

Для цитирования: *Калинчук А.Ю., Перельмутер В.М., Таширева Л.А.* Визуализация контакта PD-L1-положительных и PD-1-положительных иммунных клеток в микроокружении рака молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2024; 23(1): 87–97. – doi: 10.21294/1814-4861-2024-23-1-87-97

For citation: *Kalinchuk A.Yu., Perelmuter V.M., Tashireva L.A.* Visualization of PD-L1-positive and PD-1-positive immune cell contact in the breast cancer microenvironment. Siberian Journal of Oncology. 2024; 23(1): 87–97. – doi: 10.21294/1814-4861-2024-23-1-87-97

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ КОНТАКТА PD-L1-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И PD-1-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ИММУННЫХ КЛЕТОК В МИКРООКРУЖЕНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.Ю. Калинчук, В.М. Перельмутер, Л.А. Таширева

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

Аннотация

Функционирование иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 в микроокружении рака молочной железы (РМЖ) может приводить к ускользанию опухоли от иммунного ответа. Однако неизвестно, как часто в ткани опухоли наблюдается контакт PD-L1 с PD-1, какие PD-L1-позитивные клетки преимущественно участвуют во взаимодействии и какую прогностическую значимость, в том числе у пациентов с иммунотерапией, оно имеет. **Цель исследования** – оценить частоту встречаемости ко-локализации PD-1-положительных и PD-L1-положительных клеток в микроокружении РМЖ вне проведения иммунотерапии, а также определить популяционную принадлежность данных клеток. **Материал и методы.** В исследование включено 25 пациентов с инвазивной карциномой молочной железы. С использованием мультиплексной TSA (tyramide signal amplification)-модифицированной иммуногистохимии в опухолевом микроокружении были визуализированы контакты иммунных клеток, одна из которых несет PD-1, а другая – PD-L1. Было оценено участие в таких взаимодействиях M1 макрофагов, M2 макрофагов, лимфоцитов и других иммунных клеток. **Результаты.** У половины больных РМЖ, включенных в исследование, в микроокружении обнаружены взаимодействия иммунных клеток, одна из которых несет PD-1, а другая – PD-L1. Наличие контактов клеток, несущих PD-1 и PD-L1, связано с уровнем TILs и соотношением количества PD-1+ и PD-L1+ клеток в микроокружении опухоли. Взаимодействие PD-1/PD-L1 было характерно в равной степени для пациенток как с положительным, так и с отрицательным PD-L1-статусом. В рассмотренных клеточных контактах в роли PD-L1+ клеток в подавляющем большинстве случаев выступали макрофаги. Лимфоциты скорее являлись PD-1-положительными клетками при контакте, чем клетками, несущими PD-L1. Кроме того, обнаружено, что безметастатическая выживаемость не сопряжена с наличием или отсутствием в опухолевом микроокружении ко-локализованных клеток, несущих PD-1 и PD-L1. **Заключение.** Ко-локализация иммунных клеток, несущих PD-1 и PD-L1, характерна для микроокружения РМЖ, и в таких взаимодействиях участвуют M1 и M2 макрофаги, CD3+ лимфоциты и другие иммунные клетки. Дальнейшие исследования требуются для установления прогностической значимости таких контактов.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроокружение, PD-1, PD-L1, макрофаги.

VISUALIZATION OF PD-L1-POSITIVE AND PD-1-POSITIVE IMMUNE CELL CONTACT IN THE BREAST CANCER MICROENVIRONMENT

A.Yu. Kalinchuk, V.M. Perelmuter, L.A. Tashireva

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences
5, Kooperativny St., Tomsk, 634009, Russia

Abstract

Functioning of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint in the microenvironment of breast cancer may lead to the tumor escape from the immune response. However, it is unknown how often PD-L1 binds to PD-1 in breast cancer patients, which PD-L1-positive cells are predominantly involved in the interaction, and what prognostic significance it has. **The objective of the study** was to assess the frequency of co-location of PD-1/PD-L1-positive cells in the microenvironment of breast cancer as well as to determine the population of these cells. **Material and Methods.** The study included 25 patients with invasive breast carcinoma. Interaction between cells carrying the PD-1 receptor and the PD-L1 ligand in the tumor microenvironment were visualized using multiplex TSA (tyramide signal amplification)-modified immunohistochemistry. Participation of M1 macrophages (CD68+CD163-CD3-CKAE1/3-), M2 macrophages (CD68+/-CD163+CD3-CKAE1/3-), lymphocytes (CD68-CD163-CD3+CKAE1/3-) and other immune cells in these interactions was assessed. **Results.** Half of the breast cancer patients included in the study had interactions of immune cells of the microenvironment, one of which carried PD-1, and the other carried PD-L1. The contact of cells carrying PD-1 and PD-L1 was associated with the level of TILs and the ratio of PD-1+ / PD-L1+ cells in the tumor microenvironment. The PD-1/PD-L1 interaction was found with similar frequency in PD-L1 positive and negative patients. In the cell contacts, macrophages acted as PD-L1+ cells in the vast majority of cases. Lymphocytes were PD-1-positive cells rather than PD-L1- carrying cells. In addition, it was found that metastasis-free survival was not associated with the presence or absence of co-localized cells carrying PD-1 and PD-L1 in the tumor microenvironment. **Conclusion.** Co-location of immune cells carrying PD-1 and PD-L1 occurs in breast cancer. M1 and M2 macrophages, CD3+ lymphocytes and other immune cells are involved in these interactions. However, further studies are needed to establish the prognostic significance of these contacts.

Key words: breast cancer, tumor microenvironment, PD-L1, PD-1, macrophages.

Введение

Избыточная активация механизмов иммунного ответа может привести к серьезным патологиям, поэтому в организме человека существуют регулирующие механизмы для поддержания гомеостаза, одним из которых является иммунная контрольная точка PD-1/PD-L1. Белок запрограммированной смерти 1 (PD-1) является распространенным иммунодепрессантом на поверхности иммунных клеток и играет важную роль в подавлении иммунного ответа и развитии аутоolerантности. Взаимодействие между PD-1 и его лигандом PD-L1 ослабляет передачу сигналов Т-клеточного рецептора и подавляет активацию Т-клеток [1]. Экспрессия PD-L1 характерна для Т-клеток, В-клеток, дендритных клеток и макрофагов, а также для опухолевых клеток, которые используют данный физиологический механизм, чтобы избежать иммунной атаки. Центральным звеном противоопухолевого иммунного ответа считаются CD8+ Т-клетки. Взаимодействие PD-1-положительных CD8+ Т-клеток и PD-L1-положительных опухолевых клеток, как считается, приводит к неспособности CD8+ Т-клеток осуществлять противоопухолевые функции. В экспериментальных работах это приводило к уклонению опухоли от иммунного ответа и прогрессированию заболевания [2]. Вопрос о роли PD-L1 на иммунных клетках, инфильтрирующих опухоль, остается спорным. Макрофаги являются одними из наиболее часто встречающихся клеток в микроокружении опухоли, поэтому функция PD-L1 в макрофагах представляет не меньший интерес. С одной стороны, считается, что связывание PD-L1-положительного макрофага и PD-1-положительной Т-клетки приводит к подавлению активности как

Т-клетки, так и макрофага [3]. С другой стороны, показано, что PD-L1, экспрессируемый на макрофагах, не ингибирует ответ Т-клеток, а защищает макрофаги от разрушения Т-клетками, в отличие от PD-L1, экспрессируемого на опухолевых клетках [4], связывание с которым приводит к такому эффекту. Кроме того, есть данные, свидетельствующие о том, что экспрессия PD-L1 макрофагами связана с их поляризацией в сторону проопухолевого фенотипа M2 [5].

Иммунотерапия, основанная на блокаде иммунных контрольных точек (ИКТ) PD-1/PD-L1, продемонстрировала многообещающие результаты в клинических испытаниях при различных видах рака [6–8], а экспрессия PD-L1 в опухоли или в микроокружении опухоли (при трижды негативном РМЖ) является одним из основных критериев назначения терапии ингибиторами ИКТ. Однако зачастую даже у пациентов с положительным PD-L1 статусом не наблюдается ожидаемой частоты объективного ответа на анти-PD-1/PD-L1 терапию [9]. В настоящее время проводится большое количество исследований, посвященных поиску причин не соответствующей ожиданиям эффективности иммунотерапии и, соответственно, более надежных предикторных маркеров ответа.

Визуализация контакта клеток считается наиболее достоверным методом для изучения их взаимодействия [10]. Неизвестно, как часто у больных РМЖ наблюдается связывание PD-L1 с PD-1, какие PD-L1-позитивные клетки преимущественно участвуют во взаимодействии и какую прогностическую значимость оно несет. Если учесть, что ко-локализованные макрофаги могут демонстрировать проопухолевый фенотип, то применение

анти-PD-1/PD-L1 терапии в таком случае может быть не только не эффективным, но и в некоторых случаях приводить к прогрессированию опухоли [11]. Изучение ко-локализации иммуноцитов в микроокружении тем более актуально при РМЖ, поскольку рекомендуемым прогностическим критерием эффективности терапии ингибиторами PD-L1 является доля иммуноцитов, но не опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1.

Цель исследования – оценить частоту встречаемости ко-локализации PD-1-положительных и PD-L1-положительных клеток в микроокружении РМЖ вне проведения иммунотерапии, а также определить популяционную принадлежность данных клеток.

Материал и методы

В исследование включены 25 пациенток (табл. 1) с гистологически верифицированным диагнозом инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (T1–4N0–3M0, возраст от 43 до 78 лет), проходивших лечение на базе НИИ онкологии Томского НИМЦ. Пациентки получали терапию в соответствии с клиническими рекомендациями.

Материалом исследования послужили срезы ткани первичной опухоли, предварительно фиксированной формалином и залитой парафином. Метод мультиплексной TSA-модифицированной иммуногистохимии (ИГХ) срезов ткани позволил

идентифицировать и подсчитать иммунные клетки в строме опухоли молочной железы. С помощью иммуостейнера BOND RXm (Leica, Germany) была проведена автоматическая депарафинизация, демаскировка и окраска ткани. Для окрашивания ткани были использованы первичные антитела anti-PD-1 (Cell Marque, USA, clone NAT105, 1:100), anti-CD68 (Agilent Dako, USA, clone KP1, 1:5), anti-PD-L1 (Ventana, USA, clone SP142, 1:50), anti-CD3 (Agilent Dako, USA, polyclonal, 1:5), anti-CD163 (Diagnostic Biosystems, USA, clone 10D6, 1:100), anti-pan-CK (Agilent Dako, USA, clone AE1/AE3, 1:20) и набор Opal 7-color Automation IHC Kit (Akoya Bioscience, USA). Для окрашивания ядер применяли ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, USA). Оценить в каждой клетке среза ткани экспрессию PD-1, CD68, CD3, CD163 и СКАЕ1/3 позволило создание комплексов маркер-Opal: PD-1 – Opal520 (1:150), CD68 – Opal540 (1:150), PD-L1 – Opal570 (1:150), CD3 – Opal620 (1:150), CD163 – Opal650 (1:150), СКАЕ1/3 – Opal690 (1:150). Окрашенные срезы ткани сканировали при 20-кратном увеличении с использованием автоматизированной системы для мультиплексного иммуофлуоресцентного анализа Vectra 3.0.3 (PerkinElmer, USA) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа изображений InForm (PerkinElmer, v2.4.2).

Таблица 1/Table 1

**Клинико-патологические характеристики пациентов
Clinicopathological characteristics of patients**

Параметры/Parameters	Частота/Frequency	
Возраст/Age	<50 лет/years	7 (28 %)
	>50 лет/years	18 (72 %)
Менструальная функция/ Menstrual function	Сохранена/Saved	8 (32 %)
	Менопауза/Menopause	17 (68 %)
Неoadъювантная химиотерапия/ Neoadjuvant chemotherapy	Нет/No	20 (80 %)
	Есть/Yes	3 (12 %)
	Нет данных/No data	2 (8 %)
Молекулярный подтип/ Molecular subtype	Люминальный А/Luminal A	4 (16 %)
	Люминальный В (HER2-)/Luminal B (HER2-)	16 (64 %)
	Трижды негативный/Triple negative	4 (16 %)
	Нет данных/No data	1 (4 %)
Лимфогенные метастазы/ Lymph node metastasis	Нет/No	15 (60 %)
	Есть/Yes	8 (32 %)
	Нет данных/No data	2 (8 %)
Гематогенные метастазы/ Hematogenous metastasis	Нет/No	19 (76 %)
	Есть/Yes	5 (20 %)
	Нет данных/No data	1 (4 %)
TILs	<10 %	6 (24 %)
	>10 %	19 (76 %)
PD-L1	<1 %	18 (72 %)
	>1 %	7 (28 %)

Примечание: таблица составлена авторами.

Note: created by the authors.

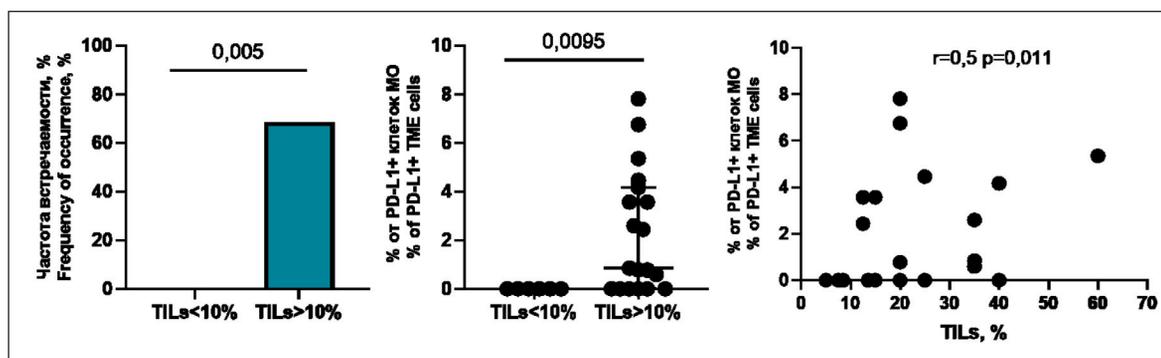


Рис. 2. Частоты встречаемости ко-локализаций клеток, несущих PD-1 и PD-L1, и количество PD-L1+ клеток, ко-локализованных с PD-1+ клетками, в зависимости от уровня TILs; корреляция количества ко-локализованных клеток и уровня TILs (коэффициент корреляции Спирмена). Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 2. Frequency of co-localization of cells carrying PD-1 and PD-L1, and the number of PD-L1+ cells co-localized with PD-1+ cells with relation to the level of TILs; correlation between the number of co-localized cells and the level of TILs (Spearman's correlation coefficient). Note: created by the authors

выше у больных с ко-локализациями, чем у пациенток без них (0,36 (0,07; 0,69 и 0,16 (0,005; 0,32); $p=0,019$) (рис. 1).

Связь между количеством ко-локализованных клеток микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1, и уровнем TILs

Проведена оценка частоты встречаемости ко-локализации иммунных клеток с PD-1 и PD-L1 в зависимости от уровня TILs (рис. 2). Уровень TILs ниже 10 % (7,5 (7,5; 8,5) %) был у 6 (24 %) пациенток, выше 10 % (20,0 (15,0; 35,0) %) – у 19 (76 %) больных РМЖ. Анализ показал, что ко-локализации обнаруживались только у пациенток с уровнем TILs выше 10 % (в количестве 0,85 (0; 4,17) % от всех PD-L1+ клеток микроокружения; $p=0,0095$). При этом между количеством ко-локализаций и уровнем TILs наблюдалась умеренная положительная корреляция ($r=0,5$; $p=0,011$).

Ко-локализации клеток микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1, в случаях с положительным и отрицательным PD-L1 статусом опухоли

Важной представлялась оценка наличия ко-локализаций иммунных клеток, несущих PD-1 и

PD-L1, у пациенток с положительным и отрицательным PD-L1-статусом. Поскольку при оценке PD-L1 статуса рассчитывается количество PD-L1+ клеток на площадь всей ткани, в некоторых случаях с отрицательным PD-L1 статусом доля PD-L1+ клеток в расчете на площадь стромы может быть выше порогового значения в 1 %. Данные о количестве PD-L1+ клеток, а также PD-1+ клеток в группах пациентов с положительным и отрицательным PD-L1 статусом представлены в табл. 2. Количество PD-1+ клеток микроокружения, приходящееся на каждую PD-L1+ клетку, а также уровень TILs не различались в зависимости от PD-L1 статуса (табл. 2).

У пациенток с отрицательным PD-L1 статусом обнаруживались PD-L1+ иммунные клетки ко-локализованные с PD-1+ клетками (55,5 % (10/18)), причем с той же частотой, что и у больных с позитивным PD-L1 статусом (42,86 % (3/7), $p=0,673$). Доля ко-локализованных клеток также не различалась у пациенток с отрицательным и положительным PD-L1 статусом (1,6 (0; 4,2) и 0 (0; 0,8) % соответственно; $p=0,187$) (рис. 3).

Частота встречаемости и количество пар иммунных клеток микроокружения, взаимодействующих через PD-1/PD-L1, не различались в зависимости от PD-L1 статуса (рис. 4).

Таблица 2/Table 2

**Характеристики микроокружения опухоли в зависимости от PD-L1 статуса
Characteristics of the tumor microenvironment depending on PD-L1 status**

Параметры/Parameters		Отрицательный PD-L1 статус/ Negative PD-L1 status (n=18)	Положительный PD-L1+ статус/ Positive PD-L1 status (n=7)	p
Количество PD-L1+ клеток/ the number of PD-L1+ cells	% от всех клеток МО/ % of all TME cells	4,1 (2,9; 8,8)	18,0 (14,6; 18,5)	<0,001
Количество PD-1+ клеток/ the number of PD-1+ cells	% of all TME cells	0,9 (0,3; 3,1)	4,8 (1,8; 9,1)	0,005
Соотношение PD-1/PD-L1/PD-1/PD-L1 ratio		0,26 (0,05; 0,58)	0,29 (0,12; 0,41)	0,615
TILs, %		15,0 (8,25; 21,25)	25,0 (13,5; 35,0)	0,170

Примечание: таблица составлена авторами.

Note: created by the authors.

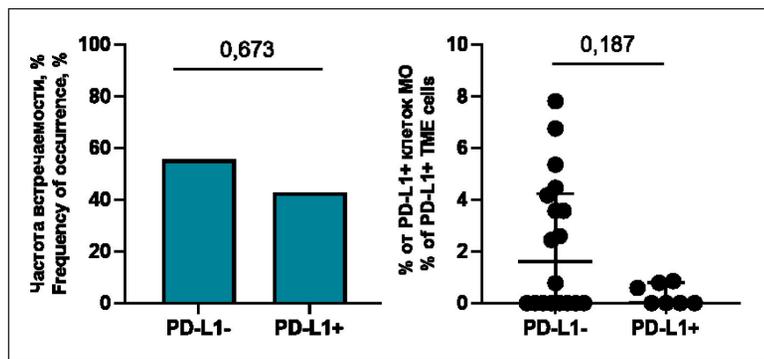


Рис. 3. Частота встречаемости ко-локализаций клеток, несущих PD-1 и PD-L1, и количество PD-L1+ клеток, ко-локализованных с PD-1+ клетками, в зависимости от PD-L1 статуса. Примечание: рисунок выполнен авторами
 Fig. 3. The frequency of co-localization of cells carrying PD-1 and PD-L1, and the number of PD-L1+ cells co-localized with PD-1+ cells with relation to the PD-L1 status. Note: created by the authors

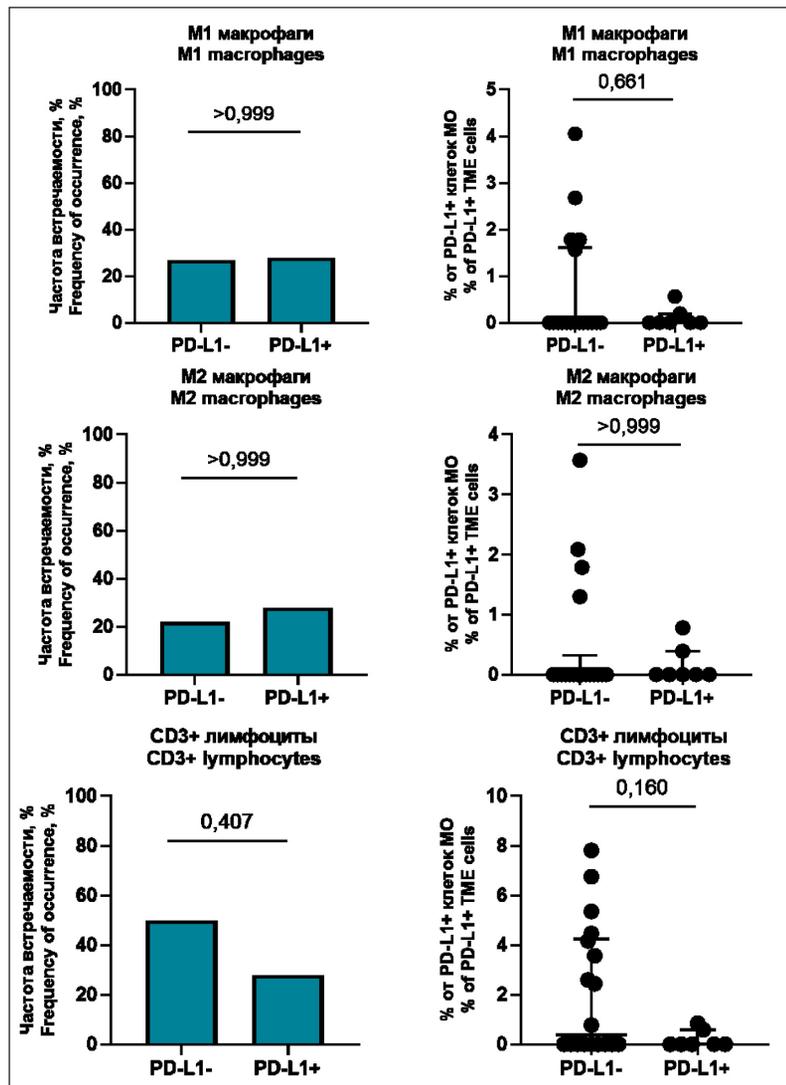


Рис. 4. Частоты встречаемости и количество ко-локализаций, включающих M1 макрофаги, M2 макрофаги или лимфоциты, в зависимости от PD-L1 статуса. Примечание: рисунок выполнен авторами
 Fig. 4. The frequency and the number of co-localizations including M1 macrophages, M2 macrophages or lymphocytes with respect to PD-L1 status. Note: created by the authors

Ко-локализации PD-L1+ M1 макрофагов с PD-1+ клетками в случаях с отрицательным PD-L1 статусом обнаруживались у 27,7 % пациенток (5/18) и составляли 0 (0; 1,6) % от всех PD-L1+ клеток микроокружения, в случаях с положительным PD-L1 – у 28,6 % пациенток (2/7) и составляли 0 (0; 0,2) % от всех PD-L1+ клеток микроокружения (p>0,999; p=0,661). Ко-локализации PD-L1+ M2 макрофагов с PD-1+ клетками в случаях с отрицательным PD-L1 статусом обнаруживались

у 22,2 % (4/18) и составляли 0 (0; 0,3) % от всех PD-L1+ клеток микроокружения, в случаях с положительным PD-L1 – 28,6 % (2/7), 0 (0; 0,4) % от всех PD-L1+ клеток микроокружения (p>0,999; p>0,999). Ко-локализации PD-L1+ клеток с PD-1+ CD3+ лимфоцитами (или PD-L1+ CD3+ лимфоцитов с PD-1+ клетками) в случаях с отрицательным PD-L1 статусом обнаруживались у 50 % пациенток (9/18) и составляли 0,4 (0; 4,2) % от всех PD-L1+ клеток микроокружения, в случаях с положитель-

Таблица 3/Table 3

Частоты встречаемости ко-локализаций в опухолевом микроокружении иммуноцитов с рецептором PD-1 и лигандом PD-L1

Frequency of co-localizations in the tumor microenvironment of immunocytes with PD-1 receptor and PD-L1 ligand

Ко-локализации/Co-localizations	Частота/Frequency
PD1-PDL1+ M1 макрофаги и PD1+PDL1- лимфоциты / PD1-PDL1+ M1 macrophages and PD1+PDL1- lymphocytes	7 (28,0 %)
PD1-PDL1+ M2 макрофаги и PD1+PDL1- лимфоциты / PD1-PDL1+ M2 macrophages and PD1+PDL1- lymphocytes	4 (16,0 %)
PD1-PDL1+ M2 макрофаги и PD1+PDL1- другие клетки / PD1-PDL1+ M2 macrophages and PD1+PDL1- other cells	2 (8,0 %)
PD1+PDL1+ M2 макрофаги и PD1+PDL1+ другие клетки / PD1+PDL1+ M2 macrophages and PD1+PDL1+ other cells	1 (4,0 %)
PD1+PDL1- лимфоциты и PD1-PDL1+ другие клетки / PD1+PDL1- lymphocytes and PD1-PDL1+ other cells	7 (28,0 %)
PD1-PDL1+ лимфоциты и PD1+PDL1- другие клетки / PD1-PDL1+ lymphocytes and PD1+PDL1- other cells	3 (12,0 %)

Примечание: таблица составлена авторами.

Note: created by the authors.

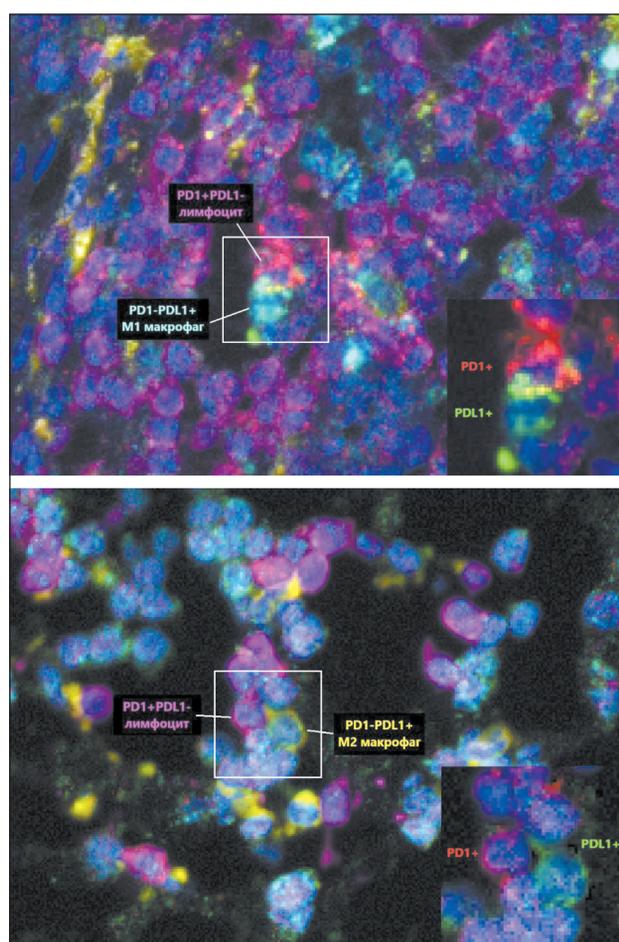


Рис. 5. TSA-модифицированная ИГХ, маркеры с присвоенными им псевдоцветами (CD68 – голубой, CD163 – желтый, CD3 – фиолетовый, PD-1 – красный, PD-L1 – зеленый), ×400.

Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 5. TSA-modified IHC, markers with pseudo-colors assigned to them (CD68 – cyan, CD163 – yellow, CD3 – magenta, PD-1 – red, PD-L1 – green), ×400. Note: created by the authors

ным PD-L1 – у 28,6 % пациенток (2/7) и составляли 0 (0; 0,6) % от всех PD-L1+ клеток микроокружения (p=0,407; p=0,160).

В табл. 3 и на рис. 5 представлены фенотипы ко-локализованных клеток и частоты их встречаемости. Макрофаги участвовали в рассмотренных клеточных контактах в роли клеток, несущих PD-L1. Для макрофагов, несущих PD-1, не были характерны контакты с клетками, несущими PD-L1. Наоборот, для лимфоцитов с экспрессией PD-1 ко-локализации были более характерны, чем для лимфоцитов с экспрессией PD-L1.

Межперсональные различия встречаемости ко-локализованных клеток микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1

Кроме того, было оценено количество различных ко-локализаций клеток с рецептором и лигандом у каждого пациента (рис. 6). Не более трех различных пар ко-локализованных клеток присутствовало в микроокружении опухоли. У 3 из 13 пациентов были ко-локализованы только PD1-PDL1+ M1 макрофаги и PD1+PDL1- лимфоциты, а также PD1+PDL1- лимфоциты и PD1-PDL1+ «другие» клетки, у 2 из 13 пациентов – только PD1-PDL1+ M2 макрофаги и PD1+PDL1-лимфоциты, а также PD1+PDL1- лимфоциты и PD1-PDL1+ «другие» клетки. У 2 из 13 в микроокружении обнаруживались ко-локализации как M1 макрофагов (PD1-PDL1+ M1 макрофаги и PD1+PDL1- лимфоциты), так и M2 макрофагов (PD1-PDL1+ M2 макрофаги и PD1+PDL1- лимфоциты). У остальных пациентов комбинации ко-локализованных клеток варьировали. Кроме того, у 5 из 13 пациентов были ко-локализованы M1, но не M2 макрофаги, и у 4 из 13 – M2 макрофаги, но не M1.

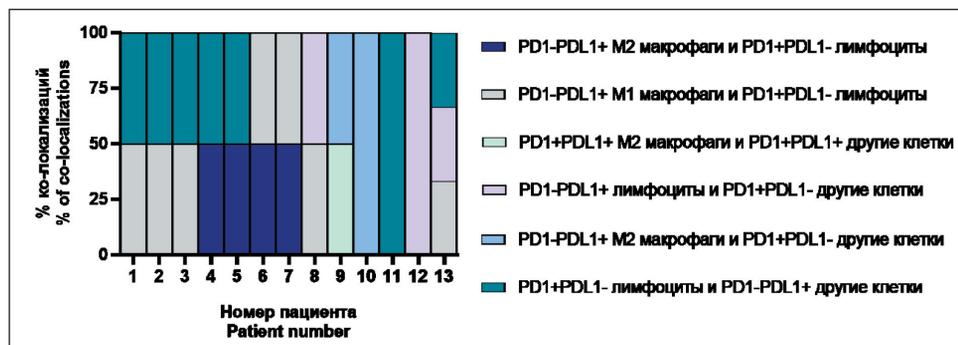


Рис. 6. Комбинации ко-локализаций у пациенток с ко-локализациями клеток, несущих PD-1 и PD-L1. Примечание: рисунок выполнен авторами
Fig. 6. Combinations of co-localizations in patients with co-localizations of cells carrying PD-1 and PD-L1. Note: created by the authors

Оценка безметастатической выживаемости больных РМЖ в зависимости от наличия ко-локализаций клеток, несущих PD-1 и PD-L1, в опухолевом микроокружении

У включенных в исследование больных РМЖ безметастатическая выживаемость за весь срок наблюдения (медиана – 48 мес) при отсутствии ко-локализаций клеток с экспрессией PD-1 и PD-L1 в опухолевом микроокружении равнялась 83,3 % (10/12), а при наличии ко-локализаций PD-1 и PD-L1 – 76,9 % (10/13) (p=0,372) (рис 7). Таким образом, безметастатическая выживаемость не была сопряжена с наличием или отсутствием в опухолевом микроокружении ко-локализованных клеток, несущих PD-1 и PD-L1.

Обсуждение

Механизм действия иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 известен давно, исследована прогностическая роль определения в опухоли и опухолевой строме экспрессии белка PD-L1 для течения заболевания и эффективности терапии, но к настоящему моменту накоплено много данных, демонстрирующих недостаточную прогностическую точность этого параметра. Положительный PD-L1 статус для больных РМЖ означает, что в микроокружении опухоли присутствует много PD-L1+ иммунных клеток, но не означает, что они взаимодействуют с PD-1+ клетками. В отличие от экспрессии PD-L1, визуализация контактов клеток в опухоли, одна из которых несет рецептор PD-1, а другая – лиганд PD-L1, напрямую указывает на функционирование контрольной точки PD-1/PD-L1. К настоящему моменту проведен ряд исследований, предлагающих методы визуализации в опухоли прямых контактов клеток, несущих PD-1 и PD-L1 [13].

Согласно полученным в нашем исследовании результатам, ко-локализация PD-L1+ клеток микроокружения с PD-1+ клетками обнаруживается лишь у половины больных РМЖ, причём их количество равнялось 3–4 на 100 PD-L1+ клеток. Ко-локализации PD-1+ и PD-L1+ клеток являются достаточно редкими событиями, однако мы обнаружили закономерности, которые лежат в основе этих событий. Во-первых, непосредственный контакт PD-1+ и PD-L1+ клеток был обнаружен

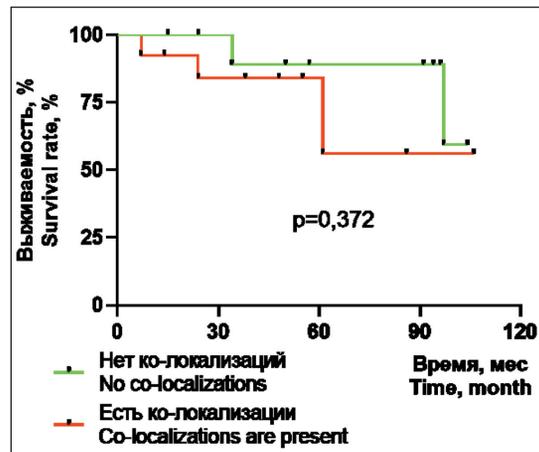


Рис. 7. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от наличия ко-локализаций клеток, несущих PD-1 и PD-L1. Примечание: рисунок выполнен авторами
Fig. 7. Metastasis-free survival of patients with breast cancer depending on the presence of co-localizations of cells carrying PD-1 and PD-L1. Note: created by the authors

только у больных РМЖ с уровнем TILs выше 10 %. Это можно объяснить тем, что при высоком уровне TILs иммунные клетки расположены в строме на меньшем расстоянии друг от друга, что повышает вероятность их непосредственного контакта. Во-вторых, в группе больных с обнаруженными ко-локализациями соотношение PD-1/PD-L1 было выше. Это указывает на то, что контакт PD-L1+ клеток с PD-1+ тем более вероятен, чем более PD-1+ клеток приходится на каждую PD-L1+ клетку.

Однако ко-локализации иммунных клеток, несущих PD-1 и PD-L1, в микроокружении обнаруживались в равном количестве в группах больных РМЖ с положительным и отрицательным PD-L1 статусом, несмотря на то, что при положительном PD-L1 статусе в микроокружении опухоли значительно больше PD-L1+ и PD-1+ клеток. Схожие результаты получены в исследовании J. Sánchez-Magraner et al. [14], в котором с помощью метода iFRET оценено взаимодействие в опухоли рецептора PD-1 и лиганда PD-L1. Взаимодействие PD-1/PD-L1 в опухоли при меланоме наблюдалось в равной степени при высокой и при низкой экспрессии PD-L1.

Стоит отметить, что само по себе значение PD-L1 статуса как прогностического маркера течения РМЖ является противоречивым, судя по литературным данным. Согласно метаанализу, положительный PD-L1 статус при РМЖ достоверно связан с более короткой общей выживаемостью, но при этом не имеет существенной связи с безметастатической выживаемостью [15]. Однако в другом исследовании PD-L1+ TILs были связаны с лучшей выживаемостью [16]. Но нет исследований, где бы изучалась прогностическая роль частоты контактов в опухоли клеток, несущих PD-1 и PD-L1, у больных РМЖ. Согласно полученным нами данным, безметастатическая выживаемость у больных РМЖ не сопряжена с наличием или отсутствием ко-локализованных клеток, несущих PD-1 и PD-L1.

Кроме того, нами обнаружено, что вне зависимости от PD-L1 статуса как M1, так и M2 макрофаги участвуют в рассмотренных взаимодействиях в качестве клеток, несущих лиганд PD-L1. M1 макрофаги играют важную роль в презентации антигена, секреции провоспалительных цитокинов и противоопухолевой резистентности, тогда как M2 макрофаги способствуют разрешению воспаления и развитию опухоли [17]. Согласно литературным данным, взаимодействие рецептора PD-1 и лиганда PD-L1 приводит к изменению функционального состояния контактирующих клеток. Считается, что связывание PD-L1, экспрессируемого на макрофагах с PD-1 на Т-клетках, приводит к подавлению активации Т-клеток и ускользанию опухолевых клеток от иммунитета. E. Peranzoni et al. показано, что при плоскоклеточном раке легкого в строме опухоли макрофаги контактируют с лимфоцитами, формируя длительные взаимодействия с CD8+ Т-клетками [18]. Истощение макрофагов ингибитором рецептора колониестимулирующего фактора-1 (CSF-1R), которое приводит к исключению контакта макрофагов и CD8+ Т-клеток в строме, в сочетании с анти-PD-1 у мышей усиливает миграцию и инфильтрацию CD8+ Т-клеток в опухоли [18].

Менее ясен результат взаимодействия PD-L1+ макрофагов и PD-1+ лимфоцитов для макрофагов. С одной стороны, это взаимодействие, вероятно, приводит к ингибированию их функции, поскольку результат взаимодействия PD-L1/PD-1 может считаться одинаковым для макрофагов и Т-клеток, учитывая, что это общий эффект лиганд-рецептор [3]. В таком случае существенное значение для эффекта терапии ИИКТ имел бы фенотип (противоопухолевый или проопухолевый) «разблокированных» клеток. С другой стороны, S. Singhal et al. показали, что PD-L1, экспрессируемый на макрофагах, не ингибирует ответ Т-клеток, а просто защищает макрофаги от разрушения Т-клетками, в отличие от PD-L1, экспрессируемого на опухолевых клетках [4]. G.P. Hartley et al. получены

результаты, указывающие на то, что PD-L1, экспрессирующийся на макрофагах, через путь mTOR стимулирует приобретение макрофагом иммуносупрессивного фенотипа [19]. Обработка PD-L1+ мышинных и человеческих макрофагов растворимым PD-1, растворимым CD80 и антителами к PD-L1 приводила к схожим результатам – наблюдалось повышение спонтанной пролиферации, а также экспрессии костимулирующих молекул и продукции провоспалительных цитокинов [19].

В настоящий момент нет единого мнения по поводу механизма влияния белка PD-L1 на функциональное состояние макрофагов, не полностью изучен результат взаимодействия PD-L1, экспрессирующегося на M1 и M2 макрофагах, с PD-1 других клеток и эффект ИИКТ, опосредованный действием на макрофаги.

Одна из сторон механизма действия анти-PD-1 или анти-PD-L1 иммунотерапии заключается в создании препятствия для функционирования иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 и предотвращении таким путем ингибирования механизмов противоопухолевого иммунитета. Однако для эффективности этого механизма необходимо, чтобы иммунная контрольная точка изначально функционировала в опухоли. О возможности такого функционирования может свидетельствовать обнаружение в опухоли изначальной ко-локализации PD-1/PD-L1. По данным J. Sánchez-Magraner et al., у пациентов с метастатическим немелкоклеточным раком легкого, получавших анти-PD-1- или анти-PD-L1-терапию, общая выживаемость и выживаемость без прогрессирования были выше в тех случаях, когда взаимодействие PD-1/PD-L1 в опухоли встречалось чаще, но при этом не различалась в зависимости от уровня экспрессии PD-L1 [20]. Это подтверждает, что наличие в опухоли ко-локализованных клеток, несущих PD-1 и PD-L1, свидетельствует в пользу работы иммунной контрольной точки PD-1/PD-L1 точнее, чем положительный PD-L1 статус. Предполагается, что в опухолях с частым взаимодействием PD-1 и PD-L1 превалирует именно этот путь уклонения от разрушения иммунными клетками, и поэтому они с большей вероятностью реагируют на анти-PD-1- или анти-PD-L1- иммунотерапию.

Заключение

В микроокружении РМЖ обнаружены взаимодействия PD-1 и PD-L1 иммунных клеток, причем вероятность данного взаимодействия тем выше, чем выше уровень TILs и соотношение количества PD-1+ и PD-L1+ клеток в микроокружении опухоли. У пациенток с положительным и отрицательным PD-L1 статусом не различалось количество ко-локализаций PD-1+ и PD-L1+ клеток, приходящихся на PD-L1+ клетки микроокружения, вне зависимости от того, какие клетки (M1 макрофаги, M2 макрофаги или лимфоциты)

участвовали в таком взаимодействии. Не выявлено связи между наличием или отсутствием в опухолевом микроокружении ко-локализованных клеток, несущих PD-1 и PD-L1, и безметастатической выживаемостью. Значение ко-локализации

иммунных клеток микроокружения, несущих PD-1 и PD-L1, для реализации их функций и значимость параметров, характеризующих ко-локализацию, для предсказания эффекта терапии ИКТ требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol.* 2006; 27(4): 195–201. doi: 10.1016/j.it.2006.02.001.

2. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res.* 2020; 10(3): 727–42.

3. Lu D, Ni Z, Liu X, Feng S, Dong X, Shi X, Zhai J, Mai S, Jiang J, Wang Z, Wu H, Cai K. Beyond T Cells: Understanding the Role of PD-1/PD-L1 in Tumor-Associated Macrophages. *J Immunol Res.* 2019. doi: 10.1155/2019/1919082.

4. Singhal S, Stadanlick J, Annunziata M.J., Rao A.S., Bhojnagarwala P.S., O'Brien S., Moon E.K., Cantu E., Danet-Desnoyers G., Ra H.J., Litzky L., Akimova T., Beier U.H., Hancock W.W., Albelda S.M., Eruslanov E.B. Human tumor-associated monocytes/macrophages and their regulation of T cell responses in early-stage lung cancer. *Sci Transl Med.* 2019; 11(479). doi: 10.1126/scitranslmed.aat1500.

5. Zhu Z, Zhang H, Chen B, Liu X, Zhang S, Zong Z, Gao M. PD-L1-Mediated Immunosuppression in Glioblastoma Is Associated With the Infiltration and M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Front Immunol.* 2020; 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.588552.

6. Horn L, Spigel D.R., Vokes E.E., Holgado E., Ready N., Steins M., Poddubskaya E., Borghaei H., Felip E., Paz-Ares L., Pluzanski A., Reckamp K.L., Burgio M.A., Kohlhäufel M., Waterhouse D., Barlesi F., Antonia S., Arrieta O., Fayette J., Crinò L., Rizvi N., Reck M., Hellmann M.D., Geese W.J., Li A., Blackwood-Chirchir A., Healey D., Brahmer J., Eberhardt W.E.E. Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Two-Year Outcomes From Two Randomized, Open-Label, Phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). *J Clin Oncol.* 2017; 35(35): 3924–33. doi: 10.1200/JCO.2017.74.3062.

7. Schmid P, Adams S, Rugo H.S., Schneeweiss A., Barrios C.H., Iwata H., Diéras V., Hegg R., Im S.A., Shaw Wright G., Henschel V., Molinero L., Chui S.Y., Funke R., Husain A., Winer E.P., Loi S., Emens L.A.; *IMpassion130 Trial Investigators.* Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018; 379(22): 2108–21. doi: 10.1056/NEJMoa1809615.

8. Kang Y.K., Boku N., Satoh T., Ryu M.H., Chao Y., Kato K., Chung H.C., Chen J.S., Muro K., Kang W.K., Yeh K.H., Yoshikawa T., Oh S.C., Bai L.Y., Tamura T., Lee K.W., Hamamoto Y., Kim J.G., Chin K., Oh D.Y., Minashi K., Cho J.Y., Tsuda M., Chen L.T. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2017; 390(10111): 2461–71. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31827-5.

9. Keenan T.E., Tolaney S.M. Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2020; 18(4): 479–89. doi: 10.6004/jnccn.2020.7554.

10. Kamakura D., Asano R., Kawai H., Yasunaga M. Mechanism of action of a T cell-dependent bispecific antibody as a breakthrough immunotherapy against refractory colorectal cancer with an oncogenic mutation. *Cancer Immunol Immunother.* 2021; 70(1): 177–88. doi: 10.1007/s00262-020-02667-9.

11. Yamaguchi K., Tsuchihashi K., Tsuji K., Kito Y., Tanoue K., Ohmura H., Ito M., Isobe T., Ariyama H., Kusaba H., Akashi K., Baba E. Prominent PD-L1-positive M2 macrophage infiltration in gastric cancer

with hyper-progression after anti-PD-1 therapy: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2021; 100(19). doi: 10.1097/MD.00000000000025773.

12. Salgado R., Denkert C., Demaria S., Sirtaine N., Klauschen F., Pruneri G., Wienert S., Van den Eynden G., Baehner F.L., Penault-Llorca F., Perez E.A., Thompson E.A., Symmans W.F., Richardson A.L., Brock J., Criscitiello C., Bailey H., Ignatiadis M., Floris G., Sparano J., Kos Z., Nielsen T., Rimm D.L., Allison K.H., Reis-Filho J.S., Loibl S., Sotiriou C., Viale G., Badve S., Adams S., Willard-Gallo K., Loi S.; *International TILs Working Group 2014.* The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015; 26(2): 259–71. doi: 10.1093/annonc/mdl450.

13. Larjani B., Miles J., Ward S.G., Parker P.J. Quantification of biomarker functionality predicts patient outcomes. *Br J Cancer.* 2021; 124(10): 1618–20. doi: 10.1038/s41416-021-01291-3.

14. Sánchez-Magraner L., Miles J., Baker C.L., Applebee C.J., Lee D.J., Elsheikh S., Lashin S., Withers K., Wats A.G., Parry R., Edmead C., Lopez J.I., Mehta R., Italiano A., Ward S.G., Parker P.J., Larjani B. High PD-1/PD-L1 Checkpoint Interaction Infers Tumor Selection and Therapeutic Sensitivity to Anti-PD-1/PD-L1 Treatment. *Cancer Res.* 2020; 80(19): 4244–57. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-1117.

15. Cirqueira M.B., Mendonça C.R., Noll M., Soares L.R., de Paula Carneiro Cysneiros M.A., Paulinelli R.R., Moreira M.A.R., Freitas-Junior R. Prognostic Role of PD-L1 Expression in Invasive Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel).* 2021; 13(23): 6090. doi: 10.3390/cancers13236090.

16. Huang W., Ran R., Shao B., Li H. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2019; 178(1): 17–33. doi: 10.1007/s10549-019-05371-0.

17. Yunna C., Mengru H., Lei W., Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol.* 2020; 877. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173090.

18. Peranzoni E., Lemoine J., Vimeux L., Feuillet V., Barrin S., Kantari-Mimoun C., Bercovici N., Guérin M., Biton J., Ouakrim H., Régnier F., Lupo A., Alifano M., Damotte D., Donnadieu E. Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018; 115(17): 4041–50. doi: 10.1073/pnas.1720948115.

19. Hartley G.P., Chow L., Ammons D.T., Wheat W.H., Dow S.W. Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Signaling Regulates Macrophage Proliferation and Activation. *Cancer Immunol Res.* 2018; 6(10): 1260–73. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0537.

20. Sánchez-Magraner L., Gumuzio J., Miles J., Quimi N., Martínez Del Prado P., Abad-Villar M.T., Pikabea F., Ortega L., Etxezarraga C., Martín-Algarra S., Lozano M.D., Saiz-Camin M., Egurola-Izquierdo M., Barredo-Santamaría I., Saiz-López A., Gomez-Mediavilla J., Segues-Merino N., Juaristi-Abauñz M.A., Urruticoechea A., Geraedts E.J., van Elst K., Claessens N.J.M., Italiano A., Applebee C.J., Del Castillo S., Evans C., Aguirre F., Parker P.J., Calleja V. 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. *J Clin Oncol.* 2023. doi: 10.1200/JCO.22.01748.

Поступила/Received 21.04.2023

Одобрена после рецензирования/Revised 26.04.2023

Принята к публикации/Accepted 17.05.2023

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Калинчук Анна Юрьевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной терапии рака, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия). SPIN-код: 3763-0291. Researcher ID (WOS): ABF-1277-2022. Author ID (Scopus): 57797359600. ORCID: 0000-0003-2106-3513.

Перельмутер Владимир Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия). SPIN-код: 6252-5319. Researcher ID (WOS): C-8227-2012. Author ID (Scopus): 8091317300. ORCID: 0000-0002-7633-9620.

Таширева Любовь Александровна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной терапии рака, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия). SPIN-код: 4371-5340. Researcher ID (WOS): C-8222-2012. Author ID (Scopus): 55234960400. ORCID: 0000-0003-2061-8417.

ВКЛАД АВТОРОВ

Калинчук Анна Юрьевна: набор клинического материала, анализ научной работы, статистическая обработка результатов исследования, написание статьи.

Перельмутер Владимир Михайлович: критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Таширева Любовь Александровна: разработка концепции проекта и дизайна работы, анализ научной работы.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой части работы.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-10033) с использованием оборудования ЦКП «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

Конфликт интересов

Автор Перельмутер В.М. (доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ) является членом редколлегии «Сибирского онкологического журнала». Авторам неизвестно о каком-либо другом потенциальном конфликте интересов, связанном с этой статьей.

Соответствие принципам этики

Проведенное исследование соответствует стандартам Хельсинкской декларации, одобрено независимым этическим комитетом Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук (Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5), протокол № 29 от 23.12.2022.

Информированное согласие

Все пациенты подписали письменное информированное согласие на публикацию данных в медицинском журнале, включая его электронную версию.

ABOUT THE AUTHORS

Anna Yu. Kalinchuk, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): ABF-1277-2022. Author ID (Scopus): 57797359600. ORCID: 0000-0003-2106-3513.

Vladimir M. Perelmuter, MD, Professor, Chief Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8227-2012. Author ID (Scopus): 8091317300. ORCID: 0000-0002-7633-9620.

Lyubov A. Tashireva, MD, DSc, Head of the Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8222-2012. Author ID (Scopus): 55234960400. ORCID: 0000-0003-2061-8417

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Anna Yu. Kalinchuk: data collection and analysis, statistical data analysis, drafting of the manuscript.

Vladimir M. Perelmuter: critical revision with valuable intellectual content.

Lyubov A. Tashireva: study conception, design and analysis.

All authors approved the final version of the manuscript prior to publication and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were appropriately investigated and resolved.

Funding

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 20-75-10033). The study was carried out using the equipment of the Center for Collective Use “Medical Genomics” of the Tomsk National Research Medical Center.

Conflicts of interest

Prof. Perelmuter V.M. is member of the editorial board of Siberian Journal of Oncology. The authors are not aware of any other potential conflicts of interest related to the study.

Compliance with Ethical Standards

The study complies with the standards of the Declaration of Helsinki, approved by the independent Ethical Committee of Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (5, Kooperativny per., Tomsk, 634009, Russia), protocol No. 29 dated December 23, 2022.

Informed consent

All patients signed written informed consent for publication of data in a medical journal, including its electronic version.