

## ОЦЕНКА ЛИМФОИДНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ (TILs) ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

**Заботина Т.Н., Борунова А.А., Черткова А.И., Шоуа И.Б.,  
Кадагидзе З.Г.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Резюме.** Несмотря на успехи в ранней диагностике и лекарственном лечении больных раком молочной железы (РМЖ), отдаленные результаты лечения по-прежнему остаются малоудовлетворительными, в этой связи возрастает роль исследований, направленных на изучение различных механизмов развития этого заболевания. Установлено, что степень инфильтрации опухоли иммунными клетками и их состав напрямую связаны с развитием заболевания и ответом на терапию. Многопараметровая проточная цитометрия (ПЦ) позволяет проводить исследования субпопуляционного состава TILs.

Целью работы явилось изучение особенностей лимфоидного микроокружения (TILs) опухоли больных первично-операбельным и местно-распространенным РМЖ методом ПЦ.

В исследование включены больные первично-операбельным РМЖ (группа 1, n = 121) и местно-распространенным (группа 2, n = 80), получающим лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследовали TILs опухоли, полученной интраоперационно или путем корр-биопсии. Больные были разделены на 3 подгруппы: 1-я подгруппа – степень инфильтрации до 1%, 2-я подгруппа – степень инфильтрации от 1% до 10%, 3-я подгруппа – степень инфильтрации свыше 10%.

Для больных РМЖ 1-й группы оказалось характерным высокая функциональная активность и концентрация клеток эффекторного звена при низкой степени инфильтрации опухоли, а по мере нарастания количества лимфоцитов в опухоли отмечалось увеличение пула CD4<sup>+</sup> клеток и CD4 Treg одновременно со снижением количества и функциональной активности эффекторных TILs. Во 2-й группе не выявлено достоверных различий клеточного состава TILs в подгруппах со слабой и средней степенью инфильтрации, а вариант с инфильтрацией более 10% был зафиксирован только у одной пациентки. Отсутствие связи субпопуляционной структуры TILs в подгруппах с разной степенью инфильтрации опухоли свидетельствует о сходном характере локального иммунного ответа при местно-распространенном РМЖ.

Таким образом, в отличие от больных местно-распространенным раком молочной железы, у пациентов первично-операбельным РМЖ прослеживается изменение типа локального иммунного ответа

### Адрес для переписки:

Заботина Татьяна Николаевна  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр онкологии имени Н.Н. Блохина»  
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.  
Тел.: 8 (903) 015-22-11.  
E-mail: tatzabotina@yandex.ru

### Address for correspondence:

Tatiana N. Zabolina  
N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology  
24 Kashirskoe Highway  
Moscow  
115522 Russian Federation  
Phone: +7 (903) 015-22-11.  
E-mail: tatzabotina@yandex.ru

### Образец цитирования:

Т.Н. Заботина, А.А. Борунова, А.И. Черткова,  
И.Б. Шоуа, З.Г. Кадагидзе «Оценка лимфоидного  
микроокружения опухоли (TILs) при раке молочной  
железы методом проточной цитометрии»  
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4.  
С. 819-826.  
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16855

© Заботина Т.Н. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

T.N. Zabolina, A.A. Borunova, A.I. Chertkova, I.B. Shoua,  
Z.G. Kadagidze "Analysis of the lymphoid tumor  
microenvironment (TILs) in breast cancer by flow cytometry",  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,  
2024, Vol. 26, no. 4, pp. 819-826.  
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16855

© Zabolina T.N. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-AOT-16855

от эффекторного к регуляторному. Высокая степень инфильтрации опухоли характеризуется истощением функции клеток эффекторного звена.

*Ключевые слова:* цитометрия, субпопуляции лимфоцитов, микроокружение опухоли, TILs, рак молочной железы, иммунофенотип

## ANALYSIS OF THE LYMPHOID TUMOR MICROENVIRONMENT (TILs) IN BREAST CANCER BY FLOW CYTOMETRY

Zabotina T.N., Borunova A.A., Chertkova A.I., Shoua I.B., Kadagidze Z.G.

*N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Despite the success in early diagnosis and drug treatment of breast cancer patients, long-term treatment results are still unsatisfactory, and in this regard, the role of research aimed at studying various mechanisms of development of this disease is increasing. It has been established that the degree of tumor infiltration by immune cells and their composition are directly related to the development of the disease and the response to therapy. Multiparameter flow cytometry (PC) allows studies of the subpopulation composition of TILs. The aim of the work was to study the features of the lymphoid microenvironment (TILs) of tumors in patients with primary operable and locally advanced breast cancer by PC. The study included patients with primary operable breast cancer (group 1, n = 121) and locally advanced (group 2, n = 80) receiving treatment at the N. N. Blokhin NMRCO. The TILs of a tumor obtained intraoperatively or by a core-biopsy were examined. The patients were divided into 3 subgroups: 1 subgroup – the degree of infiltration up to 1%, 2 subgroup – the degree of infiltration from 1 to 10%, and 3 subgroup – the degree of infiltration over 10%. Patients of group 1 were characterized by high functional activity and concentration of effector cells with a low degree of tumor infiltration, and as the number of lymphocytes in the tumor increased, an increase in the pool of CD4<sup>+</sup> cells and CD4 Treg was noted simultaneously with a decrease in the number and functional activity of effector TILs. In group 2 were no significant differences in the cellular composition of TILs in subgroups with a weak and moderate degree of infiltration, and a variant with infiltration of more than 10% was recorded in only one patient. The lack of association of the TILs subpopulation structure in subgroups with varying degrees of tumor infiltration indicates a similar nature of the local immune response in locally advanced breast cancer.

Thus, unlike patients with locally advanced breast cancer, patients with primary operable breast cancer show a change in the type of local immune response from effector to regulatory. A high degree of tumor infiltration is characterized by depletion of effector cell function.

*Keywords:* flow cytometry, lymphocyte subpopulations, tumor microenvironment, TILs, breast cancer, immunophenotype

### Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является лидирующей нозологической формой среди онкологических заболеваний у женщин и занимает первое рейтинговое место на протяжении последних десятилетий [1]. Достигнуты значительные успехи в ранней диагностике и лекарственном лечении РМЖ. Этому способствовали, в том числе, выделение различных биологических типов опухоли на основе молекулярно-биологических маркеров и индивидуализация лечения. В то

же время, отдаленные результаты лечения РМЖ остаются малоудовлетворительными, в этой связи возрастает роль исследований, направленных на изучение различных механизмов развития этого заболевания. В настоящее время не вызывает сомнения утверждение, что иммунная система способна распознавать опухоль и генерировать как локальный, так и системный иммунный ответ, направленный на подавление опухолевого роста [2, 5]. Установлено, что степень инфильтрации опухоли иммунными клетками и их состав напрямую связаны с развитием заболевания

и ответом на терапию [6]. Однако используемый методический подход иммуногистохимического анализа не позволяет проводить многопараметровое фенотипическое исследование иммунных клеток на уровне «единственной клетки» в пределах многоклеточного организма и ограничивает клиническое применение этих данных.

**Цель работы** – изучение особенностей лимфоидного микроокружения (TILs) опухоли больных первично-операбельным и местно-распространенным раком молочной железы методом проточной цитометрии.

## Материалы и методы

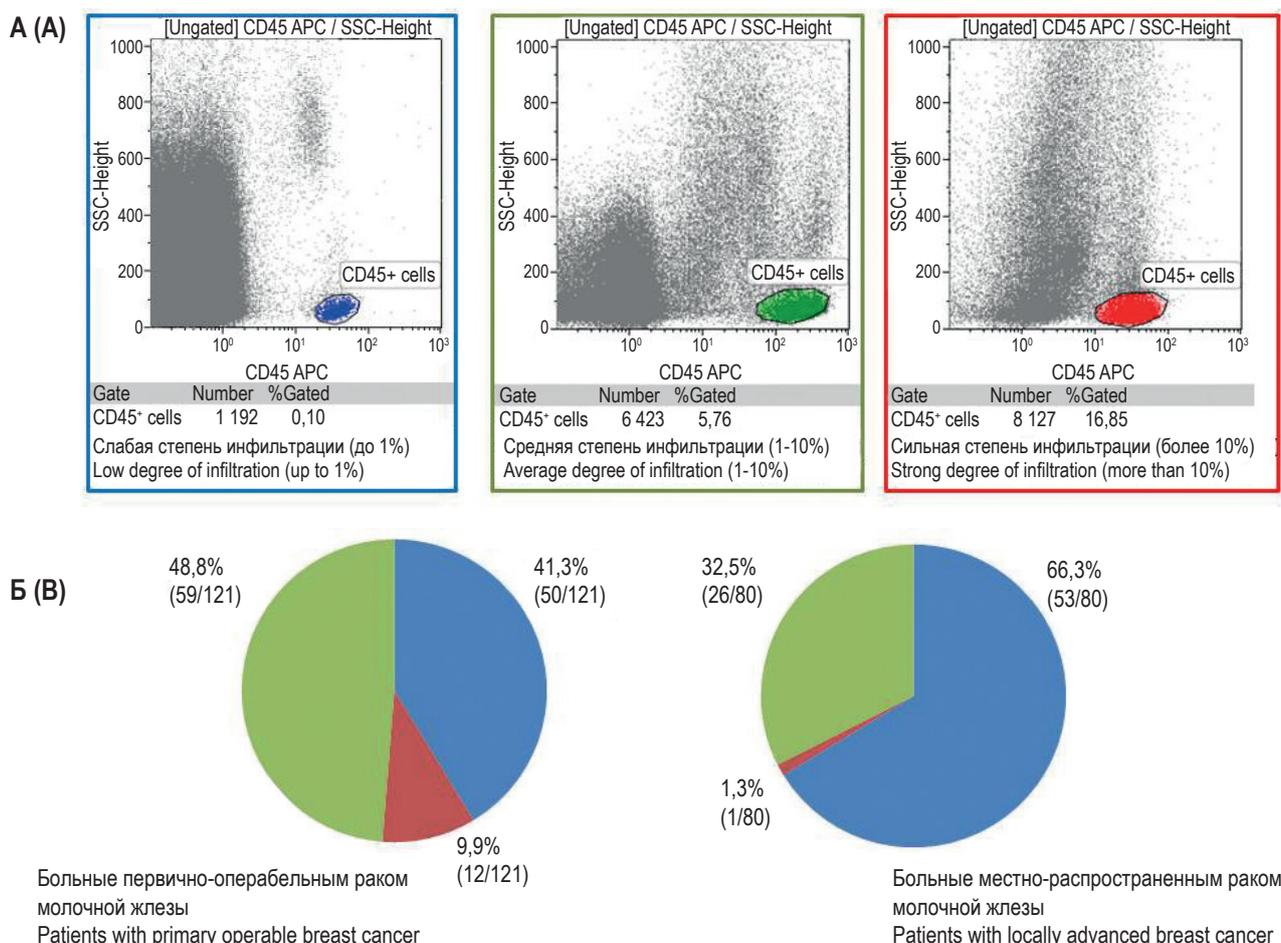
В исследование включены больные раком молочной железы, получающие хирургическое (первично-операбельный РМЖ, группа 1,  $n = 121$ ) и лекарственное неoadъювантное (местно-распространенный РМЖ, группа 2,  $n = 80$ ) лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Средний возраст больных первично-операбельным РМЖ составлял  $56,1 \pm 12,0$  (мин-макс: 24-76), больных местно-распространенным РМЖ –  $47,4 \pm 10,6$  (мин-макс: 29-66). Исследовали TILs опухолевой ткани, полученной интраоперационно или путем корр-биопсии. В зависимости от содержания TILs в опухолевой ткани, больные разделены на 3 подгруппы: 1-я подгруппа – степень инфильтрации до 1%, 2-я подгруппа – степень инфильтрации от 1% до 10%, 3-я подгруппа – степень инфильтрации свыше 10%. С целью получения клеточных суспензий фрагментацию ткани проводили с использованием системы Medimachine (BD Biosciences, США). Опухоль гомогенизировали в нестерильных одноразовых контейнерах (Medicons), пропускали через фильтры Filcons с диаметром пор не более 50 мкм. Иммунофлуоресцентное окрашивание образцов проводили по стандартной методике с использованием коммерческих моноклональных антител (МКА) к дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека, конъюгированных различными флуорохромами (BD Biosciences, Beckman Coulter, США). Количественный анализ степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами, а также анализ структуры субпопуляций лимфоидных клеток (TILs) проводили на проточном цитометре аналитического типа FACSCanto II (BD Biosciences, США) и Navios (Beckman Coulter, США). Использовали стандартные настройки и протоколы сбора и Dotplot анализа образцов, учитывали не менее 500-5000 клеток в CD45<sup>+</sup> гейте. Обработку FSC файлов цитометрических данных проводили с помощью программного пакета Kaluza (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 17 (IBM SPSS Statistics, США). Определяли медиану и 1-й и 3-й квартили – Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), оценку распределения исследуемых показателей проводили по критерию нормальности Колмогорова–Смирнова. Различия между показателями оценивали с применением непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

## Результаты и обсуждение

В исследованиях иммунного микроокружения важными факторами являются как степень инфильтрации опухоли иммунными клетками, так и непосредственно клеточный состав иммунных клеток. На первом этапе было проведено изучение степени инфильтрации опухоли лимфоцитами (TILs) пациентов с первично-операбельным и местно-распространенным РМЖ по окрашиванию образцов анти-CD45 МКА. Количество TILs значительно варьировало в обеих клинических группах от 0,1 до -30,5. По степени инфильтрации опухоли лимфоцитами больные были разделены на 3 подгруппы: с низким, средним и высоким уровнем TILs. В качестве примера приводим рисунок с данными проточной цитометрии для каждой подгруппы (рис. 1А). При анализе частоты встречаемости различных вариантов инфильтрации лимфоцитами опухолевой ткани среди пациентов двух клинических групп оказалось, что большая часть больных (48,8%, 59/121) в группе 1 представлена образцами пациентов со средней степенью TILs (1-10%), а в группе 2 (66,3%, 53/80) – с низким содержанием TILs (до 1%). Доля образцов опухолевой ткани с высокой (более 10%) степенью инфильтрации наблюдалась в группе больных первично-операбельным РМЖ (9,9%, 12/121), среди второй группы только у одной пациентки (1,3%, 1/80) выявлено высокое содержание TILs в ткани. Распределение больных по частоте встречаемости пациентов с различной степенью инфильтрации опухоли лимфоидными клетками представлено на рисунке (рис. 1Б).

Известно, что в зависимости от условий клетки иммунной системы проявляют как проопухолевые, так и противоопухолевые функции. Проточно-цитометрическое многопараметровое исследование иммунофенотипа лимфоцитов позволяет судить о функциональном проявлении TILs в микроокружении опухоли. Именно лимфоциты являются основными иммунокомпетентными клетками у человека, и обусловлено это тем, что в их составе большая часть приходится на Т-клетки, обладающие способностью к



**Рисунок 1. Исследование степени инфильтрации TILs в образцах опухолевой ткани больных РМЖ**

**Примечание.** А – проточно-цитометрический анализ образцов опухоли с различной степенью инфильтрации TILs. Б – частота встречаемости различных вариантов степени инфильтрации TILs у больных первично-операбельным РМЖ и местно-распространенным РМЖ.

Figure 1. Investigation of the degree of infiltration of TILs in tumor tissue samples of breast cancer patients

Note. A, flow cytometric analysis of tumor samples with varying degrees of TILs infiltration. B, the frequency of occurrence of various variants of the degree of infiltration of TILs in patients with primary operable breast cancer and locally advanced breast cancer.

формированию иммунологической памяти и, как следствие, осуществлению иммунного контроля. Для выполнения конкретных задач лимфоциты способны рекрутировать любые лейкоциты. Следует признать, что большинство публикаций по изучению микроокружения опухоли представляют данные, полученные путем иммуногистохимического исследования, причем чаще всего это CD8<sup>+</sup> клетки [8]. Однако с учетом высокой фенотипической гетерогенности этой субпопуляции, ее тесной взаимосвязи с NK-клетками, CD4-лимфоцитами, активированными клетками, наивными клетками, существует необходимость детализации ее структуры для понимания функционального потенциала специфического иммунного контроля опухолевого роста.

Важным является определение не только линейных популяций лимфоцитов – Т-, В-, NK-клеток, но и определение минорных субпопуляций, опосредующих эффекторные и регуляторные механизмы генерации локального иммунного ответа в ткани опухоли. Отличительной особенностью клеток регуляторного ряда является их высокая степень фенотипической гетерогенности по сравнению с клетками эффекторного звена. В то же время пул эффекторных клеток значительно преобладает над общим пулом клеток с регуляторными функциями. Здесь следует отметить, что современная иммунотерапия в онкологии как раз и развивается по пути блокады, элиминации или истощения регуляторных клеток и активации специфических клеток эффекторного ряда.

**ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНО-ОПЕРАБЕЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (N = 121) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ИНФИЛЬТРАЦИИ ОПУХОЛИ ЛИМФОЦИТАМИ**

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH PRIMARY OPERABLE BREAST CANCER (N = 121) DEPENDING ON THE DEGREE OF TUMOR INFILTRATION BY LYMPHOCYTES

Показатель Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> ) % Indicator Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> ) %	Слабая степень инфильтрации (до 1%) Low degree of infiltration (up to 1%) (n = 50)	Средняя степень инфильтрации Average degree of infiltration (1-10%) (n = 59)	Сильная степень инфильтрации (более 10%) Strong degree of infiltration (more than 10%) (n = 12)	Слабая-средняя степень ин- фильтрации опухоли Weak-medium degree of tumor infiltration p*	Слабая-сильная степень ин- фильтрации опухоли Weak-strong degree of tumor infiltration p*	Сильная-средняя степень ин- фильтрации опухоли Strong-medium degree of tumor infiltration p*
CD45 <sup>+</sup> TILs	0,4 (0,3-0,7)	2,7 (1,6-4,6)	15,6 (11,7-20,1)	0,000	0,000	0,000
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	89,6 (84,3-95,4)	89,4 (86,1-93,5)	87,5 (81,4-91,7)	0,883	0,317	0,212
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	36,5 (26,1-47,4)	46,3 (39,0-55,7)	51,7 (44,0-58,1)	0,005	0,005	0,245
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	49,4 (36,4-62,3)	42,9 (33,8-52,4)	33,9 (30,6-42,8)	0,051	0,003	0,039
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	7,0 (3,1-12,5)	4,9 (1,6-11,8)	0,9 (0,4-6,0)	0,287	0,014	0,051
CD45 <sup>+</sup> HLA-DR	10,8 (3,4-13,8)	8,6 (2,1-16,3)	1,3 (0,8-11,2)	0,709	0,051	0,080
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	5,3 (2,4-9,4)	2,0 (0,9-3,9)	1,1 (0,4-1,7)	0,000	0,000	0,019
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	8,1 (3,8-13,9)	5,2 (2,9-8,9)	4,1 (1,8-6,8)	0,069	0,012	0,273
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	2,1 (1,1-6,4)	3,1 (0,8-6,6)	4,8 (3,3-8,1)	0,961	0,283	0,270
CD45 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	8 (3,5-14,5)	3,7 (2,1-8,5)	2,4 (1,5-5,2)	0,012	0,004	0,173
Цитотоксический потенциал CD16 <sup>+</sup> клеток Cytotoxic potential of CD16 <sup>+</sup> cells	74,8 (50,8-94,1)	63,3 (39,7-80,9)	39,2 (28,7-53,1)	0,164	0,008	0,016
CD45 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	6,6 (3,1-9,6)	4,1 (1,8-8,7)	3,2 (1,5-7,0)	0,139	0,092	0,387
Цитотоксический потенциал CD8 <sup>+</sup> клеток Cytotoxic potential of CD8 <sup>+</sup> cells	16,7 (10,2-50,8)	12,6 (4,6-19,0)	8,6 (3,4-26,6)	0,132	0,096	0,537
CD45 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,7 (0,4-1,1)	1,0 (0,7-1,6)	1,4 (1,0-1,7)	0,004	0,002	0,096
CD45 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup>	3,4 (1,6-5,8)	4,0 (2,3-6,8)	6,4 (3,5-11,2)	0,296	0,021	0,058

Примечание. p\* – значение достоверности различий непараметрических критериев по Манну–Уитни.

Note. p\*, is the significance of the reliability of differences in nonparametric criteria according to Mann–Whitney.

**ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (N = 80) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ИНФИЛЬТРАЦИИ ОПУХОЛИ ЛИМФОЦИТАМИ**

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER (N = 80) DEPENDING ON THE DEGREE OF TUMOR INFILTRATION BY LYMPHOCYTES

Показатель Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> ) % Indicator Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> ) %	Слабая степень инфильтрации (до 1%) Low degree of infiltration (up to 1%) (n = 53)	Средняя степень инфильтрации (1-10%) Average degree of infiltration (n = 26)	Сильная степень инфильтрации (более 10%) Strong degree of infiltration (more than 10%) (n = 1)	Слабая-сильная степень инфильтрации опухоли Weak-strong degree of tumor infiltration p*
CD45 <sup>+</sup> TILs	0,3 (0,1-0,8)	2,7 (1,5-4,8)	20,5	0,000
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	87,0 (83,0-90,8)	90,6 (82,5-93,8)	89,9	0,238
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	45,9 (39,0-52,3)	43,2 (36,4-52,9)	33,7	0,441
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	40,5 (32,1-46,6)	43,1 (35,5-53,0)	62,2	0,104
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	11,4 (6,1-21,9)	17,7 (5,6-38,4)	21,6	0,266
CD45 <sup>+</sup> HLA-DR	15,7 (9,3-27,5)	21,2 (5,9-42,1)	24,5	0,372
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	6,0 (2,7-11,4)	3,2 (2,2-8,5)	4,8	0,052
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	8,1 (6,0-11,5)	9,4 (6,3-12,8)	12,1	0,507
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	3,1 (1,7-4,9)	2,5 (1,3-6,1)	3,3	0,694
CD45 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	1,9 (1,3-4,2)	3,2 (1,2-4,3)	16,2	0,599
Цитотоксический потенциал CD16 <sup>+</sup> клеток Cytotoxic potential of CD16 <sup>+</sup> cells	25,0 (12,8-39,6)	30,0 (21,9-60,9)	29,4	0,363
CD45 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	3,4 (1,6-11,2)	6,8 (1,3-11,9)	1,9	0,808
Цитотоксический потенциал CD8 <sup>+</sup> клеток Cytotoxic potential of CD8 <sup>+</sup> cells	10,4 (4,0-32,8)	14,3 (3,9-19,0)	55,9	0,746
CD45 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-low+</sup>	4,1 (2,6-7,1)	5,8 (2,7-7,8)	10,38	0,434

Примечание. p\* – значение достоверности различий непараметрических критериев по Манну–Уитни.

Note. p\* is the significance of the reliability of differences in nonparametric criteria according to Mann–Whitney

Критическими характеристиками микро-окружения опухоли являются соотношение пула эффекторных и регуляторных клеток, субпопуляций Т-клеток, активированные и депо-наивных клеток, функциональная активность

эффекторных клеток [3]. Точное определение клеточного состава позволяет проводить много-параметровая проточная цитометрия. Интерес-ным оказалось сравнение иммунофенотипа TILs пациентов РМЖ в двух клинических группах с

учетом степени инфильтрации CD45<sup>+</sup> клетками. Так, у первично-операбельных пациентов РМЖ (1-я группа) отмечалось достоверное увеличение пула CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток по мере нарастания степени инфильтрации лимфоцитов, а CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TILs, напротив, достоверно снижались, что сопровождалось достоверным увеличением иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8). Аналогично эффекторным CD8<sup>+</sup> TILs, с увеличением степени инфильтрации опухоли лимфоцитами достоверно снижалось как количество НК-клеток, так и их функциональная активность. Следует отметить, что с увеличением степени инфильтрации лимфоцитами опухолевой ткани наблюдалось уменьшение функциональной активности пула CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TILs. Вместе с тем, выявлено нарастание регуляторных/супрессорных лимфоцитов с фенотипом CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-/low</sup> параллельно с увеличением плотности лимфоцитов в микроокружении опухоли. На негативную роль регуляторных клеток для прогнозирования рака молочной железы также указывают многие исследователи [4, 7].

Таким образом, для больных первично-операбельным раком молочной железы оказалось характерным высокая функциональная активность и концентрация клеток эффекторного звена при низкой степени инфильтрации опухоли, а по мере

нарастания количества лимфоцитов в опухоли отмечалось увеличение пула CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток и CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-/low</sup> одновременно со снижением количества и функциональной активности эффекторных TILs (табл. 1).

В группе больных местно-распространенным РМЖ не выявлено достоверных различий клеточного состава TILs в подгруппах со слабой и средней степенью инфильтрации, а вариант с инфильтрацией более 10% был зафиксирован только у одной пациентки (табл. 2). Отсутствие связи субпопуляционной структуры TILs в подгруппах с разной степенью инфильтрации опухоли свидетельствует о сходном характере локального иммунного ответа при местно-распространенном РМЖ.

## Выводы

В отличие от больных местно-распространенным раком молочной железы, у пациенток первично-операбельным РМЖ прослеживается изменение типа локального иммунного ответа от эффекторного к регуляторному. Высокая степень инфильтрации опухоли характеризуется истощением функции клеток эффекторного звена. Многопараметровая характеристика субпопуляционной структуры TILs возможна только с применением многоцветной проточной цитометрии.

## Список литературы / References

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 239 с. [The state of oncological care for the population of Russia in 2022. Edited by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova]. Moscow: P. Herzen Moscow State Medical Research Institute – branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” Ministry of Health of Russia, 2022. 239 p.
2. Blok E.J., Engels C.C., Dekker-Ensink G. Exploration of tumour-infiltrating lymphocytes as a predictive biomarker for adjuvant endocrine therapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2018, Vol. 171, pp. 65-74.
3. Goff S.L., Danforth D.N. The role of immune cells in breast tissue and immunotherapy for the treatment of breast cancer. *Clin. Breast Cancer*, 2021, Vol. 21, no. 1, pp. e63-e73.
4. Lan H.R., Du W.L., Liu Y., Mao C.S., Jin K.T., Yang X. Role of immune regulatory cells in breast cancer: Foe or friend? *Int. Immunopharmacol.*, 2021, Vol. 96, 107627. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107627.
5. Levy E.M., Roberti M.P., Mordoh J. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, Vol. 2011, 676198. doi: 10.1155/2011/676198.
6. Lundgren C., Bendahl P.O., Ekholm M. Tumour-infiltrating lymphocytes as a prognostic and tamoxifen predictive marker in premenopausal breast cancer: data from a randomised trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res.*, 2020, Vol. 22, 140. doi: 10.1186/s13058-020-01364-w.
7. Usman A.N., Ahmad M., Sinrang A.W., Natsir S., Takko A.B., Ariyandy A., Ilhamuddin I., Eragradini A.R., Hasan I.I., Hasyim S. Regulatory T cells on prognosis of breast cancer. *Breast Dis.*, 2023, Vol. 42, no. 1, pp. 213-218. doi: 10.3233/BD-239002.
8. Virassamy B., Caramia F., Savas P., Sant S., Wang J., Christo S.N., Byrne A., Clarke K., Brown E., Teo Z.L., von Scheidt B., Freestone D., Gandolfo L.C., Weber K., Teply-Szymanski J., Li R., Luen S.J., Denkert C., Loibl S.,

Lucas O., Swanton C., Speed T.P., Darcy P.K., Neeson P.J., Mackay L.K., Loi S. Intratumoral CD8(+) T cells with a tissue-resident memory phenotype mediate local immunity and immune checkpoint responses in breast cancer. *Cancer Cell*, 2023, Vol. 41, no. 3, pp. 585-601.

---

**Авторы:**

**Заботина Т.Н.** — д.б.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии и инновационных технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Борунова А.А.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Черткова А.И.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Шоуа И.Б.** — к.б.н., врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Кадагидзе З.Г.** — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Zabotina T.N.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Borunova A.A.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Chertkova A.I.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Shoua I.B.**, PhD (Biology), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Kadagidze Z.G.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 01.04.2023  
Отправлена на доработку 03.04.2023  
Принята к печати 16.04.2024

Received 01.04.2023  
Revision received 03.04.2023  
Accepted 16.04.2024