

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научные руководители:

Таширева Любовь Александровна,
доктор медицинских наук
Вторушин Сергей Владимирович,
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Демидов Сергей Михайлович

доктор медицинских наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Уральский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, кафедра онкологии и
лучевой диагностики, заведующий

Сетдикова Галия Равиловна

доктор медицинских наук, Государственное
бюджетное учреждение здравоохранения
Московской области «Московский областной
научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского», отделение
морфологической диагностики отдела онкологии,
руководитель

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится «___» _____ 2026 года в ____ часов на заседании диссертационного
совета **24.1.215.06** на базе Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской
академии наук» по адресу г. Томск, пер. Кооперативный 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального
государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта
<http://tnimc.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук



А.А. Медведева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее часто диагностируемым онкологическим заболеванием и основной причиной смерти женщин от рака во всем мире (WHO). Характер лечения и прогноз при РМЖ во многом обусловлены биологическими свойствами опухоли, включая её молекулярно-генетический подтип, размеры и степень злокачественности (Yersal O. et al., 2014). 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 (Pan Y. et al., 2020) и направленности протекающих в нём иммуновоспалительных реакций (Перельмутер В.М. и соавт., 2017).

Макрофаги, как и лимфоциты, могут составлять значительную часть клеточного состава стромы солидных новообразований, достигая в отдельных случаях до 50 % (Vitale I. et al., 2019). 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 (Lecoultre M. et al., 2020). В противоположность этому макрофаги подтипа M2 участвуют в формировании метастатического потенциала опухоли, стимулируют ангиогенез и подавляют Т-клеточно-опосредованный противоопухолевый иммунный ответ (Pan Y. et al., 2020). 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 (Sabatier R. et al., 2015). 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 (Ventana). 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 (Keenan T.E. et al., 2020). 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 иммуновоспалительное микроокружение опухоли. 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 опухоль-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» (Cai H. et al., 2021). 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 (Singhal S. et al., 2019). 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 (Zhu Z. et al., 2020). Аналогично показано, что PD-1 принимает участие в поддержании M2-поляризации макрофагов (Ruan J. et al., 2021). 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 иммунцитов 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 (Allison E. et al., 2023). 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 (Oshi M. et al., 2020). С использованием пространственного транскриптомного секвенирования ткани молочной железы были выявлены макрофагальные популяции, расширяющие традиционное представление о M1–M2 дихотомии (Kumar T. et al., 2023).

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+ Т-лимфоцитов и тем самым стимулировать рост опухоли (Suzuki K. et al., 2023). С другой стороны, получены данные о том, что PD-L1+ макрофаги в опухолевом микроокружении при РМЖ представляют собой зрелые иммуностимулирующие клетки, склонные к пространственной ассоциации с Т-лимфоцитами, тогда как PD-L1– макрофаги обладают иммуносупрессивными свойствами и преимущественно локализуются в непосредственной близости к опухолевым клеткам (Wang L. et al., 2024). Эти результаты согласуются с данными исследования, в котором было показано, что высокая плотность CD68+PD-L1+ макрофагов в опухолевой строме у пациентов с трижды негативным РМЖ связана с более продолжительной общей выживаемостью (Wang J. et al., 2021).

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 (DeNardo D. et al., 2019). Кроме того, по одним данным, наличие контактов между PD-1+ и PD-L1+ клетками в опухолевом микроокружении коррелирует с благоприятным ответом на иммунотерапию (Sánchez-Magraner L. et al., 2023), в то время как другие исследования демонстрируют противоположный эффект, указывая на снижение её эффективности (Zhang H. et al., 2023). Ведётся активный поиск предикторов ответа на иммунотерапию ингибиторами PD-1/PD-L1 при РМЖ, и, несмотря на появление прогностических моделей (Chang K. et al., 2024; Liu J. et al., 2023; Zhang Y. et al., 2021), 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 транскриптомного 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 транскриптомном 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 клинико-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.

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.

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».

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), заключение, 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.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ 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, оценка HER2-статуса опухоли проводилась в соответствии с критериями ASCO/CAP, экспрессия Ki67 – в соответствии с методикой оценки, предложенной International Ki67 in Breast Cancer Working Group. Степень злокачественности опухоли определялась в соответствии с Nottingham combined histologic grade (Elston-Ellis modification of Scarff-Bloom-Richardson grading system). Стадия устанавливалась согласно классификации TNM 8 пересмотра Союза по международному противораковому контролю (Union for International Cancer Control, UICC).

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 (T₁₋₄N₀₋

зМ₀). Число пациентов младше 50 лет было равным 13 (33,33%), старше 50 – 26 (66,67%). У 14 (35,9%) менструальная функция была сохранена, 25 (64,1%) находились в менопаузе. Люминальный А или В подтип был установлен у 22 (56,41%) пациентов, трижды негативный – у 17 (43,59%). Распределение по стадиям опухолевого роста было следующим: I стадия – у 8 пациентов (20,51%), IIА – у 20 (51,28%), IIВ – у 5 (12,82%), IIIА и IIIС – у 5 (12,82%). Метастазы в лимфатические узлы были выявлены у 14 пациентов (35,9%), отдаленные метастазы возникли у 8 пациентов (20,51%). Все материалы были получены до начала терапии (химиотерапии, гормонотерапии или лучевой). Все пациенты получили хирургическое лечение в объеме радикальной мастэктомии или секторальной резекции. Неоадьювантная химиотерапия, а также адьювантная химиотерапия или гормонотерапия проводились пациентам по показаниям. Лечение проводилось в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2010 по 2023 гг.

Для изучения транскриптомного профиля макрофагов опухолевого микроокружения была взята опухолевая ткань 11 пациентов с РМЖ (Т₁₋₄Н₀₋₂М₀, только трижды негативный молекулярно-биологический подтип), полученная до проведения химиотерапевтического лечения. Число пациентов младше 50 лет составило 7 (63,64 %), старше 50 – 4 (36,36 %). Распределение по стадиям было следующим: I стадия – у 4 пациентов (36,36%), IIА – у 2 (18,18 %), IIВ – у 1 (9,09 %), IIIА – у 1 (9,09 %), IIIВ – у 3 (27,27 %). Метастазы в лимфатические узлы были выявлены у 7 пациентов (63,64 %), отдаленные метастазы – у 3 пациентов (27,27 %). Пациенты проходили лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2019 г. по 2021 г. Всем пациентам было проведено хирургическое лечение, а также неоадьювантная или адьювантная химиотерапия по показаниям. Всем пациентам был определен PD-L1 статус (у 5 пациентов (45,45 %) PD-L1 статус был позитивным, у 6 (54,55 %) – негативным).

Для поиска иммунологических маркеров, ассоциированных с длительностью ответа на химиоиммунотерапию, был использован материал 16 пациенток с раком молочной железы (Т₁₋₄Н₀₋₃М₀₋₁, 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. Из общего числа включённых пациенток 11 (68,75 %) были младше 50 лет и 5 (31,25 %) — старше 50 лет. Распределение по стадиям заболевания было следующим: I стадия — у 3 (18,75 %) пациенток, IIА — у 1 (6,25 %), IIВ — у 3 (18,75 %), IIIВ — у 4 (25 %), IIIС — у 3 (18,75 %) и IV — у 2 (12,5 %). 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/м² 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). 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).

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

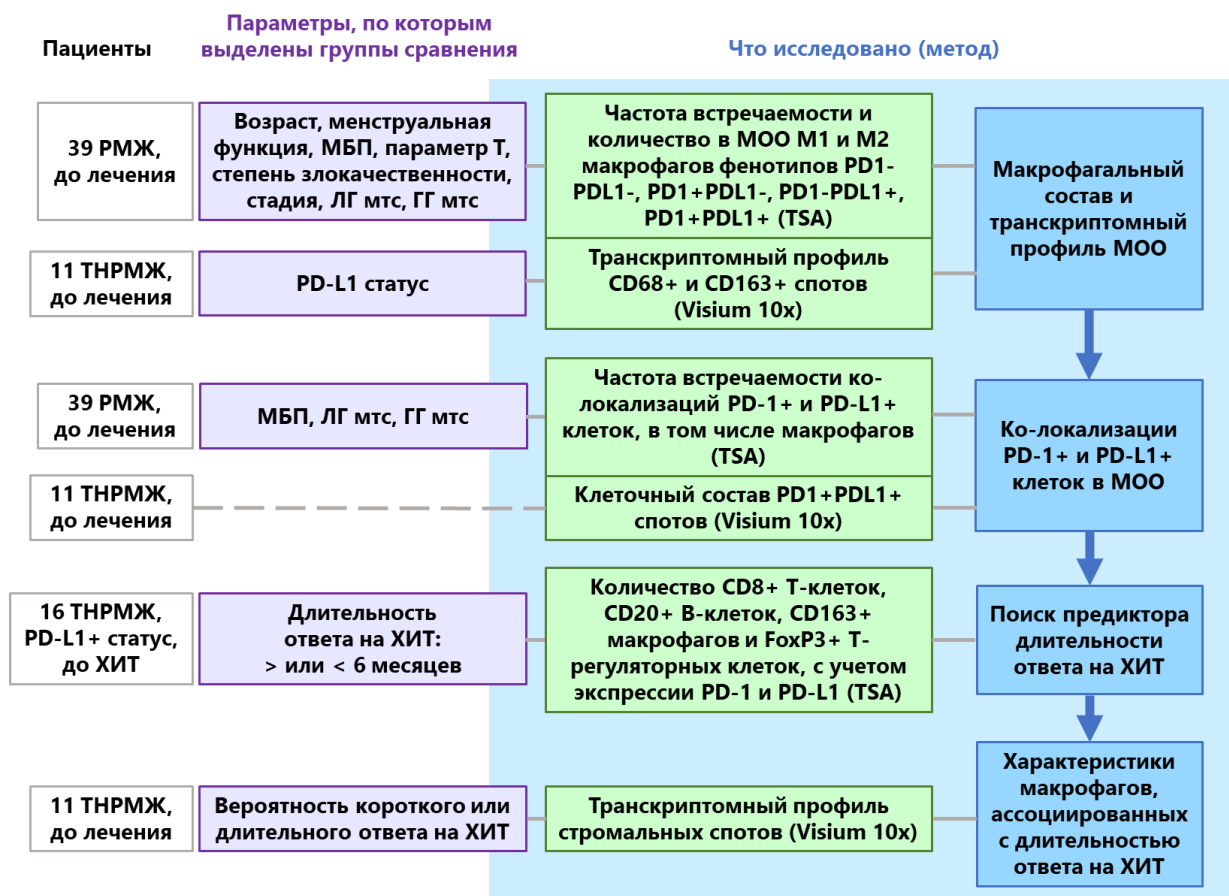


Рисунок 1 – Дизайн исследования (МОО – микроокружение опухоли, РМЖ – рак молочной железы, ТНРМЖ – трижды негативный рак молочной железы, МБП – молекулярно-биологический подтип, ЛГ мтс – лимфогенное метастазирование, ГГ мтс – гематогенное метастазирование, ХИТ – химиоиммунотерапия, TSA – tyramide signal amplification – тирамидная амплификация сигнала)

Методы исследования

Иммуногистохимический анализ. Для определения статуса экспрессии PD-L1 применяли иммуногистохимический метод с использованием тест-системы PD-L1 (SP142) на

автоматизированной платформе Ventana Benchmark Ultra (Roche, США). Оценку результатов проводили методом световой микроскопии на микроскопе AxioScope A1 (Zeiss, Германия) в соответствии с критериями, указанными в руководстве по интерпретации теста VENTANA PD-L1 (SP142).

С целью стратификации пациентов по предполагаемой чувствительности к химиоиммунотерапии был проведён иммуногистохимический анализ экспрессии макрофагального рецептора CD163 в образцах опухолевой ткани. Для этого использовалось первичное антитело против CD163 (1:30, Diagnostic BioSystems, clone 10D6, США). Оценка наличия и плотности CD163+ макрофагов проводилась методом световой микроскопии с использованием микроскопа AxioScope A1 (Zeiss, Германия). 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.

TSA-модифицированная мультиплексная иммунофлуоресценция.

Имунофенотипирование изучаемых популяций иммунных клеток микроокружения опухоли в ткани РМЖ проводилось с помощью метода многоцветного флуоресцентного окрашивания ткани на имуностейнере Bond RXm (Leica, Германия). Панель А применялась для изучения экспрессии PD-1 и PD-L1 макрофагами опухолевого микроокружения у пациентов с РМЖ (цикл 1: PD-1 – Opal520; цикл 2: CD68 – Opal540; цикл 3: PD-L1 – Opal570; цикл 4: CD3 – Opal620; цикл 5: CD163 – Opal650, цикл 6: panCK – Opal690) (Рисунок 2А). Панель Б использовалась для поиска иммунологического предиктора эффективности химиоиммунотерапии у пациентов с РМЖ (цикл 1: CD8 – Opal520; цикл 2: PD-1 – Opal540; цикл 3: CD20 – Opal570; цикл 4: CD163 – Opal620; цикл 5: PD-L1 – Opal650; цикл 6: FoxP3 – Opal690) (Рисунок 2Б).

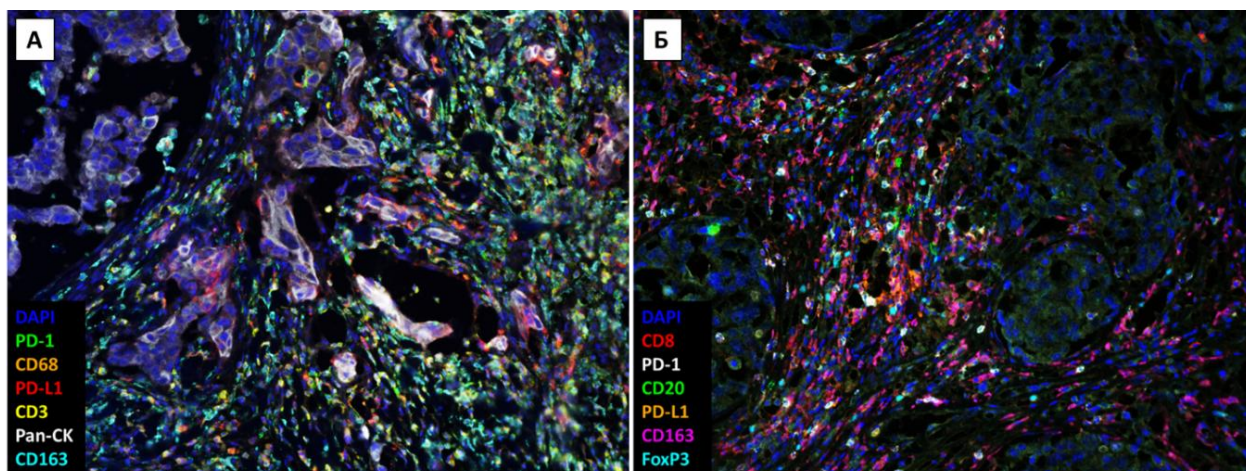


Рисунок 2 – TSA-модифицированная иммунофлуоресценция РМЖ, увеличение 200х А: панель А, Б: панель Б

Использовались следующие первичные антитела: 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). 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).

Пространственный анализ транскриптома Visium 10x. Для проведения пространственного анализа транскриптома Visium 10x была использована опухолевая ткань, фиксированная формалином залитая в парафин, срезы которой были размещены на двух стеклах Visium. 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. Данные секвенирования доступны в базе Gene Expression Omnibus NCBI, номер GEO GSE242311.

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* (Рисунок 3), а также спотов с ко-экспрессией *PD-1* (*PDCD1*) и *PD-L1* (*CD274*).

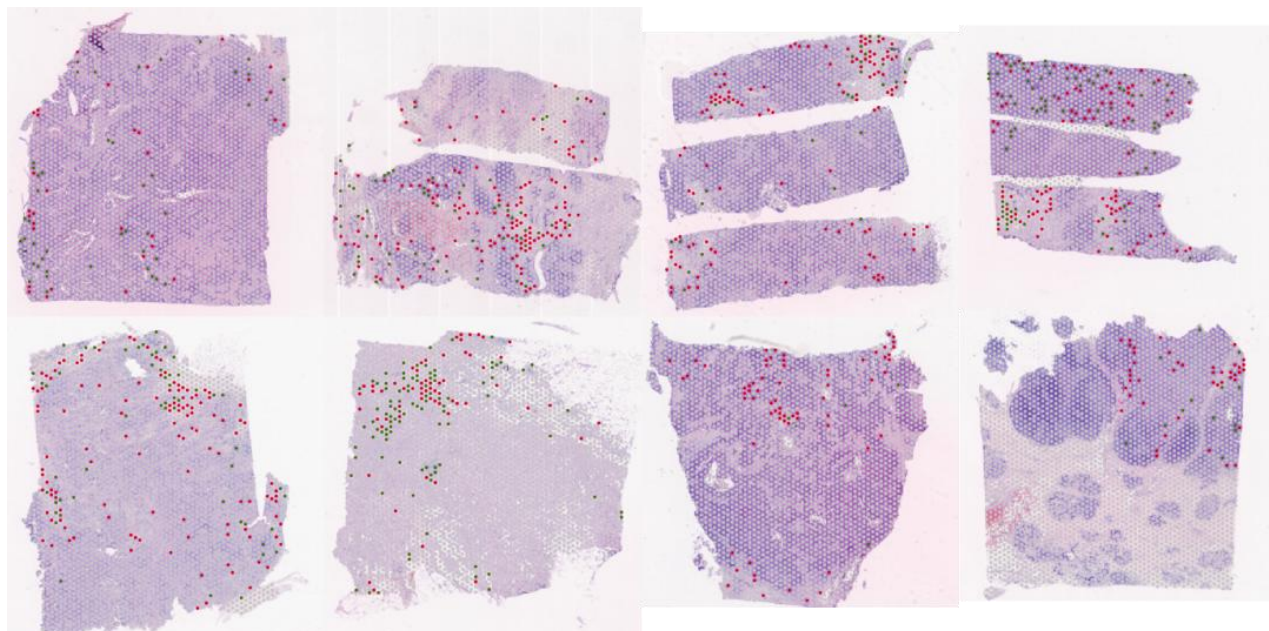


Рисунок 3 – Аннотация спотов в Loupe Browser (зеленые точки – стромальные CD68+ споты, красные точки – стромальные CD163+ споты)

Для поиска дифференциально экспрессированных генов между двумя группами пациентов (с позитивным и негативным PD-L1 статусом) использовалась функция «FindAllMarkers», 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-value (FDR q-value), полученными

в результате анализа дифференциальной экспрессии. Значимыми считались биологические процессы со значением FDR q-value < 0.05. Для аннотации клеток, входящих в PD1+PDL1+ споты, на основе данных об экспрессии генов (значения log2 FC) использовался алгоритм CIBERSORTx.

Статистический анализ. Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения Prism 8.0.1 (GraphPad, США). Количественные данные (процентное содержание иммунных клеток различных фенотипов в опухолевом микроокружении) представляли в виде медианы и межквартильного размаха – Me (Q1-Q3), 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, критерий Краскела-Уоллиса, критерий Вилкоксона, точный критерий Фишера и критерий χ^2 Пирсона, ROC-анализ, простая логистическая регрессия. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Относительное количество макрофагов в микроокружении опухоли от общего количества клеток стромы составило 13,16 (9,95-24,75) %. M2 макрофаги (CD68+/-CD163+) были обнаружены у всех (39/39) включенных в исследование пациентов, а M1 макрофаги (CD68+CD163-) – 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) % ($p < 0,0001$). Также в опухолевом микроокружении было оценено количество M1 и M2 макрофагов, экспрессирующих PD-1 или/и PD-L1 (Таблица 1).

Таблица 1 – Количество макрофагов в опухолевом микроокружении при РМЖ (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) $p_{12}<0,0001$ $p_{13}=0,2874$ $p_{14}<0,0001$	0 (0-0,48) $p_{23}<0,0001$ $p_{24}<0,0001$	5,09 (1,79-11,11) $p_{34}<0,0001$	1,18 (0-4,63)
	M2	69,39 (54,17-80,41) $p_{12}<0,0001$ $p_{13}<0,0001$ $p_{14}<0,0001$	0 (0-0,3) $p_{23}<0,0001$ $p_{24}=0,3303$	12,15 (5,05-20,86) $p_{34}<0,0001$	0 (0-0,31)
PM1-M2		<0,0001	0,2684	<0,0001	<0,0001

Среди всех макрофагов стромы доля PD1–PDL1+ M2 макрофагов преобладала над долей PD1–PDL1+ M1 макрофагов ($p < 0,0001$), однако не различались доли PD1+PDL1– M2 макрофагов и PD1+PDL1– M1 макрофагов ($p = 0,2684$).

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

Частота встречаемости и количество M1 и M2 макрофагов с фенотипами PD1–PDL1–, PD1+PDL1–, PD1–PDL1+ и PD1+PDL1+ не была ассоциирована с возникновением лимфогенных или гематогенных метастазов ($p > 0,05$). Частота встречаемости PD1+PDL1– M2 макрофагов была выше у пациентов с трижды негативным РМЖ (58,82% (10/17)), чем у пациентов с люминальными подтипами РМЖ (9,09 % (2/22)) ($p = 0,0014$). Количество PD1+PDL1– M2 макрофагов, представленное в процентах от общего числа клеток стромы, также было выше в случаях с трижды негативным РМЖ (0,03 (0-0,14) %), чем в случаях с люминальным РМЖ (0 (0-0) %) ($p = 0,0007$) (Рисунок 4).

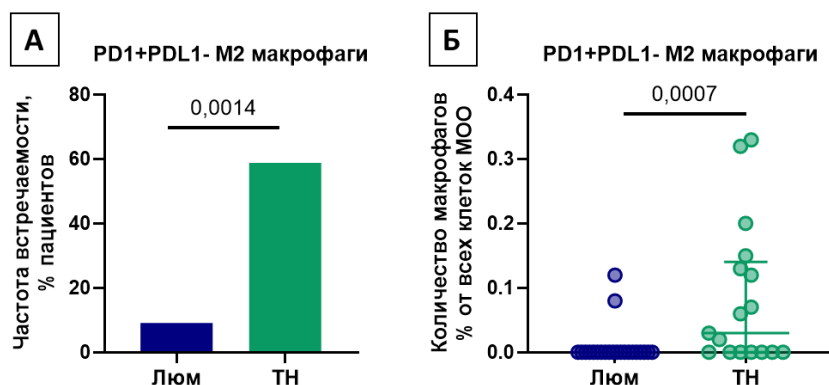


Рисунок 4 – Частота встречаемости PD1+PDL1– M2 макрофагов (А) и количество PD1+PDL1– M2 макрофагов (Б) в опухолевом микроокружении при РМЖ в зависимости от молекулярно-биологического подтипа РМЖ (Люм – люминальные А и В подтипы, ТН – трижды негативный подтип)

Взаимосвязь количества макрофагов в микроокружении опухоли с PD-L1 статусом при трижды негативном раке молочной железы

У пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом количество M1 и M2 макрофагов в строме опухоли при ТНРМЖ не различается ($p=0,1139$; $p=0,7430$, соответственно). 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 (Рисунок 5), но не различалось количество PD-1– M1 макрофагов и PD-1– M2 макрофагов.

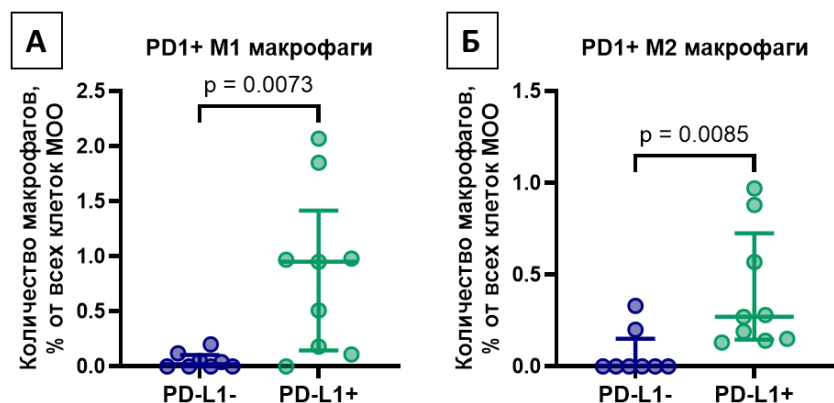


Рисунок 5 – Количество PD-1+ M1 макрофагов (А) и PD-1+ M2 макрофагов (Б) в опухолевом микроокружении при РМЖ в зависимости от PD-L1 статуса опухоли (PD-L1– – негативный PD-L1 статус, PD-L1+ – позитивный PD-L1 статус)

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

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+ кластере у пациентов с негативным PD-L1 статусом были подавлены процессы миграции и хемотаксиса лейкоцитов. В CD163+ 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+ кластере у пациентов с негативным PD-L1 статусом были обогащены процессы, ассоциированные с гуморальным иммунным ответом, активацией и супрессией иммунных клеток, реакцией на TGF- β , TNF, регуляцией ангиогенеза и пролиферацией фибробластов.

Также была изучена экспрессия генов рецепторов иммунных контрольных точек в CD68+ кластере и в CD163+ кластере в зависимости от PD-L1 статуса. В CD68+ 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+ кластере не различалась в зависимости от PD-L1 статуса (Рисунок 6А). 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- α) – 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 6Б).

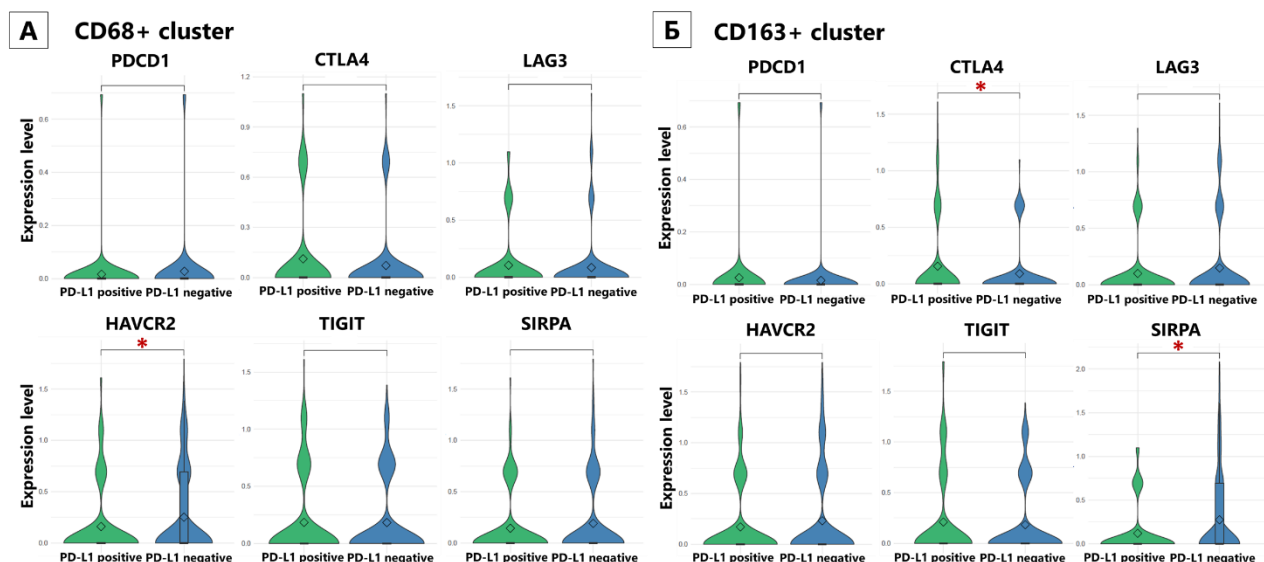


Рисунок 6 – Сравнение экспрессии генов рецепторов иммунных контрольных точек у пациентов с позитивным и негативным PD-L1 статусом в CD68+ кластере (А) и в CD163+ кластере (Б)

Ко-локализации клеток микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1, в том числе макрофагов

Ко-локализованными считались непосредственно контактирующие иммунные клетки, одна из которых несёт рецептор PD-1, а вторая лиганд PD-L1. Ко-локализации иммунных клеток, одна из которых несет лиганд PD-L1, а другая рецептор PD-1, в микроокружении РМЖ: были обнаружены у 71,8 % пациентов (у 28 пациентов из 39). Частоты встречаемости ко-локализованных М1 макрофагов и ко-локализованных М2 макрофагов статистически значимо не различались (М1 – у 48,72 % пациентов, М2 – у 56,41 % пациентов, $p = 0,6505$). При сравнении частот встречаемости ко-локализованных клеток у пациентов в зависимости от молекулярно-биологического типа опухоли ($p = 0,4824$), наличия метастазов в лимфатические узлы ($p = 0,4425$) и отдаленных метастазов ($p > 0,9999$) статистически значимых различий обнаружено не было.

Кроме того, у пациентов с ТНРМЖ, которым был проведен пространственный анализ транскриптома Visium 10x, был оценен клеточный состав PD1+PD1+ спотов. Было обнаружено, что макрофаги входят в состав PD1+PD1+ спотов у всех пациентов и составляют до 20 % от общего числа иммунных клеток и фибробластов в этих спотах.

Оценка предиктивной ценности параметров микроокружения как маркеров длительности ответа на химиоиммунотерапию при PD-L1-позитивном метастатическом или прогрессирующем трижды негативном раке молочной железы

Для поиска предиктора длительности ответа была сформирована выборка, включающая 16 пациентов с метастатическим или прогрессирующим PD-L1-позитивным ТНРМЖ, получавших ХИТ 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.

Количество CD8+ Т-клеток, CD20+ В-клеток и FoxP3+ Т-регуляторных клеток с учетом экспрессии на них PD-L1 и PD-1 не различалось в когортах пациентов с длительным

и коротким ответом на ХИТ. Только доля CD163+ макрофагов в опухолевом микроокружении являлась ассоциированной с длительностью ответа на ХИТ у больных метастатическим или прогрессирующим ТНРМЖ (ДО: 5,8 (3,3-9,0) % от общего числа клеток стромы, КО: 12,43 (9,61-17,26) %, $p = 0,0160$) (Рисунок 7А).

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 7Б). 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 микроокружении 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 %.

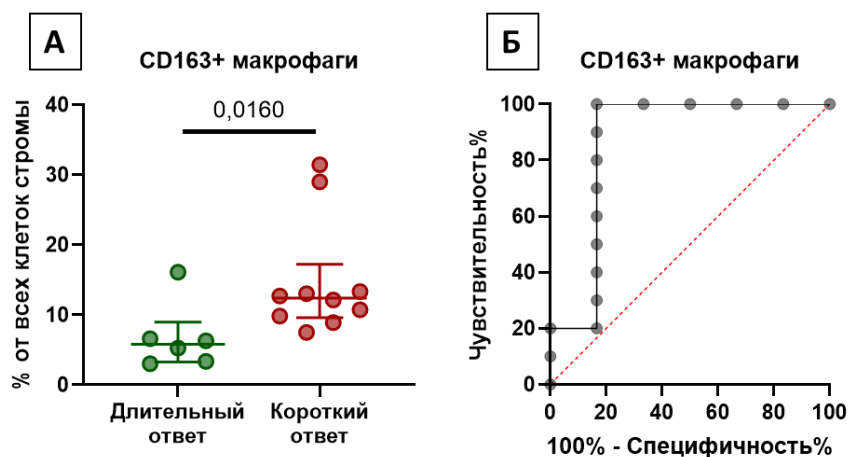


Рисунок 7 – А) количество CD163+ макрофагов в опухолевом микроокружении до начала ХИТ у пациентов с длительным и коротким ответом; Б) ROC-анализ значимости количества CD163+ макрофагов в микроокружении опухоли в качестве предиктора эффективности терапии атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом у пациентов с с ТНРМЖ

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. Модель имеет высокую степень достоверности ($p = 0,0097$).

Значение вероятности короткого ответа на ХИТ (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 $P \geq 50$ % определяют высокий риск короткого ответа на ХИТ, а при $P < 50$ % – низкий риск короткого ответа на ХИТ.

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

Были изучены транскриптомные особенности макрофагов у 11 пациентов с ТНРМЖ, стратифицированных в соответствии с длительностью вероятного ответа на ХИТ с помощью иммуногистохимического окрашивания CD163. 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 (Таблица 2).

Таблица 2 – Экспрессия генов функциональных маркеров макрофагов и цитокинов в спотах опухолевой ткани в группах пациентов, стратифицированных в соответствии с вероятностью длительного и короткого ответа на ХИТ

Ген	Группа 1 (длительный ответ)	Группа 2 (короткий ответ)	p
<i>CD16 (FCGR3A)</i>	1819/4645 (39,2 %)	1007/2839 (35,5 %)	0,001
<i>CD64 (FCGR1A)</i>	724/4645 (15,6 %)	358/2839 (12,6 %)	0,001
<i>TREM-1</i>	316/4645 (6,8 %)	429/2839 (15,1 %)	0,001
<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 %)	0,001
<i>IL12</i>	187/4240 (4,4 %)	33/2656 (1,2 %)	0,0001
<i>IL10</i>	102/4240 (2,4 %)	99/2656 (3,7 %)	0,002
<i>TNF-α</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-β</i>	1963/4240 (46,3 %)	1320/2656 (49,7 %)	0,006

Анализ дифференциальной экспрессии генов в стромальных спотах у больных ТНРМЖ показал, что в случаях с низкой долей CD163+ макрофагов в строме, то есть вероятностью длительного ответа на ХИТ, в стромальных спотах наблюдается увеличение экспрессии генов хемокинов *CXCL10*, *CXCL9*, регулирующих миграцию, дифференцировку и активацию иммунных клеток, а также увеличение экспрессии генов *S100A14*, *APOC1*, *CHI3L2*, кодирующих белки, ассоциированные со стимуляцией проопухолевых функций макрофагов. У пациентов с высокой долей CD163+ макрофагов, то есть вероятностью короткого ответа на химиоиммунотерапию, наблюдалось увеличение экспрессии генов *VEGFA*, *FN1*, *ANXA1*, *THBS1*, связанных с подавлением воспаления и ремоделированием стромы, а также одного из генов HLA класса II *HLA-DRB1* в микроокружении опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании была изучена не только связь функционального состояния макрофагов опухолевого микроокружения с клинико-морфологическими параметрами и PD-L1 статусом, но и возможная роль макрофагов в ограничении эффективности иммунотерапии.

M1 и M2 макрофаги присутствуют в опухоли у большинства пациентов, причем доля M2 макрофагов в 10 раз превышает долю M1. Среди всех макрофагов стромы фенотип PD1–PDL1+ в 2 раза чаще имеют M2 макрофаги в сравнении с M1, при этом доля PD1+PDL1– M2 макрофагов и PD1+PDL1– M1 макрофагов крайне низкая и не различается. 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 (Li W. et al., 2022), с другой стороны, высокое количество CD68+PD-L1+ макрофагов в опухолевой строме при ТНРМЖ ассоциировалось с более высокой общей выживаемостью (Wang J. et al., 2021). Согласно полученным нами данным, частота встречаемости и количество PD1+PDL1– M2 макрофагов были выше при трижды негативном раке, чем при люминальном, 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 проведенном 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. Также в данной работе с помощью многоцветной иммунофлуоресценции были визуализированы прямые контакты PD-1+ и PD-L1+ иммунных клеток стромы опухоли, в которых участвовали макрофаги (M1 и M2), как в качестве PD-1+, так и в качестве PD-L1+ клеток. Это указывает на то, что оба типа макрофагов задействованы в работе иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 как носители рецептора или лиганда.

Кроме того, с помощью метода пространственного профилирования транскриптома Visium 10x были показаны различия в иммунологических процессах, вовлекающих макрофаги и протекающих в строме опухоли, в зависимости от PD-L1 статуса. В случаях с негативным PD-L1 статусом CD68+ макрофаги могут в большей степени участвовать в презентации антигенов, а в случаях с позитивным PD-L1 статусом – рекрутинге лимфоцитов. CD163+ макрофаги слабо вовлечены в презентацию антигенов, но участвуют в регуляции ангиогенеза и фиброза, особенно при PD-L1-негативном статусе. Учитывая, что различается иммунологическая роль макрофагов микроокружения у пациентов с негативным и позитивным PD-L1 статусом, было обнаружено, что в этих же двух группах больных в CD68+ кластере и в CD163+ кластере есть различия в экспрессии генов рецепторов основных иммунных контрольных точек. Это подчеркивает, что роль макрофагов опухолевого микроокружения в регуляции иммунного ответа, в том числе посредством участия в функционировании иммунных контрольных точек, может различаться в зависимости от PD-L1 статуса.

Затем в нашем исследовании было показано, что с помощью определения в опухолевом микроокружении количества CD163+ макрофагов можно предсказать длительность клинической эффективности терапии атезолизумабом в комбинации с наб-паклитакселом у больных метастатическим или прогрессирующим трижды негативным РМЖ с позитивным PD-L1 статусом до ее начала с чувствительностью 100% и специфичностью 83,33%. Нужно отметить, что предикторная ценность CD163+ макрофагов при иммунотерапии ранее была продемонстрирована в исследовании M. Larroquette и соавт. у больных немелкоклеточным раком легкого (Larroquette M. et al., 2022). Кроме того, высокие уровни CD163+ клеток в первичной опухоли связаны с более короткой

выживаемостью при метастатическом РМЖ (Lindberg I. et al., 2025). То обстоятельство, 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 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 макрофагального состава у пациентов с трижды негативным РМЖ и РМЖ люминальных подтипов, а также различия в транскриптомном профиле макрофагов в зависимости от PD-L1 статуса опухоли. Кроме того, мы обнаружили, что количество CD163+ макрофагов в строме опухоли до начала терапии атезолизумабом в комбинации с nab-паклитакселом имеет значение для прогнозирования длительности ответа на данный тип терапии. Данные 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- β и TNF, регуляции ангиогенеза и пролиферации фибробластов.

4. В CD68+ 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+ кластере при PD-L1-позитивных опухолях экспрессия гена *CTLA4* (CTLA-4) статистически значимо выше ($p = 0,021$), а гена *SIRPA* (SIRP- α) – ниже ($p=0,0001$), чем при PD-L1-негативных опухолях. Экспрессия генов *PDCD1*, *LAG3* и *TIGIT*, кодирующих рецепторы иммунных контрольных точек, в CD68+ и CD163+ 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+ 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- β* 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

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

PD-L1 – programmed cell death ligand 1 – лиганд белка программированной клеточной смерти¹

TSA – tyramide signal amplification – тирамидная амплификация сигнала

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Калинин А.Ю. Транскриптомные характеристики макрофагов микроокружения опухоли у пациенток с трижды негативным раком молочной железы в зависимости от PD-L1 статуса опухоли [текст] / **А.Ю. Калинин**, И.А. Пацкан, С.В. Вторушин, Л.А. Таширева // Сибирский онкологический журнал. – 2025. – Т. 24. – №5. С. 64-71.
2. Калинин А.Ю. Иммунологические предикторы терапевтической эффективности атезолизумаба в комбинации с наб-паклитакселом при метастатическом трижды негативном раке молочной железы: пилотное многоцентровое ретроспективное ассоциативное исследование [текст] / **А.Ю. Калинин**, Н.О. Попова, А.А. Гофман, И.С. Усольцева, В.М. Перельмутер, Л.А. Таширева // Современная онкология. – 2024. – Т. 26. – № 4. – С. 414-419.
3. Калинин А.Ю. Визуализация контакта PD-L1-положительных и PD-1-положительных иммунных клеток в микроокружении рака молочной железы [текст] / **А.Ю. Калинин**, В.М. Перельмутер, Л.А. Таширева // Сибирский онкологический журнал. – 2024. – Т. 23. – № 1. – С. 87-97.
4. Tashireva, L.A. Spatial Profile of Tumor Microenvironment in PD-L1-Negative and PD-L1-Positive Triple-Negative Breast Cancer [текст] / L.A. Tashireva, **A.Yu. Kalinchuk**, T.S. Gerashchenko, M. Menyailo, A. Khozyainova, E.V. Denisov, V.M. Perelmuter // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24(2). – P. 1433.
5. Калинин А.Ю. Фенотипическое разнообразие M1 и M2 макрофагов микроокружения опухоли у пациенток с раком молочной железы: ассоциация с клинико-патологическими параметрами [текст] / **А.Ю. Калинин**, Л.А. Таширева, В.М. Перельмутер // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2023. – Т. 12. – № 3. – С. 28-40.
6. Калинин А.Ю. Характеристика макрофагов в опухолевом микроокружении: связь с клинико-морфологическими параметрами и PD-L1 статусом рака молочной железы [текст] / **А.Ю. Калинин** // Сборник тезисов докладов участников V Международной научной конференции "Наука будущего" и VIII Всероссийского молодежного научного форума "Наука будущего - наука молодых", Орел, 20-23 сентября 2023 года. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Инконсалт К". – 2023. – С. 102.
7. Калинин А.Ю. Доля макрофагов в опухоли является предсказательным маркером эффективности иммунотерапии у больных раком молочной железы [текст] / **А.Ю. Калинин**, Е.С. Григорьева, И.В. Ларионова, Н.О. Попова, Л.А. Таширева // Путь в науку: Материалы XII Научно-практической конференции с международным участием, Москва, 14 декабря 2023 года. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА". – 2023. – С. 30-31.
8. Патент на изобретение № 2842308 С1, 24.06.2025. Способ прогнозирования ответа на комбинированную терапию наб-паклитакселом и атезолизумабом у больных метастатическим трижды негативным раком молочной железы / Л.А. Таширева, **А.Ю. Калинин**, А.В. Бузенкова, Н.О. Попова, В.Е. Гольдберг.