались увеличением числа PD-1-экспрессирующих M1- и M2-макрофагов, что сопровождалось повышением общей доли PD-1+ клеток в микроокружении по сравнению с PD-L1-негативными случаями. В строме PD-L1-позитивных опухолей значительная часть PD-L1+ клеток также представлена макрофагами, преимущественно M2-фенотипа. Эти данные позволяют предположить, что как M1-, так и M2-макрофаги в PD-L1-позитивных опухолях участвуют в функционировании иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 как в качестве клеток, экспрессирующих рецептор PD-1, так и в качестве клеток, экспрессирующих его лиганд PD-L1. Данное предположение подтверждается результатами многоцветной иммунофлуоресценции, выявившей прямые контакты PD-1+ и PD-L1+ клеток стромы, среди которых определялись и M1-, и M2-макрофаги.

Если рассматривать PD-1+ макрофаги как клетки-мишени супрессии, а PD-L1+ макрофаги — как клетки-супрессоры, то в строме PD-L1-позитивных опухолей может происходить угнетение функций как M1-, так и M2-макрофагов через активацию иммунной контрольной точки. При этом вклад

M2-макрофагов в подавление PD-1<sup>+</sup> клеток, вероятно, более выражен, чем M1, что согласуется с существующими представлениями о различии их биологических функций в опухолевом микроокружении и может иметь значение для прогнозирования эффективности анти-PD-1/PD-L1 терапии.

Дополнительно, с использованием метода пространственного профилирования транскриптома Visium 10x были выявлены различия в иммунологических процессах, вовлекающих макрофаги, в зависимости от PD-L1 статуса. Так, в PD-L1-позитивных случаях в CD68<sup>+</sup> кластере были обогащены процессы, связанные с миграцией, хемотаксисом и регуляцией лимфоцитов и миелоидных клеток, тогда как в CD163<sup>+</sup> кластере эти процессы проявлялись менее выражено. В PD-L1-негативных опухолях в CD68<sup>+</sup> кластере преобладали процессы, связанные со сборкой молекул МНС-II, презентацией антигенов, позитивной регуляцией активации лимфоцитов (включая Т-клетки), функционированием сигнальных путей иммунных рецепторов, реализацией гуморального иммунного ответа и регуляцией воспалительных и репаративных процессов. В то же время CD163<sup>+</sup> кластер в PD-L1-негативных случаях характеризовался обогащением процессов, связанных с гуморальным иммунным ответом, активацией и супрессией иммунных клеток, реакцией на TGF- $\beta$  и TNF, регуляцией ангиогенеза и пролиферации фибробластов.

Таким образом, CD68<sup>+</sup> макрофаги при PD-L1-негативном статусе вовлечены преимущественно в антигенпрезентацию, а при PD-L1-позитивном — в рекрутирование лимфоцитов; напротив, CD163<sup>+</sup> макрофаги мало участвуют в презентации антигенов, но играют роль в ангиогенезе и развитии фиброза, особенно при PD-L1-негативных опухолях.

Кроме того, обнаружены различия в экспрессии генов рецепторов контрольных точек иммунного ответа в кластерах CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup> в зависимости от PD-L1 статуса. Так, при PD-L1-позитивном статусе в CD68<sup>+</sup>

кластере отмечалось снижение экспрессии *HAVCR2* (TIM-3) ( $p = 0,023$ ), в CD163+ кластере — повышение экспрессии *CTLA4* (CTLA-4) ( $p = 0,021$ ) и снижение экспрессии *SIRPA* (SIRP- $\alpha$ ) ( $p=0,0001$ ), тогда как уровень экспрессии генов *PDCD1* (PD-1), *LAG3* (LAG-3), *TIGIT* (TIGIT) не различался. Выявленные различия подтверждают, что роль макрофагов в регуляции противоопухолевого иммунного ответа, включая их участие в функционировании иммунных контрольных точек, существенно варьирует в зависимости от PD-L1 статуса опухоли.

В дальнейшем в нашем исследовании было установлено, что количественная оценка CD163+ макрофагов в опухолевом микроокружении позволяет предсказать длительность клинической эффективности терапии атезолизумабом в сочетании с наб-паклитакселом у пациенток с метастатическим или прогрессирующим трижды негативным РМЖ и положительным PD-L1 статусом ещё до начала лечения. Прогностическая модель продемонстрировала чувствительность 100 % и специфичность 83,33 %. Пороговым значением являлась доля CD163+ макрофагов в микроокружении менее 7,08 %, что рассматривалось как предиктор длительного ответа на химиоиммунотерапию.

Следует отметить, что предикторная роль CD163+ макрофагов при иммунотерапии ранее была показана в исследовании M. Larroquette и соавт. у больных немелкоклеточным раком лёгкого [96]. Кроме того, высокий уровень CD163+ клеток в первичной опухоли ассоциирован с более короткой выживаемостью у пациенток с метастатическим РМЖ [104]. Также мы показали, что у больных трижды негативным РМЖ с вероятностью длительного и с вероятностью короткого ответа на химиоиммунотерапию, стратифицированных на эти две группы в соответствии с количеством CD163+ макрофагов в строме опухоли, существенно различались транскриптомные характеристики стромальных иммунных клеток. У пациентов с высокой долей

CD163<sup>+</sup> макрофагов в строме и вероятностью короткого ответа стромальные споты характеризовалась более интенсивной экспрессией генов маркеров M2 макрофагов *TREM-1*, *VISTA* и *CD206*, генов противовоспалительных цитокинов *IL10* и *TGF- $\beta$* , генов, связанных с подавлением воспаления и ремоделированием стромы *VEGFA*, *FN1*, *ANXA1*, *THBS1*, в сравнении с пациентами с вероятностью длительного ответа на проводимое лечение. У пациентов с низкой долей CD163<sup>+</sup> макрофагов в строме и вероятностью длительного ответа на химиоиммунотерапию в стромальных спотах наблюдалась достоверно более высокая экспрессия генов *CD16* (FCGR3A) и *CD64* (FCGR1A), в большей степени ассоциированных с M1 фенотипом макрофагов, гена противоопухолевого цитокина *IL12*, стимулирующего Т-клетки, а также генов хемокинов *CXCL10* и *CXCL9*, участвующих в привлечении лимфоцитов в опухолевое микроокружение, чем у пациентов с вероятностью короткого ответа. Кроме того, у пациентов с вероятностью длительного ответа на химиоиммунотерапию были более функциональны сигнальные пути и молекулярные функции, связанные с распознаванием опухолевых антигенов и презентацией их лимфоцитам, а также с секрецией провоспалительных цитокинов и хемокинов, привлекающих другие иммунные клетки. Таким образом, стратифицировав пациентов (которым химиоиммунотерапия не была проведена) в соответствии с обнаруженным нами новым прогностическим критерием длительности ответа на химиоиммунотерапию, мы выявили, что у группы с прогнозируемым длительным ответом в микроокружении опухоли активны ключевые противоопухолевые иммунные механизмы, способствующие успешному результату химиоиммунотерапии. Это указывает на то, что предложенный нами маркер может эффективно прогнозировать ответ на данный тип терапии.

Таким образом, возникновение лимфогенных и гематогенных метастазов не связано с особенностями макрофагального состава опухолевого

микроокружения, однако были обнаружены различия для пациентов с трижды негативным РМЖ и РМЖ люминальных подтипов. У больных трижды негативным РМЖ при позитивном PD-L1 статусе в опухолевой строме больше PD-L1+ макрофагов, а также наблюдаются различия транскриптного профиля, указывающие на различную роль макрофагов в иммунном ответе, в сравнении с негативным PD-L1 статусом. Кроме того, мы обнаружили, что количество CD163+ макрофагов в строме опухоли до начала терапии атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом имеет значение для прогнозирования длительности ответа на данный тип терапии. При этом пациенты, стратифицированные по выявленному критерию, но не получавшие химиоиммунотерапию, имеют различия в иммунологических процессах в строме опухоли. Полученные нами результаты подчеркивают значимость макрофагов как клеток, принимающих участие в формировании иммунологического ландшафта опухоли, влияющего на результат иммунотерапии. Это указывает на то, что стратегии, направленные на поляризацию макрофагов микроокружения, в комбинации с иммунотерапией могли бы улучшить ее эффективность.

## ВЫВОДЫ

1. У больных раком молочной железы в ткани первичной опухоли M1 макрофаги выявляются в 94,9 % случаев, M2 макрофаги – во всех наблюдениях (100 %), при этом их доля в 10 раз выше, чем клеток с M1 фенотипом. Субпопуляция PD1–PDL1+ M2 макрофагов встречается чаще, чем субпопуляция PD1–PDL1+ M1 макрофагов, а количество PD1+PDL1– макрофагов обоих фенотипов в строме опухоли не различается.
2. Частота и количество M1 и M2 макрофагов с фенотипами PD1–PDL1–, PD1+PDL1–, PD1–PDL1+ и PD1+PDL1+ в опухолевом микроокружении первичной опухоли рака молочной железы не различаются в зависимости от наличия лимфогенных и гематогенных метастазов. При трижды негативном раке молочной железы частота встречаемости и доля PD1+PDL1– M2 макрофагов статистически значимо выше, чем при люминальных подтипах опухоли (58,82 % (10/17) против 9,09 % (2/22),  $p = 0,0014$ ; 0,03 (0-0,14) % против 0 (0-0) %,  $p = 0,0007$ , соответственно). При трижды негативном раке молочной железы с PD-L1-позитивным статусом доля PD1+ M1 макрофагов и PD1+ M2 макрофагов статистически значимо выше, чем при трижды негативном раке молочной железы с PD-L1-негативным статусом (0,95 (0,15-1,42) % против 0,02 (0-0,1),  $p = 0,0073$ ; 0,27 (0,15-0,73) % против 0 (0-0,15) %,  $p = 0,0085$ , соответственно).
3. У пациентов с PD-L1-позитивным статусом опухоли в CD68+ кластере обогащены процессы, связанные с миграцией и хемотаксисом лимфоцитов и миелоидных клеток, при этом в CD163+ кластере аналогичные процессы выражены слабее. При PD-L1-негативных опухолях в CD68+ кластере преобладают процессы антигенпрезентации, активации Т-лимфоцитов, гуморального иммунного ответа, регуляции воспаления и репарации; в CD163+ кластере – гуморального иммунного ответа, активации и супрессии

иммунных клеток, реакции на TGF- $\beta$  и TNF, регуляции ангиогенеза и пролиферации фибробластов.

4. В CD68<sup>+</sup> кластере опухолевого микроокружения при PD-L1-позитивных опухолях экспрессия гена *HAVCR2* (TIM-3) статистически значимо ниже, чем при PD-L1-негативных опухолях ( $p = 0,023$ ). В CD163<sup>+</sup> кластере при PD-L1-позитивных опухолях экспрессия гена *CTLA4* (CTLA-4) статистически значимо выше ( $p = 0,021$ ), а гена *SIRPA* (SIRP- $\alpha$ ) – ниже ( $p = 0,0001$ ), чем при PD-L1-негативных опухолях. Экспрессия генов *PDCD1*, *LAG3* и *TIGIT*, кодирующих рецепторы иммунных контрольных точек, в CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup> кластерах не различается в зависимости от PD-L1-статуса первичной опухоли.
5. У 71,8 % больных раком молочной железы в опухолевом микроокружении выявляется ко-локализация иммунных клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, при этом частота её обнаружения не зависит от молекулярного подтипа опухоли и наличия регионарных и отдаленных метастазов. Ко-локализованные M1 макрофаги встречаются у 48,7 % пациентов, а M2 макрофаги – у 56,4 %. В зонах опухолевого микроокружения с коэкспрессией генов *PDCD1* (PD-1) и *CD274* (PD-L1) макрофаги составляют до 20 % клеточного состава стромы.
6. У пациентов с трижды негативным раком молочной железы доля CD163<sup>+</sup> макрофагов в строме опухоли, превышающая 7,08 %, ассоциирована с коротким ответом на химиоиммунотерапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом. Данные макрофаги характеризуются повышенной экспрессией генов-маркеров M2 фенотипа макрофагов – *TREM-1*, *VISTA* и *CD206*, генов проопухолевых цитокинов *IL10* и TGF- $\beta$  и генов *VEGFA*, *FN1*, *ANXA1*, *THBS1*, связанных с подавлением воспаления и ремоделированием стромы.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

У пациенток с метастатическим или прогрессирующим трижды негативным раком молочной железы с PD-L1-позитивным статусом при морфологическом исследовании биопсийного материала первичной опухоли целесообразно определять количество CD163+ макрофагов в строме. Пороговое значение 7,08 % от общего числа клеток стромы может использоваться как маркер риска раннего прекращения ответа на химиоиммунотерапию атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом. Чувствительность предиктора – 100 %, специфичность – 83,3 %.

Для прогнозирования индивидуальной вероятности короткого ответа рекомендуется использовать предложенную математическую модель:

$$P = \frac{e^{-2,935+0,3626 \times X}}{1 + e^{-2,935+0,3626 \times X}}$$

где P — вероятность короткого ответа (менее 6 месяцев), X — доля CD163+ макрофагов в строме опухоли (%).

При  $P \geq 50$  % прогнозируется высокий риск короткого ответа.

При  $P < 50$  % прогнозируется низкий риск короткого ответа.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДО – длительный ответ

КО – короткий ответ

МОО – микроокружение опухоли

РМЖ – рак молочной железы

ТНРМЖ – трижды негативный рак молочной железы

ANXA1 – annexin A1 – аннексин A1

CD – cluster of differentiation – кластер дифференцировки

CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 – цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4

CXCL – chemokine (C-X-C motif) ligand – хемокиновый лиганд, принадлежащий к семейству хемокинов CXC

ER – estrogen receptor –рецептор эстрогена

FN1 – fibronectin 1 – фибронектин 1

FoxP3 – forkhead box protein P3 – белок P3 семейства FOX

GOBP – Gene Ontology Biological Process

GOMF – Gene Ontology Molecular Function

HAVCR2 – hepatitis A virus cellular receptor 2 – клеточный рецептор вируса гепатита A 2

HER2 – human epidermal growth factor receptor 2 – рецептор второго типа к человеческому эпидермальному фактору роста

HRP – horseradish peroxidase – пероксидаза хрена

IL – interleukin – интерлейкин

LAG-3 – lymphocyte-activation gene 3 – ген активации лимфоцитов 3

panCK – pan-cytokeratin – пан-цитокератин

PD-1 – programmed cell death protein 1 – белок программированной клеточной смерти 1

PD-L1 – programmed cell death ligand 1 – лиганд белка программированной клеточной смерти 1

PR – progesterone receptor –рецептор прогестерона

ROC – receiver operating characteristic – рабочая характеристика приемника

SIRP- $\alpha$  – signal regulatory protein alpha – сигнальный регуляторный белок альфа

TGF- $\beta$  – transforming growth factor  $\beta$  – трансформирующий фактор роста  $\beta$

THBS1 – thrombospondin 1 – тромбоспондин 1

TIGIT – T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains – Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM

TILs – tumor infiltrating lymphocytes – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

TIM-3 – T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 – Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина 3

TNF- $\alpha$  – tumor necrosis factor  $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$

TREM-1 – triggering receptors expressed on myeloid cells 1 – триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 1

TSA – tyramide signal amplification – тирамидная амплификация сигнала

VEGFA – vascular endothelial growth factor A – фактор роста эндотелия сосудов A

VISTA – V-domain Ig suppressor of T cell activation – V-домен-содержащий Ig-супрессор активации Т-клеток

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, – 2024. – 276 с.
2. Перельмутер В.М. Иммуновоспалительные реакции в микроокружении гетерогенны, пластичны, определяют противоопухолевый эффект или агрессивное поведение опухоли / В.М. Перельмутер, Л.А. Таширева, В.Н. Манских [и др.] // Журнал общей биологии. – 2017. – Т. 78. – № 5. – С. 15-36.
3. Таширева Л.А. Прогностическая значимость количества опухолеинфильтрирующих лимфоцитов при различных молекулярных подтипах рака молочной железы / Л.А. Таширева, Л.С. Ляпунова, А.В. Бузенкова [и др.] // Гены и Клетки. – 2020. – Т. 15. – № 2. – С. 89-95.
4. Тест VENTANA PD-L1 (SP142) Assay, Выявление пациентов с тройным негативным раком молочной железы (ТНРМЖ), подходящих для терапии препаратом ТЕЦЕНТРИК®, режим доступа: [https://med.roche.ru/content/dam/hcp-portals/russia/documents/oncology/roc/%D0%A2%D0%B5%D1%81%D1%82%20VENTANA%20PD-L1%20\(SP142\)%20Assay.pdf](https://med.roche.ru/content/dam/hcp-portals/russia/documents/oncology/roc/%D0%A2%D0%B5%D1%81%D1%82%20VENTANA%20PD-L1%20(SP142)%20Assay.pdf)
5. Тюляндин С.А. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы / С.А. Тюляндин, Е.В. Артамонова, А.Н. Жигулев [и др.] // Практические рекомендации RUSSCO, часть 1. Злокачественные опухоли. – 2023. – Т. 13. – С. 157-200.
6. Ades F. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives / F. Ades, D. Zardavas, I. Bozovic-Spasojevic [и др.] // Journal of Clinical Oncology. – 2014. – Vol. 32(25). – P. 2794-2803.
7. Ahmed F.S. PD-L1 Protein Expression on Both Tumor Cells and Macrophages are Associated with Response to Neoadjuvant Durvalumab with Chemotherapy in Triple-negative Breast Cancer / F.S. Ahmed, P. Gaule, J. McGuire [и др.] // Clinical Cancer Research. – 2020. – Vol. 26(20). – P. 5456-5461.
8. Allison E. Breast Cancer Survival Outcomes and Tumor-Associated Macrophage Markers: A Systematic Review and Meta-Analysis / E. Allison, S. Edirimanne, J. Matthews, S.J. Fuller // Oncology and therapy. – 2023. – Vol. 11(1). – P. 27-48.
9. Atashgaran V. Dissecting the Biology of Menstrual Cycle-Associated Breast Cancer Risk / V. Atashgaran, J. Wrin, S.C. Barry [и др.] // Frontiers in oncology. – 2016. – Vol. 6. – P. 267.
10. Azad A.K. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics / A.K. Azad, M.V. Rajaram, L.S.

- Schlesinger // Journal of cytology & molecular biology. – 2014. – Vol. 1(1). – P. 1000003.
11. Bassez A. A single-cell map of intratumoral changes during anti-PD1 treatment of patients with breast cancer / A. Bassez, H. Vos, L. Van Dyck [и др.] // Nature medicine. – 2021. – Vol. 27(5). – P. 820-832.
  12. Ben-Chetrit N. Breast Cancer Macrophage Heterogeneity and Self-renewal are Determined by Spatial Localization / N. Ben-Chetrit, X. Niu, J. Sotelo [и др.] // bioRxiv : the preprint server for biology. – 2023.
  13. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects / G. Berke // Annual review of immunology. – 1994. – Vol. 12. – P. 735-773.
  14. Binnewies M. Targeting TREM2 on tumor-associated macrophages enhances immunotherapy / M. Binnewies, J.L. Pollack, J. Rudolph [и др.] // Cell reports. – 2021. – Vol. 37(3). – P. 109844.
  15. Blighe K. EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling / K. Blighe, S. Rana, M. Lewis // GitHub. – 2018.
  16. Blows F.M. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies / F.M. Blows, K.E. Driver, M.K. Schmidt [и др.] // PLoS medicine. – 2010. – Vol. 7(5). – P. e1000279.
  17. Boieri M. CD4+ T helper 2 cells suppress breast cancer by inducing terminal differentiation / M. Boieri, A. Malishkevich, R. Guennoun [и др.] // The Journal of experimental medicine. – 2022. – Vol. 219(7). – P. e20201963.
  18. Borst J. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy / J. Borst, T. Ahrends, N. Bąbała [и др.] // Nature reviews. Immunology. – 2018. – Vol. 18(10). – P. 635-647.
  19. Braumüller H. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence / H. Braumüller, T. Wieder, E. Brenner [и др.] // Nature. – 2013. – Vol. 494(7437). – P. 361-365.
  20. Breast cancer Histologic grading, режим доступа: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignanthistologic.html>
  21. Breast cancer Molecular subtypes, режим доступа: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmolecularsubtypes.html>
  22. Brierley J.D. TNM classification of malignant tumours / J.D. Brierley, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind // John Wiley & Sons. – 2017.
  23. Brockhoff G. The presence of PD-1 positive tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancers is associated with a favorable outcome of disease / G. Brockhoff, S. Seitz, F. Weber [и др.] // Oncotarget. – 2017. – Vol. 9(5). – P. 6201-6212.

- 24.Cai H. Defects in macrophage reprogramming in cancer therapy: The negative impact of PD-L1/ PD-1 / H. Cai, Y. Zhang, J. Wang, J. Gu // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 690869.
- 25.Campbell M.J. Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome / M.J. Campbell, N.Y. Tonlaar, E.R. Garwood [и др.] // *Breast cancer research and treatment*. – 2011. – Vol. 128(3). – P. 703–711.
- 26.Cancer today, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, режим доступа: <https://gco.iarc.fr/today/en>
- 27.Cardoso F. KEYNOTE-756: Phase III study of neoadjuvant pembrolizumab (pembro) or placebo (pbo) + chemotherapy (chemo), followed by adjuvant pembro or pbo + endocrine therapy (ET) for early-stage high-risk ER+/HER2–breast cancer / F. Cardoso, H.L. McArthur, P. Schmid [и др.] // *Annals of Oncology*. – 2023. – Vol. 34(Supplement 2). – P. S1260-S1261.
- 28.Carter J.M. Characteristics and Spatially Defined Immune (micro)landscapes of Early-stage PD-L1-positive Triple-negative Breast Cancer / J.M. Carter, M.C. Polley, R.A. Leon-Ferre [и др.] // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 2021. – Vol. 27(20). – P. 5628-5637.
- 29.Chang K. Comprehensive Molecular Analyses of an M2-Like Tumor-Associated Macrophage for Predicting the Prognosis and Immunotherapy in Breast Cancer / K. Chang, Q. Yue, L. Jin [и др.] // *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*. – 2024. – Vol. 47(6). – P. 205-215.
- 30.Chatsirisupachai K. Age-associated differences in the cancer molecular landscape / K. Chatsirisupachai, C. Lagger, J.P. de Magalhães // *Trends in cancer*. – 2022. – Vol. 8(11). – P. 962–971.
- 31.Chen B. Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT / B. Chen, M.S. Khodadoust, C.L. Liu [и др.] // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. – 2018. – Vol. 1711. – P. 243-259.
- 32.Chen H.L. Effect of Age on Breast Cancer Patient Prognoses: A Population-Based Study Using the SEER 18 Database / H.L. Chen, M.Q. Zhou, W. Tian [и др.] // *PloS one*. – 2016. – Vol. 11(10). – P. e0165409.
- 33.Chen W.C. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor / W.C. Chen, Y.H. Lai, H.Y. Chen [и др.] // *Histopathology*. – 2013. – Vol. 63(2). – P. 225-233.
- 34.Chen Y. Pharmaceutical targeting Th2-mediated immunity enhances immunotherapy response in breast cancer / Y. Chen, J. Sun, Y. Luo [и др.] // *Journal of translational medicine*. – 2022. – Vol. 20(1). – P. 615.
- 35.Chow A. Clinical implications of T cell exhaustion for cancer immunotherapy / A. Chow, K. Perica, C.A. Klebanoff, J.D. Wolchok // *Nature reviews. Clinical oncology*. – 2022. – Vol. 19(12). – P. 775-790.

- 36.Cirqueira M.B. Prognostic Role of PD-L1 Expression in Invasive Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / M.B. Cirqueira, C.R. Mendonça, M. Noll [и др.] // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13(23). – P. 6090.
- 37.Cortes J. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial / J. Cortes, D.W. Cescon, H.S. Rugo [и др.] // *Lancet* (London, England). – 2020. – Vol. 396(10265). – P. 1817-1828.
- 38.Criscitiello C. Tumor-associated antigens in breast cancer / C. Criscitiello // *Breast care* (Basel, Switzerland). – 2012. – Vol. 7(4). – P. 262-266.
- 39.Curigliano G. Expression of tumor-associated antigens in breast cancer subtypes / G. Curigliano, V. Bagnardi, M. Ghioni [и др.] // *Breast* (Edinburgh, Scotland). – 2020. – Vol. 49. – P. 202-209.
- 40.DeNardo D.G. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages / D.G. DeNardo, J.B. Barreto, P. Andreu [и др.] // *Cancer cell*. – 2009. – Vol. 16(2). – P. 91-102.
- 41.DeNardo D.G. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy / D.G. DeNardo, B. Ruffell // *Nature Reviews Immunology*. – 2019. – Vol. 19. – P. 369-382.
- 42.Denkert C. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy / C. Denkert, G. von Minckwitz, S. Darb-Esfahani [и др.] // *The Lancet. Oncology*. – 2018. – Vol. 19(1). – P. 40-50.
- 43.Dill E.A. PD-L1 Expression and Intratumoral Heterogeneity Across Breast Cancer Subtypes and Stages: An Assessment of 245 Primary and 40 Metastatic Tumors / E.A. Dill, A.A. Gru, K.A. Atkins [и др.] // *The American journal of surgical pathology*. – 2017. – Vol. 41(3). – P. 334-342.
- 44.Dvir K. Immunotherapy in Breast Cancer / K. Dvir, S. Giordano, J.P. Leone // *International journal of molecular sciences*. – 2024. – Vol. 25(14). – P. 7517.
- 45.Eisenhauer E.A. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1) / E.A. Eisenhauer, P. Therasse, J. Bogaerts [и др.] // *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990). – 2009. – Vol. 45(2). – P. 228-247.
- 46.El Bairi K. The tale of TILs in breast cancer: a report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group / K. El Bairi, H.R. Haynes, E. Blackley [и др.] // *NPJ breast cancer*. – 2021. – Vol. 7(1). – P. 150.
- 47.Elomaa H. Spatially resolved multimarker evaluation of CD274 (PD-L1)/PDCD1 (PD-1) immune checkpoint expression and macrophage polarisation in colorectal cancer / H. Elomaa, M. Ahtiainen, S.A. Väyrynen [и др.] // *British Journal of Cancer*. – 2023. – Vol. 128. – P. 2104-2115.

48. Entire Breast Cancer Atlas, режим доступа: [https://singlecell.broadinstitute.org/single\\_cell/study/SCP1039/a-single-cell-and-spatially-resolved-atlas-of-human-breast-cancers#study-visualize](https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP1039/a-single-cell-and-spatially-resolved-atlas-of-human-breast-cancers#study-visualize)
49. Erbe R. Evaluating the impact of age on immune checkpoint therapy biomarkers / R. Erbe, Z. Wang, S. Wu [и др.] // Cell reports. – 2021. – Vol. 36(8). – P. 109599.
50. Etzerodt A. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects / A. Etzerodt, S.K. Moestrup // Antioxidants & redox signaling. – 2013. – Vol. 18(17). – P. 2352-2363.
51. Falvo P. Age-dependent differences in breast tumor microenvironment: challenges and opportunities for efficacy studies in preclinical models / P. Falvo, S. Gruener, S. Orecchioni [и др.] // Cell death and differentiation. – 2025. – Vol. 32(6). – P. 1000–1013.
52. Fane M. How the ageing microenvironment influences tumour progression / M. Fane, A.T. Weeraratna // Nature reviews. Cancer. – 2020. – Vol. 20(2). – P. 89–106.
53. Fattori S. Therapeutic Targeting of Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells in Breast Cancer / S. Fattori, H. Roux, E. Connen [и др.] // Cancer research. – 2022. – Vol. 82(21). – P. 3868-3879.
54. FDA approves atezolizumab for PD-L1 positive unresectable locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer, режим доступа: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-atezolizumab-pd-l1-positive-unresectable-locally-advanced-or-metastatic-triple-negative>
55. FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for locally recurrent unresectable or metastatic triple negative breast cancer, режим доступа: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-pembrolizumab-locally-recurrent-unresectable-or-metastatic-triple>
56. FDA issues alert about efficacy and potential safety concerns with atezolizumab in combination with paclitaxel for treatment of breast cancer , режим доступа: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-issues-alert-about-efficacy-and-potential-safety-concerns-atezolizumab-combination-paclitaxel>
57. Foulkes W.D. Triple-negative breast cancer / W.D. Foulkes, I.E. Smith, J.S. Reis-Filho // New England journal of medicine. – 2010. – Vol. 363(20). – P. 1938-1948.
58. Gao J.J. Luminal A breast cancer and molecular assays: a review / J.J. Gao, S.M. Swain // The oncologist. – 2018. – Vol. 23(5). – P. 556.
59. Gene Expression Omnibus, GSE242311, режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE242311>
60. Gordon S. Alternative activation of macrophages / S. Gordon // Nature reviews. Immunology. – 2003. – Vol. 3(1). – P. 23-35.

61. Gordon S.R. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity / S.R. Gordon, R.L. Maute, B.W. Dulken [и др.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 545(7655). – P. 495-499.
62. Guéry L. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity / L. Guéry, S. Hugues // *BioMed research international*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 314620.
63. Gunnarsdottir F.B. Breast cancer associated CD169<sup>++</sup> macrophages possess broad immunosuppressive functions but enhance antibody secretion by activated B cells / F.B. Gunnarsdottir, O. Briem, A.Y. Lindgren [и др.] // *Frontiers in immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1180209.
64. Gutiérrez-Melo N. T follicular helper cells in cancer / N. Gutiérrez-Melo, D. Baumjohann // *Trends in cancer*. – 2023. – Vol. 9(4). – P. 309-325.
65. Gu-Trantien C. CD4<sup>+</sup> follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival / C. Gu-Trantien, S. Loi, S. Garaud [и др.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2013. – Vol. 123(7). – P. 2873-2892.
66. Hafemeister C. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression / C. Hafemeister, R. Satija // *Genome Biology*. – 2019. – Vol. 20. – P. 296.
67. Hammond M.E. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version) / M.E. Hammond, D.F. Hayes, M. Dowsett [и др.] // *Archives of pathology & laboratory medicine*. – 2010. – Vol. 134(7). – P. e48-e72.
68. Han Y. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer / Y. Han, D. Liu, L. Li // *American journal of cancer research*. – 2020. – Vol. 10(3). – P. 727-742.
69. Hao Y. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis / Y. Hao, T. Stuart, M.H. Kowalski [и др.] // *Nature Biotechnology*. – 2024. – Vol. 42. – P. 293-304.
70. HER2 Testing in Breast Cancer - 2023 Guideline Update, режим доступа: <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cap-guidelines/current-cap-guidelines/recommendations-for-human-epidermal-growth-factor-2-testing-in-breast-cancer>
71. Hodson L.J. Macrophage phenotype in the mammary gland fluctuates over the course of the estrous cycle and is regulated by ovarian steroid hormones / L.J. Hodson, A.C. Chua, A. Evdokiou [и др.] // *Biology of reproduction*. – 2013. – Vol. 89(3). – P. 65.
72. Hollern D.P. B Cells and T Follicular Helper Cells Mediate Response to Checkpoint Inhibitors in High Mutation Burden Mouse Models of Breast Cancer / D.P. Hollern, N. Xu, A. Thennavan [и др.] // *Cell*. – 2019. – Vol. 179(5). – P. 1191-1206.

73. Horwitz K.B. 90 YEARS OF PROGESTERONE: Progesterone and progesterone receptors in breast cancer: past, present, future / K.B. Horwitz, C.A. Sartorius // Journal of molecular endocrinology. – 2020. – Vol. 65(1). – P. T49–T63.
74. House I.G. Macrophage-Derived CXCL9 and CXCL10 Are Required for Antitumor Immune Responses Following Immune Checkpoint Blockade / I.G. House, P. Savas, J. Lai [и др.] // Clinical Cancer Research. – 2020. – Vol. 26(2). – P. 487-504.
75. Huang W. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis / W. Huang, R. Ran, B. Shao, H. Li // Breast cancer research and treatment. – 2019. – Vol. 178(1). – P. 17-33.
76. Huang X. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis / X. Huang, F. Venet, Y.L. Wang [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – Vol. 106(15). – P. 6303-6308.
77. Human Gene Set: GOBP\_DEFENSE\_RESPONSE, режим доступа: [https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/GOBP\\_DEFENSE\\_RESPONSE.html](https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/GOBP_DEFENSE_RESPONSE.html)
78. Human Gene Set: GOBP\_INNATE\_IMMUNE\_RESPONSE, режим доступа: [https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/GOBP\\_INNATE\\_IMMUNE\\_RESPONSE](https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/GOBP_INNATE_IMMUNE_RESPONSE)
79. Human Gene Set: GOBP\_POSITIVE\_REGULATION\_OF\_IMMUNE\_SYSTEM\_PROCESS, режим доступа: [https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/GOBP\\_POSITIVE\\_REGULATION\\_OF\\_IMMUNE\\_SYSTEM\\_PROCESS](https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS)
80. Human Gene Set: GOBP\_REGULATION\_OF\_IMMUNE\_RESPONSE, режим доступа: [https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/GOBP\\_REGULATION\\_OF\\_IMMUNE\\_RESPONSE.html](https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/GOBP_REGULATION_OF_IMMUNE_RESPONSE.html)
81. Human Gene Set: GOMF\_ANTIGEN\_BINDING, режим доступа: [https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/GOMF\\_ANTIGEN\\_BINDING](https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/GOMF_ANTIGEN_BINDING)
82. Human Gene Set: GOMF\_MHC\_CLASS\_II\_PROTEIN\_COMPLEX\_BINDING, режим доступа: [https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/GOMF\\_MHC\\_CLASS\\_II\\_PROTEIN\\_COMPLEX\\_BINDING](https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/GOMF_MHC_CLASS_II_PROTEIN_COMPLEX_BINDING)
83. Human Gene Set: GOMF\_MHC\_PROTEIN\_COMPLEX\_BINDING, режим доступа: [https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/GOMF\\_MHC\\_PROTEIN\\_COMPLEX\\_BINDING.html](https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/GOMF_MHC_PROTEIN_COMPLEX_BINDING.html)
84. Human Gene Set: GOMF\_PEPTIDE\_ANTIGEN\_BINDING, режим доступа: <https://www.gsea->

- msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/GOMF\_PEPTIDE\_ANTIGEN\_BINDING
85. Human Gene Set: GOMF\_PEPTIDE\_BINDING, режим доступа: [https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/GOMF\\_PEPTIDE\\_BINDING.html](https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/GOMF_PEPTIDE_BINDING.html)
  86. Human Gene Set: HALLMARK\_INTERFERON\_GAMMA\_RESPONSE, режим доступа: [https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/HALLMARK\\_INTERFERON\\_GAMMA\\_RESPONSE.html](https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE.html)
  87. Improved immune checkpoint detection with recombinant antibodies, режим доступа: <https://www.miltenyibiotec.com/FR-en/applications/flow-cytometry-applications/immune-checkpoint-analysis.html>
  88. Jeong H. Tumor-Associated Macrophages as Potential Prognostic Biomarkers of Invasive Breast Cancer / H. Jeong, I. Hwang, S.H. Kang [и др.] // Journal of breast cancer. – 2019. – Vol. 22(1). – P. 38-51.
  89. Keenan T.E. Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer / T.E. Keenan, S.M. Tolaney // Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN. – 2020. – Vol. 18(4). – P. 479-489.
  90. Komohara Y. Involvement of protumor macrophages in breast cancer progression and characterization of macrophage phenotypes / Y. Komohara, D. Kurotaki, H. Tsukamoto [и др.] // Cancer science. – 2023. – Vol. 114(6). – P. 2220-2229.
  91. Kono Y. Increased PD-1-positive macrophages in the tissue of gastric cancer are closely associated with poor prognosis in gastric cancer patients / Y. Kono, H. Saito, W. Miyauchi [и др.] // BMC cancer. – 2020. – Vol. 20(1). – P. 175.
  92. Korsunsky I. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony / I. Korsunsky, N. Millard, J. Fan [и др.] // Nature Methods. – 2019. – Vol. 16. – P. 1289-1296.
  93. Kos K. The Multifaceted Role of Regulatory T Cells in Breast Cancer / K. Kos, K.E. de Visser // Annual review of cancer biology. – 2021. – Vol. 5. – P. 291-310.
  94. Kumar T. A spatially resolved single-cell genomic atlas of the adult human breast / T. Kumar, K. Nee, R. Wei [и др.] // Nature. – 2023. – Vol. 620(7972). – P. 181-191.
  95. Kuroda H. Prognostic value of tumor-infiltrating B lymphocytes and plasma cells in triple-negative breast cancer / H. Kuroda, T. Jamiyan, R. Yamaguchi [и др.] // Breast cancer (Tokyo, Japan). – 2021. – Vol. 28(4). – P. 904-914.
  96. Larroquette M. Spatial transcriptomics of macrophage infiltration in non-small cell lung cancer reveals determinants of sensitivity and resistance to anti-PD1/PD-L1 antibodies / M. Larroquette, J.P. Guegan, B. Besse [и др.] // Journal for ImmunoTherapy of Cancer. – 2022. – Vol. 10(5). – P. e003890.

97. Lau J. Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice / J. Lau, J. Cheung, A. Navarro [и др.] // *Nature communications*. – 2017. – Vol. 8. – P. 14572.
98. Lecoultre M. Phagocytic function of tumor-associated macrophages as a key determinant of tumor progression control: a review / M. Lecoultre, V. Dutoit, P.R. Walker // *Journal for immunotherapy of cancer*. – 2020. – Vol. 8(2). – P. e001408.
99. Li M. B Cells in Breast Cancer Pathology / M. Li, A. Quintana, E. Alberts [и др.] // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15(5). – P. 1517.
100. Li W. Correlation between PD-1/PD-L1 expression and polarization in tumor-associated macrophages: A key player in tumor immunotherapy / W. Li, F. Wu, S. Zhao [и др.] // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2022. – Vol. 67. – P. 49-57.
101. Li X. A S100A14-CCL2/CXCL5 signaling axis drives breast cancer metastasis / X. Li, M. Wang, T. Gong [и др.] // *Theranostics*. – 2020. – Vol. 10(13). – P. 5687-5703.
102. Lin H. Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression / H. Lin, S. Wei, E.M. Hurt [и др.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2018. – Vol. 128(4). – P. 1708.
103. Lindberg A. In Situ Detection of Programmed Cell Death Protein 1 and Programmed Death Ligand 1 Interactions as a Functional Predictor for Response to Immune Checkpoint Inhibition in NSCLC / A. Lindberg, L. Muhl, H. Yu [и др.] // *Journal of thoracic oncology*. – 2025. – Vol. 20(5). – P. 625-640.
104. Lindberg I. Prognostic relevance of CD163+ immune cells in patients with metastatic breast cancer / I. Lindberg, A. Saleh, J. Tutzauer [и др.] // *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. – 2025. – Vol. 74(2). – P. 42.
105. Liu J. Identification of Genes Associated with Prognosis and Immunotherapy Prediction in Triple-Negative Breast Cancer via M1/M2 Macrophage Ratio / J. Liu, Y. Deng, Z. Liu [и др.] // *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. – 2023. – Vol. 59(7). – P. 1285.
106. Liu J. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression / J. Liu, X. Geng, J. Hou, G. Wu // *Cancer cell international*. – 2021. – Vol. 21(1). – P. 389.
107. Liu L. CHI3L2 Is a Novel Prognostic Biomarker and Correlated With Immune Infiltrates in Gliomas / L. Liu, Y. Yang, H. Duan [и др.] // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 611038.
108. Liu Y. Tumor-stroma proportion is associated with increased M2 macrophage abundance and predicts the resistance to immune checkpoint blockade in breast cancer / Y. Liu, N. Xue, Y. Liu [и др.] // *Translational oncology*. – 2025. – Vol. 54. – P. 102343.
109. Loi S. Association Between Biomarkers and Clinical Outcomes of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Metastatic Triple-Negative Breast

- Cancer: KEYNOTE-086 Exploratory Analysis / S. Loi, R. Salgado, P. Schmid [и др.] // JCO precision oncology. – 2023. – Vol. 7. – P. e2200317.
110. Loi S. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98 / S. Loi, N. Sirtaine, F. Piette [и др.] // Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2013. – Vol. 31(7). – P. 860-867.
  111. Loibl S. HER2-positive breast cancer / S. Loibl, L. Gianni // The Lancet. – 2017. – Vol. 389(10087). – P. 2415-2429.
  112. Lv B. Immunotherapy: Reshape the Tumor Immune Microenvironment / B. Lv, Y. Wang, D. Ma [и др.] // Frontiers in immunology. – 2022. – Vol. 13. – P. 844142.
  113. Manoharan T.J.M. Engineered Tumor-Immune Microenvironment On A Chip to Study T Cell-Macrophage Interaction in Breast Cancer Progression / T.J.M. Manoharan, K. Ravi, A.P. Suresh [и др.] // Advanced healthcare materials. – 2024. – Vol. 13(14). – P. e2303658.
  114. Martinez F.O. Macrophage activation and polarization / F.O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, M. Locati // Frontiers in bioscience : a journal and virtual library. – 2008. – Vol. 13. – P. 453-461.
  115. Matusiak M. A spatial map of human macrophage niches reveals context-dependent macrophage functions in colon and breast cancer / M. Matusiak, J.W. Hickey, B. Luca [и др.] // Research square. – 2023.
  116. Mauri C. Immune regulatory function of B cells / C. Mauri, A. Bosma // Annual review of immunology. – 2012. – Vol. 30. – P. 221-241.
  117. McLane L.M. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer / L.M. McLane, M.S. Abdel-Hakeem, E.J. Wherry // Annual review of immunology. – 2019. – Vol. 37. – P. 457-495.
  118. Mills C.D. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm / C.D. Mills, K. Kincaid, J.M. Alt [и др.] // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). – 2000. – Vol. 164(12). – P. 6166-6173.
  119. Miziak P. Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer / P. Miziak, M. Baran, E. Błaszczak [и др.] // Cancers. – 2023. – Vol. 15(19). – P. 4689.
  120. Nalio Ramos R. Tissue-resident FOLR2+ macrophages associate with CD8+ T cell infiltration in human breast cancer / R. Nalio Ramos, Y. Missolo-Koussou, Y. Gerber-Ferder [и др.] // Cell. – 2022. – Vol. 185(7). – P. 1189-1207.
  121. Namjoshi P. T-helper 1-type cytokines induce apoptosis and loss of HER-family oncodriver expression in murine and human breast cancer cells / P. Namjoshi, L. Showalter, B.J. Czerniecki, G.K. Koski // Oncotarget. – 2019. – Vol. 10(57). – P. 6006-6020.

122. Nielsen T.O. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group / T.O. Nielsen, S.C.Y. Leung, D.L. Rimm [и др.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2021. – Vol. 113(7). – P. 808-819.
123. Noël G. Functional Th1-oriented T follicular helper cells that infiltrate human breast cancer promote effective adaptive immunity / G. Noël, M.L. Fontsa, S. Garaud [и др.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2021. – Vol. 131(19). – P. e139905.
124. Obidiro O. Triple Negative Breast Cancer Treatment Options and Limitations: Future Outlook / O. Obidiro, G. Battogtokh, E.O. Akala // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15(7). – P. 1796.
125. Ohaegbulam K.C. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway / K.C. Ohaegbulam, A. Assal, E. Lazar-Molnar [и др.] // *Trends in molecular medicine*. – 2015. – Vol. 21(1). – P. 24-33.
126. Olkhanud P.B. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4<sup>+</sup> T cells to T-regulatory cells / P.B. Olkhanud, B. Damdinsuren, M. Bodogai [и др.] // *Cancer research*. – 2011. – Vol. 71(10). – P. 3505-3515.
127. Omatsu M. THBS1-producing tumor-infiltrating monocyte-like cells contribute to immunosuppression and metastasis in colorectal cancer / M. Omatsu, Y. Nakanishi, K. Iwane [и др.] // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14(1). – P. 5534.
128. Oshi M. M1 Macrophage and M1/M2 ratio defined by transcriptomic signatures resemble only part of their conventional clinical characteristics in breast cancer / M. Oshi, Y. Tokumaru, M. Asaoka [и др.] // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10(1). – P. 16554.
129. Pan Y. Tumor-associated macrophages in tumor immunity / Y. Pan, Y. Yu, X. Wang, T. Zhang // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 583084.
130. Park S.M. Proliferating macrophages in human tumours show characteristics of monocytes responding to myelopoietic growth factors / S.M. Park, C.J. Chen, D.J. Verdon [и др.] // *Frontiers in immunology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1412076.
131. Peranzoni E. Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment / E. Peranzoni, J. Lemoine, L. Vimeux [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2018. – Vol. 115(17). – P. E4041-E4050.
132. Perou C.M. Molecular portraits of human breast tumours / C.M. Perou, T. Sorlie, M.B. Eisen [и др.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 406(6797). – P. 747-752.
133. Pytlarz M. Deep Learning Glioma Grading with the Tumor Microenvironment Analysis Protocol for Comprehensive Learning, Discovering, and Quantifying Microenvironmental Features / M. Pytlarz, K. Wojnicki, P. Pilanc [и др.] // *Journal of imaging informatics in medicine*. – 2024. – Vol. 37(4). – P. 1711–1727.

134. Qiu S.Q. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? / S.Q. Qiu, S.J.H. Waaijer, M.C. Zwager [и др.] // *Cancer treatment reviews*. – 2018. – Vol. 70. – P. 178–189.
135. Quaranta V. Macrophage-Derived Granulin Drives Resistance to Immune Checkpoint Inhibition in Metastatic Pancreatic Cancer / V. Quaranta, C. Rainer, S.R. Nielsen [и др.] // *Cancer research*. – 2018. – Vol. 78(15). – P. 4253-4269.
136. Ren L. Systematic pan-cancer analysis identifies APOC1 as an immunological biomarker which regulates macrophage polarization and promotes tumor metastasis / L. Ren, J. Yi, Y. Yang [и др.] // *Pharmacological Research*. – 2022. – Vol. 183. – P. 106376.
137. Ruan J. The effect of PD-1 expression on tumor-associated macrophage in T cell lymphoma / J. Ruan, M. Ouyang, W. Zhang [и др.] // *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. – 2021. – Vol. 23(6). – P. 1134-1141.
138. Ruffell B. Leukocyte composition of human breast cancer / B. Ruffell, A. Au, H.S. Rugo [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109(8). – P. 2796-2801.
139. Sabatier R. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer / R. Sabatier, P. Finetti, E. Mamessier [и др.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6(7). – P. 5449-5464.
140. Salgado R. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014 / R. Salgado, C. Denkert, S. Demaria [и др.] // *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2015. – Vol. 26(2). – P. 259-271.
141. Sánchez-Magraner L. Functional Engagement of the PD-1/PD-L1 Complex But Not PD-L1 Expression Is Highly Predictive of Patient Response to Immunotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer / L. Sánchez-Magraner, J. Gumuzio, J. Miles [и др.] // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2023. – Vol. 41(14). – P. 2561-2570.
142. Schmid P. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer / P. Schmid, S. Adams, H.S. Rugo [и др.] // *The New England journal of medicine*. – 2018. – Vol. 379(22). – P. 2108-2121.
143. Schmid P. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer / P. Schmid, J. Cortes, L. Pusztai [и др.] // *The New England journal of medicine*. – 2020. – Vol. 382(9). – P. 810-821.
144. Segovia-Mendoza M. Immune Tumor Microenvironment in Breast Cancer and the Participation of Estrogen and Its Receptors in Cancer Physiopathology / M. Segovia-Mendoza, J. Morales-Montor // *Frontiers in immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 348.

145. Shiao S.L. Single-cell and spatial profiling identify three response trajectories to pembrolizumab and radiation therapy in triple negative breast cancer / S.L. Shiao, K.H. 3rd Gouin, N. Ing [и др.] // *Cancer Cell*. – 2024. – Vol. 42(1). – P. 70-84.
146. Shinohara H. Spatial and Quantitative Analysis of Tumor-Associated Macrophages: Intratumoral CD163-/PD-L1+ TAMs as a Marker of Favorable Clinical Outcomes in Triple-Negative Breast Cancer / H. Shinohara, M. Kobayashi, K. Hayashi [и др.] // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 23(21). – P. 13235.
147. Shou J. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs : a systematic review and meta-analysis / J. Shou, Z. Zhang, Y. Lai [и др.] // *BMC cancer*. – 2016. – Vol. 16(1). – P. 687.
148. Sica A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas / A. Sica, A. Mantovani // *The Journal of clinical investigation*. – 2012. – Vol. 122(3). – P. 787-795.
149. Singhal S. Human tumor-associated monocytes/macrophages and their regulation of T cell responses in early-stage lung cancer / S. Singhal, J. Stadanlick, M.J. Annunziata [и др.] // *Science Translational Medicine*. – 2019. – Vol. 11(479). – P. eaat1500.
150. Song Z. Targeting of Annexin A1 in tumor-associated macrophages as a therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma / Z. Song, X. Wang, X. Liu [и др.] // *Biochemical Pharmacology*. – 2023. – Vol. 213. – P. 115612.
151. Sriramulu S. Present and Future of Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer / S. Sriramulu, S. Thoidingjam, C. Speers, S. Nyati // *Cancers*. – 2024. – Vol. 16(19). – P. 3250.
152. Sun C. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint / C. Sun, R. Mezzadra, T.N. Schumacher // *Immunity*. – 2018. – Vol. 48(3). – P. 434-452.
153. Sun Y.P. Prognostic value of CD8+ tumor-infiltrating T cells in patients with breast cancer: A systematic review and meta-analysis / Y.P. Sun, Y.L. Ke, X. Li // *Oncology letters*. – 2022. – Vol. 25(1). – P. 39.
154. Suzuki K. Histological spatial analysis on the induction of PD-L1+ macrophages by CD8+ T cells at the marginal microenvironment of triple-negative breast cancer / K. Suzuki, R. Ohe, T. Kabasawa [и др.] // *Breast cancer (Tokyo, Japan)*. – 2023. – Vol. 30(6). – P. 1094-1104.
155. Taban Q. Scavenger receptors in host defense: from functional aspects to mode of action / Q. Taban, P.T. Mumtaz, K.Z. Masoodi [и др.] // *Cell communication and signaling : CCS*. – 2022. – Vol. 20(1). – P. 2.
156. Tang H. PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression / H. Tang, Y. Liang, R.A. Anders [и др.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2018. – Vol. 128(2). – P. 580-588.

157. Tashireva L.A. Parameters of Tumor Microenvironment Determine Effectiveness of Anti-PD-1/PD-L1 Therapy / L.A. Tashireva, D.T. Muravyova, N.O. Popova [и др.] // *Biochemistry (Mosc)*. – 2021. – Vol. 86(11). – P. 1461-1468.
158. Tecentriq (atezolizumab), An overview of Tecentriq and why it is authorised in the EU, режим доступа: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/tecentriq-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/tecentriq-epar-medicine-overview_en.pdf)
159. Thommen D.S. T Cell Dysfunction in Cancer / D.S. Thommen, T.N. Schumacher // *Cancer cell*. – 2018. – Vol. 33(4). – P. 547-562.
160. Tokunaga R. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy / R. Tokunaga, W. Zhang, M. Naseem [и др.] // *Cancer Treatment Reviews*. – 2018. – Vol. 63. – P. 40-47.
161. Tsang J. Molecular classification of breast cancer / J. Tsang, G.M. Tse // *Advances in anatomic pathology*. – 2020. – Vol. 27(1). – P. 27-35.
162. Varady S.R.S. Macrophage subtypes inhibit breast cancer proliferation in culture / S.R.S. Varady, D. Greiner, M. Roh-Johnson // *Molecular biology of the cell*. – 2025. – Vol. 36(1). – P. br2.
163. VENTANA PD-L1 (SP142) Assay, режим доступа: [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf16/p160002c.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/p160002c.pdf)
164. Vitale I. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment / I. Vitale, G. Manic, L.M. Coussens [и др.] // *Cell metabolism*. – 2019. – Vol. 30(1). – P. 36-50.
165. Voskoboinik I. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology / I. Voskoboinik, J.C. Whisstock, J.A. Trapani // *Nature reviews. Immunology*. – 2015. – Vol. 15(6). – P. 388-400.
166. Wagner J. A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer / J. Wagner, M.A. Rapsomaniki, S. Chevrier [и др.] // *Cell*. – 2019. – Vol. 177(5). – P. 1330-1345.
167. Wang J. Multiplexed immunofluorescence identifies high stromal CD68+PD-L1+ macrophages as a predictor of improved survival in triple negative breast cancer / J. Wang, L. Browne, I. Slapetova [и др.] // *Scientific reports*. – 2021. – Vol. 11(1). – P. 21608.
168. Wang L. PD-L1-expressing tumor-associated macrophages are immunostimulatory and associate with good clinical outcome in human breast cancer / L. Wang, W. Guo, Z. Guo [и др.] // *Cell reports. Medicine*. – 2024. – Vol. 5(2). – P. 101420.
169. Watanabe H. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains / H. Watanabe, K. Numata, T. Ito [и др.] // *Shock (Augusta, Ga.)*. – 2004. – Vol. 22(5). – P. 460-466.

170. Williams C. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy / C. Williams, E. Yeh, A. Soloff // *npj Breast Cancer*. – 2016. – Vol. 2. – P. 15025.
171. Wu S.Z. A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers / S.Z. Wu, G. Al-Eryani, D.L. Roden [и др.] // *Nature genetics*. – 2021. – Vol. 53(9). – P. 1334-1347.
172. Wu W.J. IL-4 and IL-13 Promote Proliferation of Mammary Epithelial Cells through STAT6 and IRS-1 / W.J. Wu, S.H. Wang, C.C. Wu [и др.] // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22(21). – P. 12008.
173. Xia J. IL1R2 Blockade Alleviates Immunosuppression and Potentiates Anti-PD-1 Efficacy in Triple-Negative Breast Cancer / J. Xia, L. Zhang, X. Peng [и др.] // *Cancer research*. – 2024. – Vol. 84(14). – P. 2282-2296.
174. Yerolatsite M. TAMs and PD-1 networking in esophageal cancer: literature review / M. Yerolatsite, N. Torounidou, A. Batistatou // *ESMO Gastrointestinal Oncology*. – 2025. – Vol. 7. – P. 100130.
175. Yersal O. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications / O. Yersal, S. Barutca // *World journal of clinical oncology*. – 2014. – Vol. 5(3). – P. 412-424.
176. Zareinejad M. Dual Functions of T Lymphocytes in Breast Carcinoma: From Immune Protection to Orchestrating Tumor Progression and Metastasis / M. Zareinejad, F. Mehdipour, M. Roshan-Zamir [и др.] // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15(19). – P. 4771.
177. Zhang H. Roles of tumor-associated macrophages in anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy for solid cancers / H. Zhang, L. Liu, J. Liu [и др.] // *Molecular cancer*. – 2023. – Vol. 22(1). – P. 58.
178. Zhang L. Fibronectin 1 derived from tumor-associated macrophages and fibroblasts promotes metastasis through the JUN pathway in hepatocellular carcinoma / L. Zhang, C. Zhang, Z. Xing [и др.] // *International Immunopharmacology*. – 2022. – Vol. 113. – P. 109420.
179. Zhang N. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system / N. Zhang, M.J. Bevan // *Immunity*. – 2011. – Vol. 35(2). – P. 161-168.
180. Zhang Y. Single-cell analyses reveal key immune cell subsets associated with response to PD-L1 blockade in triple-negative breast cancer / Y. Zhang, H. Chen, H. Mo [и др.] // *Cancer cell*. – 2021. – Vol. 39(12). – P. 1578-1593.
181. Zhou Y. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells in patients with breast cancer: a meta-analysis / Y. Zhou, N. Shao, N. Aierken [и др.] // *Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 8(19). – P. 4098-4105.
182. Zhu Z. PD-L1-Mediated Immunosuppression in Glioblastoma Is Associated With the Infiltration and M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages / Z. Zhu, H. Zhang, B. Chen [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 588552.