

# БАЛАНС И ВЗАИМОСВЯЗЬ LAG-3, GITR, PD-1, T-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК С КЛИНИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Т.Н. Заботина<sup>1</sup>, Д.В. Табаков<sup>1</sup>, Е.Н. Захарова<sup>1</sup>, Н.В. Чантурия<sup>1</sup>, В.Ю. Сельчук<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> ГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва

**Цель исследования.** Установить взаимосвязь показателей системного и локального иммунитета больных первично операбельным раком молочной железы с клинико-патологическими параметрами.

**Материал и методы.** В исследование включены образцы периферической крови и операционный материал 68 больных первично операбельным раком молочной железы. Оценку экспрессии контрольных точек иммунитета и субпопуляционного состава лимфоцитов проводили с помощью проточной цитометрии.

**Результаты.** Для маркера пролиферации Ki-67 показана взаимосвязь с содержанием ЦТЛ и T-лимфоцитов в ПК и В-клеток в ЛИО. Для эстрогеновых и прогестероновых рецепторов установлена обратная зависимость от содержания супрессорных популяций лимфоцитов, включая CD4+CD25+ICOS+, CD4+CD25+CTLA-4+ и Lag-3 клетки. Взаимосвязи экспрессии ингибиторных молекул более выражены в ЛИО, чем в ПК, что свидетельствует о супрессорном фенотипе опухолевого микроокружения. Повышение содержания CD8 клеток в ПК и ЛИО сопровождается повышением коэкспрессии супрессорных молекул, что указывает на неблагоприятную прогностическую значимость этой популяции, однако открывает возможности для применения иммунотерапии данной категории больных.

**Заключение.** Анализ субпопуляционной структуры иммунных клеток периферической крови и микроокружения опухоли показал на взаимосвязь эффекторных и регуляторных механизмов иммунного ответа с основными клинико-патологическими параметрами у больных первично операбельным раком молочной железы.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, контрольные точки иммунитета, иммунные чек-пойнты, периферическая кровь, лимфоциты, инфильтрирующая опухоль, рак молочной железы.

## THE BALANCE AND RELATIONSHIP BETWEEN LAG-3, GITR, PD-1, T-REGULATORY CELLS AND CLINICAL PARAMETERS OF PATIENTS WITH BREAST CANCER

**T.N. Zabotina<sup>1</sup>, D.V. Tabakov<sup>1</sup>, E.N. Zakharova<sup>1</sup>, N.V. Chanturia<sup>1</sup>, V.Yu.Selchuk<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

**Objective of the study** is to establish the relationship between the indicators of systemic and local immunity of patients with primary operable breast cancer and clinical pathology parameters.

**Materials and Methods.** The samples of peripheral blood and surgical resection specimens of 68 patients with primary operable breast cancer were examined under the study. The evaluation of the expression of immune checkpoints and lymphocyte subpopulation composition was carried out using flow cytometry.

**Results.** The relationship between Ki-67 proliferation marker and the content of cytotoxic T cells and T-lymphocytes in peripheral blood and B-cells in tumor infiltrating lymphocytes (TILs) is shown. The inverse correlation of estrogen and progesterone receptors with the content of lymphocytes suppressor populations including CD4+CD25+ICOS+, CD4+CD25+CTLA-4+ and Lag-3 cells is established. The interrelationships of inhibitory molecule expression were more pronounced in tumor infiltrating lymphocytes (TILs) than in peripheral blood that indicates the suppressor phenotype of tumor microenvironment. The increase in the content of CD8 cells in peripheral blood and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) is associated with an increase in suppressor molecule coexpression, that signifies an unfavourable prognostic relevance of this population, however, it provides advances in the use of immunotherapy for this category of patients.

**Conclusion.** *An analysis of subpopulation structure of peripheral blood immune cells and tumor microenvironment demonstrated the relationship between effector and regulatory mechanisms of the immune response and the major clinical pathology parameters in patients with primary operable breast cancer.*

**Keywords:** *flow cytometry, immunity checkpoints, peripheral blood, tumor infiltrating lymphocytes (TILs), breast cancer.*

## Введение

Иммуноонкология и иммунотерапия — самые быстроразвивающиеся области исследований в онкологии. Усиливая активность собственной иммунной системы пациента для обнаружения и уничтожения опухолевых клеток, иммунотерапия направлена на лечение рака без токсических системных эффектов химиотерапии. Лимфоциты считаются основными эффекторными клетками в формировании эффективного иммунного ответа. Адаптивный иммунный ответ на опухолевый антиген требует как CD8<sup>+</sup> Т-клеточной цитотоксичности, так и функциональной активности CD4<sup>+</sup> Т-хелперов [1]. Для наиболее полной активации Т-клеткам необходимо вовлечение в передачу активационного сигнала Т-клеточного рецептора и костимулирующих/коингибирующих молекул, которые названы контрольными точками иммунитета [2]. Эти рецепторы играют важную роль в поддержании баланса между контролем аутоиммунных реакций и специфическим иммунным ответом. При развитии онкологического заболевания иммунный ответ переключается на противовоспалительные реакции, которые не приспособлены к подавлению роста опухоли. Хотя в ускользании опухоли из-под иммунного надзора участвуют несколько механизмов, иммуносупрессивное действие коингибиторных молекул представляет собой краеугольный камень в этом процессе [3; 4].

Поиск надежных мишеней для модуляции иммунных реакций привел к открытию множества различных контрольных точек активации Т-клеток и разработке моноклональных антител, нацеленных на эти контрольные точки [5; 6; 7]. Цитотоксический Т-лимфоцитарно-ассоциированный белок 4 (CTLA-4/CD152) и белок запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1/CD279) были признаны наиболее надежными мишенями, а препараты, нацеленные на CTLA-4 и PD-1, радикально изменили результаты лечения прогрессирующих раковых заболеваний. На сегодняшний день семь препа-

ратов, нацеленных на CTLA-4/PD-1, одобрены для лечения различных нозологических форм, включая меланому, рак легких, рак молочной железы (РМЖ), рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, карциному Меркеля, рак шейки матки, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, плоскоклеточный рак кожи, классическую лимфому Ходжкина и В-клеточную лимфому [8]. Значение блокаторов CTLA-4 и PD-1 для онкологии и успехи в лечении злокачественных новообразований признается исследователями, а также клиницистами во всем мире, и по праву Нобелевская премия по физиологии и медицине за 2018 год была присуждена профессору Джеймсу Эллисону (MD Anderson Cancer Center, США) и профессору Тасуку Хондзе (Киотский университет, Япония) за их исследования CTLA-4 и PD-1 соответственно [9].

Существуют и другие перспективные мишени, к которым разрабатываются препараты на основе моноклональных антител. Среди членов семейства CD28 вызывает интерес индуцибельный ко-стимулятор (ICOS/CD278), костимулирующий рецептор для усиления Т-клеток. Redoglia *et al* и Hutloff *et al* впервые описали ICOS как специфическую для Т-клеток костимулирующую молекулу, которая усиливает Т-клеточные реакции на чужеродный антиген [10, 11]. Имеются доказательства того, что его экспрессия может быть полезным прогностическим биомаркером ответа на лечение ингибиторами контрольных точек, так как ICOS является сложным центральным узлом как для иммунного ответа, так и для гомеостаза. В ходе исследования иммунных чек-пойнтов было показано, что Lag-3<sup>+</sup> клетки формируют дисфункцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток через Lag-3-опосредованные ингибирующие сигналы [12]. Многие доклинические исследования подтвердили, что молекула Lag-3 приводит к истощению цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а блокада Lag-3 может синергировать с терапией PD-1/PD-L1 для активизации противоопухолевого иммунитета [13]. Одним из новых иммунотерапевтических моноклональных

антител, исследуемых в настоящее время, является глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (GITR) с потенциалом использования в комбинированной терапии с ингибиторами PD-1/PD-L1 [14].

В то время как рак молочной железы ранее считался менее иммуногенным по сравнению, например, с меланомой и немелкоклеточным раком легких, исследования показывают, что HER2-положительный и трижды негативный биологические подтипы рака молочной железы имеют повышенное количество инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ЛИО) [15]. Блокада иммунных контрольных точек в настоящее время является наиболее изученным подходом иммунотерапии при раке молочной железы, а недавние клинические испытания показывают многообещающие результаты [16].

Однако, несмотря на терапевтический прогресс, который демонстрируют эти препараты, этот успех все еще ограничен определенной когортой пациентов, что обусловлено рядом причин. Во-первых, не хватает биомаркеров иммунных реакций на ингибиторы иммунных контрольных точек. Во-вторых, доклинические и клинические исследования показывают, что комбинаторные терапевтические подходы с иммуностимулирующими антителами могут улучшить показатели ответа [17]. Это может быть особенно интересной стратегией для опухолей с низкой инфильтрацией лимфоцитами, которые потребуют существенного изменения иммунного ландшафта на локальном уровне. В-третьих, существует необходимость установить взаимосвязь показателей системного и локального иммунитета с клиническими параметрами, оцениваемыми в ходе диагностики и терапии онкологического больного, что позволит персонализировать и корректировать применяемую схему лечения.

### Материалы и методы

**Пациенты.** В исследование включены образцы периферической крови и операционный материал 68 больных первично операбельным раком молочной железы, находящихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, из них: ста-

дия T1N0M0 — 23 человек, T1N1M0 — 3, T1N2M0 — 1, T2N0M0 — 26, T2N1M0 — 11, T2N3M0 — 1, T3N0M0 — 2, T3N1M0 — 1. У 57 больных (83,8%) установлен гистологический диагноз — инфильтративный протоковый рак, у семи (10,3%) — инфильтративный дольковый, у двух — слизистый (2,9%) и по одному пациенту (1,5%) — инфильтративный протоковый и дольковый и инфильтративный тубулярный. У 44 пациентов (64,7%) обнаружен люминальный В (Her2/neu отрицательный) подтип РМЖ, у 11 пациентов (16,2%) — люминальный А, у шести (8,8%) — трижды негативный подтип, у пяти (7,3%) — люминальный В (Her2/neu положительный) и у двух пациентов (2,9%) — Her2/neu положительный.

Медиана возраста составила 51,5 года (от 29 до 86 лет). Все пациенты получали хирургическое лечение.

**Иммунологические исследования.** Для выделения внутриопухолевых лимфоцитов материал, полученный путем кор-биопсии, или операционный материал, подвергали умеренной гомогенизации с помощью модуля BD Medimachine Module (BD Bioscience, США) при комнатной температуре с последующей фильтрацией через фильтр Filcon 50 мкм (BD Bioscience, США).

Для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (ПК) и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (ЛИО), применяли 6-цветное окрашивание клеток с использованием панели моноклональных антител к поверхностным маркерам Т- и В-лимфоцитов, NK- и NKT-клеток, активированных лимфоцитов, регуляторных Т-клеток (CD3, CD4, CD8, CD28, CD11b, CD25, CD16, CD56, CD95, CD19, CD127, CD278(ICOS), CD279(PD-1), Lag-3, GITR) и к внутриклеточному перфориру (Perforin) (BD Bioscience, Beckman Coulter и e-Bioscience (США)). Для изучения внутриклеточных белков (перфорин, CD152 (CTLA-4)) проводили реакцию пермеабиллизации с помощью коммерческого набора Intra-prep (Beckman Coulter, США), который позволяет изменять проницаемость мембраны клеток.

Выделение гейта лимфоцитов проводили по экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 в координатах SSC vs CD45.

Исследование регуляторных ( $CD4^+CD25^+CD127^{-low}$  /  $CD4^+CD25^+CD278^+$  /  $CD8^+CD11b^-CD28^-$ ), наивных ( $CD8^+CD11b^-CD28^+$ ), эффекторных ( $CD8^+CD11b^+CD28^-$ ) Т-клеток, популяции GITR- ( $CD4^+GITR^+CD25^+/CD4^+GITR^+CD25^-/CD8^+GITR^+CD25^+/CD8^+GITR^+CD25^-$ ) и Lag-3-положительных ( $CD4^+Lag-3^+CD25^+/CD4^+Lag-3^+CD25^-/CD8^+Lag-3^+CD25^+/CD8^+Lag-3^+CD25^-$ ) клеток осуществляли с использованием стратегии последовательного гейтирования. На первом этапе выделяли гейт лимфоцитов (R1) в координатах SSC vs CD45, затем из гейта лимфоцитов (R1) выделяли гейты CD8 и/или CD4 лимфоцитов (R2/R3 соответственно).

Цитотоксический потенциал (ЦТП) CD16- и CD8-лимфоцитов оценивали как процент перфорин-позитивных клеток в составе соответствующей популяции.

Для оценки экспрессии поверхностных и внутриклеточных маркеров использовали проточный цитометр FACSCanto II (BD Bioscience, США) с программным пакетом FACSDiva 7.0. В каждом образце анализировали 5000 событий в гейте  $CD45^+$  лимфоцитов. Все пациенты дали информированное согласие на проведение иммунологического обследования.

**Статистический анализ.** Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводился с использованием программы STATISTICA 13.3 (разработчик — StatSoft.Inc, США). Характер распределения показателей определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка (при  $n < 50$ ). Статистическую значимость различий между сравниваемыми группами оценивали по непараметрическому двустороннему U-критерию Манна-Уитни (U). Уровень статистической значимости был принят равным 0,05. Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей (25 и 75% процентиля). Определение взаимосвязи между показателями проводили с помощью корреляционного анализа Спирмена (коэффициент корреляции  $\rho$ ).

## Результаты

Для того чтобы установить значимые взаимосвязи между показателями системного и локального иммунитета с клиническими параметрами, мы разделили всех больных по экспрессии маркера пролиферации Ki-67, приняв за пороговое значение 20%. 22 больных (32,4%) имели значения Ki-67  $< 20\%$ , 46 (67,6%) — больше. Для показателей системного иммунитета разница в двух группах оказалась значимой у популяций  $CD3^+CD8^+$  и  $CD8^+CD11b^+$  цитотоксических лимфоцитов,  $CD4^+CD25^+CD127^{-low}$  Т-регуляторных клеток. В группе со значением Ki-67 больше 20% содержание потенциально цитотоксических популяций  $CD8^+CD11b^+$  и  $CD3^+CD8^+$  выше, а количество Т-регуляторных клеток ниже, чем в первой группе. При этом содержание перфоринсодержащих CD8 лимфоцитов также выше при более высоких значениях Ki-67, однако различие не подтверждалось статистически ( $p = 0,0796$ ). Отмечена тенденция к уменьшению содержания НК-лимфоцитов при более высоких значениях Ki-67 (табл. 1).

При анализе взаимосвязи показателей локального иммунитета и экспрессии Ki-67 было обнаружено, что в группе с более высокой экспрессией маркера ядерной пролиферации содержание В-лимфоцитов снижено по сравнению с группой 1 (табл. 2). Также установлено, что количество GITR-положительных лимфоцитов выше в группе 2 ( $p = 0,0087$ ) за счет увеличения популяции  $CD4^+GITR^+$  лимфоцитов по сравнению с группой 1 ( $p = 0,0383$ ).

Анализ взаимосвязи степени злокачественности опухоли и показателей системного иммунитета показал, что у больных со степенью G3 (11 человек) выше содержание наивных  $CD8^+CD11b^-CD28^+$  лимфоцитов (36,7 (23,3; 44)%) и супрессорных  $CD4^+CD25^-Lag-3^+$  клеток (0,5 (0,2; 0,7)%), чем у пациенток с G2 степенью (52 человека) (25,4 (17; 32,8)% и 0,3 (0,15; 0,45)% соответственно). Среди показателей локального иммунитета лишь наивные  $CD8^+CD28^-$  лимфоциты показали статистически значимые различия — в группе с более низкой злокачественностью их количество было выше (18,2 (17,2; 21,4)%), чем в группе G3 (14,7 (12,8; 16,9)%).

**Различия субпопуляционного баланса лимфоцитов ПК с низкой (группа 1) и высокой (группа 2) экспрессией Ki-67**

Фенотип популяций лимфоцитов	Группа 1 (Ki-67 < 20%)			Группа 2 (Ki-67 > 20%)			P
	Медиана	Q1	Q2	Медиана	Q1	Q2	
CD3+	65,5	58,3	71,5	71,25	65,25	78,25	0,063844
CD3+CD4+	41,9	36,7	43	40,95	34,1	45,7	0,900348
CD8+	35,1	31,1	37,4	38,8	32,4	45,5	0,098348
CD3+CD8+	26,5	15,9	28,8	28,75	21,85	36,65	0,020514
CD3-CD8+	9	6,3	15,2	8,9	6,2	13,25	0,643114
CD3-CD16CD56+	22	13,4	28,7	13,35	10,05	19,4	0,07747
CD3+CD16CD56+	11,4	6,2	16,7	15,5	8	22,2	0,114639
NKT CD4+	20,7	15,2	34,7	22,8	19,5	30,5	0,66055
NKT CD8+	68,15	48,5	71,75	57,3	47,9	64,9	0,317048
NKT CD4-CD8-	8,15	4,7	11,9	9,7	6,4	21,8	0,328936
NKT CD4+CD8+	2,15	0,6	3,7	2,1	0,7	3,4	0,941617
CD3-CD19+ В-лимф	10,5	6,6	12,3	8,7	6,7	9,85	0,164404
CD3-HLADR+	11,7	9,9	12,8	9,3	7,45	11,3	0,095738
CD3+HLADR+	4,5	3,6	5,3	5,8	3,35	10,05	0,498748
CD25+	27,8	23,4	39,1	30,55	25,85	40,9	0,652147
CD4+CD25+	17	15,2	26,2	20,45	16,9	25,3	0,46768
CD4+CD127-/lowCD25+ Treg	10,1	9,6	13,4	8,65	6,9	10,75	0,047742
CD278+ (ICOS)	3,3	2,3	4,7	2,8	2	3,95	0,508541
CD4+CD278+	2,6	2,2	4,1	2,65	1,7	3,45	0,535395
CD4+CD278+CD25+	3,15	2,2	4,9	2	0,8	3,05	0,125887
CD152+ (CTLA-4)	5	2,9	6	4,5	1,25	7,1	0,990004
CD4+CD152+	2,3	1,5	3,6	3,6	0,8	6,05	0,660758
CD4+CD25+CD152+	3,95	1,9	8,15	4,2	1,95	8,8	0,847817
CD28+	51,8	43,3	60,6	50,1	41,8	56,5	0,777185
CD8+CD28+	13,5	7,4	16,8	10,95	9,4	15,95	0,792551
CD11b+	50,7	40,7	58,6	46,3	40,8	55,25	0,547826
CD8+CD11b+	22,8	16,6	24,8	26,85	20,4	33,45	0,020527
CD8+CD11b+CD28-	49,4	45,7	60	60,2	51,6	68,5	0,168407
CD8+CD11b+CD28+	9,1	4,9	12,1	8,85	6,8	10,65	0,821606
CD8+CD11b-CD28-	4,6	2,8	7,3	5,8	3,15	8,4	0,598866
CD8+CD11b-CD28+	31,5	22,8	38,5	24,15	16,75	30,5	0,05079
CD279+ (PD-1)	17,1	13,3	18,5	17,2	12,8	21,8	0,60528
CD4+CD279+	8,9	7,4	10,6	8,8	7,7	12,1	0,536265
CD8+CD279+	6,2	4,2	7	6,5	5,35	8,65	0,385586
CD95+	65,3	57,7	70,8	59,8	42,15	66,9	0,149842
CD8+CD95+	15,4	13,5	19,2	17,3	12,6	21,6	0,395883
Perforin+	26,2	22,6	29,8	29,25	22,15	39,95	0,679448
CD8+Perf+	14,3	8,7	19,5	20,55	14	26,7	0,079596
ЦТП CD8	0,44838	0,37464	0,55085	0,50865	0,35647	0,63235	0,249354

Фенотип популяций лимфоцитов	Группа 1 (Ki-67 < 20%)			Группа 2 (Ki-67 > 20%)			p
	Медиана	Q1	Q2	Медиана	Q1	Q2	
CD16+Perf+	14,6	11,3	24,35	13,8	7,95	18,3	0,262659
ЦТП CD16	0,81266	0,71203	0,91922	0,8262	0,66789	0,88594	0,67329
Lag3+	0,3	0,2	1,1	0,3	0,1	0,7	0,477199
CD4+Lag3+	0,2	0,1	0,8	0,1	0	0,2	0,285472
CD8+Lag3+	0,1	0	0,3	0,1	0	0,4	0,863148
CD16+Lag3+	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0,01631
CD4+CD25+Lag3+	0,2	0,1	0,9	0,3	0,1	0,5	0,862206
CD4+CD25-Lag3+	0,35	0,2	0,5	0,3	0,2	0,5	0,768876
CD8+CD25+Lag3+	0,25	0,1	0,6	0,15	0,1	0,3	0,503792
CD8+CD25-Lag3+	0,7	0,1	0,9	0,5	0,3	1,1	0,60727
GITR+	9,6	4,5	14,5	8,4	5,9	11,1	0,929641
CD4+GITR+	5,7	2,7	7,2	4,3	3,8	6	0,855712
CD8+GITR+	1,9	0,7	7,5	2,5	1,8	3,3	0,682303
CD16+GITR+	3,05	0,95	7,15	2,1	0,75	2,5	0,394907
CD4+CD25+GITR+	2,8	1,7	4,2	2	0,8	3	0,181103
CD4+CD25-GITR+	0,6	0,2	1,1	0,5	0,2	1,1	0,722509
CD8+CD25+GITR+	1,6	0,6	3,2	0,8	0,5	1,4	0,086053
CD8+CD25-GITR+	5,2	2,6	8	2,95	2	5,4	0,265293
возраст	51,5	45	59,5	53,5	45,5	62	0,843232
Ki 67% (п/о)	0,08	0,05	0,15	0,32	0,275	0,365	0

Таблица 2

**Различия субпопуляционного баланса ЛИО с низкой (группа 1) и высокой (группа 2) экспрессией Ki-67**

Фенотип популяций лимфоцитов	Группа 1 (Ki-67 < 20%)			Группа 2 (Ki-67 > 20%)			p
	Медиана	Q1	Q2	Медиана	Q1	Q2	
CD3+	86,6	84,3	94,5	92,9	87,4	95,3	0,229368
CD3+CD4+	44,5	33,5	51,8	42,8	37,7	50	0,71846
CD8+	42,4	37,5	55,9	49,3	43	55,2	0,667786
CD3+CD8+	42,1	32,3	54,3	48,6	41,5	54,7	0,53651
CD3-CD8+	1,7	0,7	2,4	1	0,5	1,6	0,184923
CD3-CD16CD56+	3,2	2,6	10,1	3,4	2,2	8	0,570824
CD3+CD16CD56+ NKT	5,8	5,4	10,7	7,2	4,9	13	0,570993
NKT CD4+	33,3	32	42,6	40	26,8	43,6	1
NKT CD8+	55,8	51,3	60,4	43,85	37,55	59,15	0,52709
NKT CD4-CD8-	4,1	2,6	8,2	8	6,2	10,9	0,170588
NKT CD4+CD8+	3,6	3,6	11,3	5,9	4,1	9,85	0,597937
CD3-CD19+ В-лимф	3,2	2,35	8	1,5	1,05	3	0,006932
CD25+	13,2	8,6	17,1	14,2	11,5	20,3	0,202837
CD4+CD25+	9,9	4,6	13,2	11,8	8,3	15,4	0,242732
CD4+CD127-/lowCD25+ Treg	12,8	3,5	14,1	8,4	4,25	15,2	1
CD278+ (ICOS)	10,7	2,2	19,2	5,8	1,6	10,2	0,601509
CD4+CD278+	9,95	1,4	18,5	4,85	1,1	8,3	0,512611

Фенотип популяций лимфоцитов	Группа 1 (Ki-67 < 20%)			Группа 2 (Ki-67 > 20%)			P
	Медиана	Q1	Q2	Медиана	Q1	Q2	
CD4+CD278+CD25+	7,65	0,7	14,6	5,7	1,5	15,8	0,769698
CD152+ (CTLA-4)	1,35	0,75	8,2	1,9	1,1	5,2	0,695299
CD4+CD152+	0,65	0,35	5,15	0,7	0,5	2,5	0,793098
CD4+CD25+CD152+	2,6	1	13,7	2,3	1,5	3,5	0,73377
CD28+	53,5	42,5	61	57,5	56,8	68,6	0,569765
CD8+CD28+	16,3	12,9	18,2	17,4	17,2	24,9	0,291153
CD11b+	28,8	25	30,4	26,8	18	63,4	0,807541
CD8+CD11b+	9,6	8,5	12,7	14,2	7,2	21,4	0,464903
CD8+CD11b+CD28-	13,8	10,7	19,5	13,8	9,1	27	0,934827
CD8+CD11b+CD28+	15,4	8,5	18,3	17,9	8,3	22,5	0,464903
CD8+CD11b-CD28-	38,3	34,7	54,7	37,9	30	43,1	0,371752
CD8+CD11b-CD28+	24,9	17,3	33	26,7	19,9	44,5	0,684744
CD279+ (PD-1)	49	30,5	54,7	45	42,6	48,7	0,643429
CD4+CD279+	25,5	9,8	29,6	27,05	22,8	28,95	0,682408
CD8+CD279+	24,5	13,8	31,75	21,05	17,35	24,95	0,610385
CD95+	24	24	24	54,9	17,05	77,95	1
CD8+CD95+	7,8	7,8	7,8	21,85	4,9	32,7	1
Perforin+	5,35	3,35	7,85	5,3	3	6,8	1
CD8+Perf+	3,9	2,05	4,85	4,05	1,85	5,3	1
ЦТП CD8	0,103	0,056	0,13	0,087	0,0417	0,131	0,77283
CD16+Perf+	1,05	0,65	4,55	1,1	0,7	3	0,858427
ЦТП CD16	0,329	0,162	0,507	0,136	0,0405	0,462	0,479501
Lag3+	1,5	1	3	2	1,4	5,7	0,398364
CD4+Lag3+	1,2	0,5	1,6	1,25	0,8	3,7	0,394472
CD8+Lag3+	0,5	0,3	2,6	1,55	0,6	3,25	0,130105
CD16+Lag3+	0	0	0	0,55	0,15	1,85	0,03558
CD4+CD25+Lag3+	0,8	0,7	18,9	1,35	0,7	3,8	1
CD4+CD25-Lag3+	0,9	0,7	4,2	1	0,4	3,1	0,288697
CD8+CD25+Lag3+	1,7	0,9	2,3	2	0,9	4,7	0,5454
CD8+CD25-Lag3+	1,7	1,4	3,5	1,4	0,8	2,7	0,77489
GITR+	10,3	2,8	12	15,75	10,15	18,1	0,008725
CD4+GITR+	8,15	3,5	8,6	10,7	8,2	15,2	0,038386
CD8+GITR+	2,8	1,8	3,1	3,25	2,2	5,85	0,163141
CD16+GITR+	1	0,4	3,2	1,2	0,2	1,9	0,908994
CD4+CD25+GITR+	6,7	1,5	21,5	10,3	3,7	16,6	0,755343
CD4+CD25-GITR+	5,45	2,7	9,2	7,4	2,3	12,3	0,55905
CD8+CD25+GITR+	3	0,6	6,5	3,2	1,8	6,5	0,703033
CD8+CD25-GITR+	3,7	1,3	4,9	5	2,3	9,1	0,3571
События	1300	1036	1660	1272	576,5	2300	0,971756
% TIL	0,4	0,4	1	0,75	0,25	1,3	0,762824
Ki67	0,08	0,05	0,15	0,32	0,275	0,365	0,000001

Был проведен корреляционный анализ иммунологических и клинических параметров, изучаемых в этом исследовании. Для показателей ПК обнаружено, что маркер Lag-3 имеет положительную связь с такими супрессорными молекулами, как PD-1 и CTLA-4, маркером апоптоза CD95, популяциями CD8 лимфоцитов и НКТ-клеток, а также обратную связь — цитотоксическим потенциалом CD8 и CD16 лимфоцитов. Другая молекула — иммунный чек-пойнт ICOS демонстрирует обратную зависимость от экспрессии PD-1. Молекула PD-1, в свою очередь, имеет прямую корреляцию с CD8 и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитами, НКТ-клетками. GITR обладает обратной зависимостью с популяцией CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> клеток, а также с общим количеством CTLA-4 и CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> лимфоцитов. В ходе корреля-

ционного анализа обнаружено, что популяция CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> клеток имеет взаимосвязь со многими иммунологическими и клиническими параметрами, в частности с экспрессией эстрогеновых и прогестероновых рецепторов, содержанием Т-регуляторных клеток и активационной молекулой GITR. Ki-67 продемонстрировал прямую зависимость с содержанием Т-лимфоцитов и ЦТЛ и обратную — с количеством НК-клеток, Lag-3 и CD8<sup>+</sup>Lag-3<sup>+</sup> лимфоцитов (табл. 3). Для экспрессии эстрогеновых рецепторов выявлена зависимость с содержанием CTLA-4, CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, GITR, Lag-3 и CD4<sup>+</sup>Lag-3<sup>+</sup> клеток.

При аналогичном исследовании взаимосвязи показателей ЛИО с клиническими параметрами было установлено, что содержание Lag-3,

Таблица 3

**Значимые корреляционные связи между иммунологическими параметрами периферической крови и клиническими показателями больных РМЖ**

Иммунологические и клинические параметры		R (коэффициент корреляции)	Значимость (по Чеддоку)
ICOS	PD-1+ (CD279)	-0,41	Умеренная
CTLA-4	Lag-3	0,54	Заметная
	CD8+Lag-3+	0,59	Заметная
	CD16+Lag-3+	0,5	Заметная
PD-1	CD3+CD8+	0,56	Заметная
	CD8+	0,5	Заметная
	НКТ	0,48	Умеренная
	ICOS+ (CD278)	-0,41	Умеренная
	Lag-3+	0,4	Умеренная
	CD28+	0,46	Умеренная
	CD8+CD11b+	0,43	Умеренная
Lag-3	CD95+	0,44	Умеренная
	PD-1+ (CD279)	0,4	Умеренная
	ER	-0,33	Умеренная
	CD8+	0,45	Умеренная
	НКТ	0,4	Умеренная
	Ki-67	-0,36	Умеренная
	ЦТЛ CD8	-0,63	Заметная
	ЦТЛ CD16	-0,4	Умеренная
	CTLA-4+ (CD152)	0,54	Заметная
	CD8+Lag-3+	0,4	Умеренная
CD8+PD-1+	CD8+Lag-3+	0,36	Умеренная

Иммунологические и клинические параметры		R (коэффициент корреляции)	Значимость (по Чеддоку)
ER	CTLA-4+ (CD152)	-0,42	Умеренная
	CD4+CTLA-4+	-0,36	Умеренная
	CD4+ CD25+CTLA-4+	-0,38	Умеренная
	GITR+	0,31	Умеренная
	Lag-3+	-0,33	Умеренная
	CD4+Lag-3+	-0,36	Умеренная
	CD4+ CD25+ ICOS+	-0,45	Умеренная
PR	CD4+ CD25+ ICOS+	-0,41	Умеренная
	CD8+CD11b+CD28+	0,36	Умеренная
GITR	CD4+ CD25+ ICOS+	-0,44	Умеренная
	CTLA-4+ (CD152)	-0,31	Умеренная
	CD4+CTLA-4+	-0,31	Умеренная
	ER	0,31	Умеренная
Ki67	CD3+	0,44	Умеренная
	CD3+CD8+	0,32	Умеренная
	NK	-0,47	Умеренная
	Lag-3+	-0,36	Умеренная
	CD8+Lag-3+	-0,32	Умеренная
CD4+CD25+ICOS+	CD4+CD25+CD127 <sup>-low</sup> Treg	0,44	Умеренная
	GITR+	-0,44	Умеренная
	CD4+GITR+	-0,59	Заметная
	CD8+GITR+	-0,44	Умеренная
	ER	-0,45	Умеренная
	PR	-0,41	Умеренная

так же как и в ПК, имеет прямую корреляцию с популяцией CD8 лимфоцитов и НКТ-клеток, обратную связь — с количеством перфорин-содержащих CD8 лимфоцитов. Для молекулы ICOS показана сильная прямая связь с популяцией CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-low</sup> Treg, двойных позитивных и двойных негативных НКТ-клеток, и обратная — с популяцией CD8<sup>+</sup>НКТ-лимфоцитов. Популяция CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-low</sup> Treg имеет сильные корреляции с содержанием общего ICOS, CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>, заметную с CD4<sup>+</sup>НКТ-лимфоцитами и сильную обратную взаимосвязь с CD8<sup>+</sup>НКТ-лимфоцитами. Процентное содержание ЛИО имеет положительную связь с содержанием наивных CD28 и CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> лимфоцитов и отрицательную — с НК-клетками и цитотоксическими CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> лимфоцитами. Экспрессия Ki-67 связана отрицательной кор-

реляцией с содержанием В-лимфоцитов, экспрессия прогестероновых рецепторов — с ЦТП CD16 клеток, экспрессия эстрогеновых рецепторов имеет положительную связь с содержанием CD8<sup>+</sup>Lag-3<sup>+</sup> клеток (табл. 4).

### Обсуждение

Сопоставление результатов корреляционного анализа и деления больных на группы в зависимости от клинических параметров показало, что простого сравнения иммунологических маркеров и популяций иммунокомпетентных клеток недостаточно для установления взаимосвязей. Существует ограниченное количество работ, освещающих взаимосвязь субпопуляционной структуры лимфоцитов ПК и ЛИО и маркера Ki-67. У больных раком яичников с помощью иммуногистохимического окрашивания установлено, что Ki-67 имеет корреляцию

Таблица 4

**Значимые корреляционные связи между иммунологическими параметрами ЛИО и клиническими показателями больных РМЖ. Выделены связи, отмеченные также для показателей ПК**

Иммунологические и клинические параметры		R (коэффициент корреляции)	Значимость (по Чеддоку)
CD4+CD25+CD127-/low Treg	NKT CD4+	0,55	Заметная
	NKT CD8+	-0,72	Тесная
	ICOS+	0,91	Весьма тесная
	CD4+ICOS+	0,89	Тесная
	CD4+CD25+ ICOS+	0,85	Тесная
ICOS (CD278)	NKT CD8+	-0,84	Тесная
	NKT CD4-CD8-	0,63	Заметная
	NKT CD4+CD8+	0,78	Тесная
	CD4+CD25+CD127-/low T reg	0,91	Весьма тесная
CTLA-4 (CD152)	NKT CD4+CD8+	0,7	Тесная
PD-1 (CD279)	CD3+CD8+	0,59	Заметная
	CD8+CD11b-CD28-	0,8	Тесная
	CD8+CD11b-CD28+	-0,71	Тесная
	Perforin+	-0,88	Тесная
	CD8+Perforin+	-0,82	Тесная
CD95	CD4+GITR+	0,83	Тесная
	CD8+GITR+	0,74	Тесная
	CD3+CD4+	0,8	Тесная
	CD8+	-0,68	Заметная
	CD3+CD8+	-0,76	Тесная
Lag-3	NKT CD4+	-0,62	Заметная
	CD8+	0,38	Умеренная
	NKT	0,38	Умеренная
	CD8+Perforin+	-0,71	Тесная
	CD3+CD8+	0,37	Умеренная
%TIL	NK	-0,38	Умеренная
	CD28+	0,66	Заметная
	CD8+CD28+	0,59	Заметная
	CD8+CD11b+CD28-	-0,75	Тесная
Ki67	CD3-CD19+	-0,56	Заметная
PR	ЦТП CD16	-0,95	Весьма тесная
ER	CD8+Lag3+	0,37	Умеренная

с инфильтрацией опухоли CD3, CD4 и CD8 лимфоцитами [18]. У больных гепатоцеллюлярной карциномой с помощью проточной цитометрии обнаружено, что Ki-67 имеет обратную корреляцию с содержанием опухоль-инфильтрирующих В-клеток [19]. В нашем исследовании обнаружено, что Ki-67 демонстрирует прямую взаимосвязь с Т-лимфоцитами и ЦТЛ в ПК

и обратную связь — с В-клетками, инфильтрирующими опухоль. Принимая во внимание тот факт, что CD3 Т-клетки и CD19 В-лимфоциты находятся в отрицательной зависимости между собой, данные наблюдения могут быть звеньями одной цепи. В последнее время растет количество исследований, доказывающих возможную роль В-лимфоцитов в формировании

противоопухолевого иммунного ответа, о чем может свидетельствовать и обнаруженное нами более высокое содержание В-клеток в структуре ЛИО в группе больных с низким содержанием Ki-67 [20].

Для экспрессии эстрогеновых рецепторов установлен тот факт, что при увеличении гормонзависимого статуса опухоли в периферической крови наблюдалось меньшее содержание супрессорных популяций (CTLA-4, CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, Lag-3, CD4<sup>+</sup>Lag-3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>). Зарубежными авторами также продемонстрирована обратная зависимость экспрессии ER и коингибиторных молекул на поверхности лимфоцитов [21]. Более того, увеличение содержания активационной молекулы GITR прямо коррелирует с возрастанием экспрессии ER. Для прогестероновых рецепторов обнаружены подобные зависимости: обратная с содержанием супрессорных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> клеток и прямая — с содержанием активированной популяции CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> лимфоцитов. Таким образом, можно предположить, что содержание супрессорных популяций может рассматриваться в качестве дополнительного маркера к гормональному статусу опухоли.

Для лимфоцитов ПК отмечено, что экспрессия молекул Lag-3, PD-1, CTLA-4, CD95 и содержание супрессорных субпопуляций лимфоцитов имеет прямую взаимосвязь, что говорит о наличии в ПК популяции «истощенных» лимфоцитов. В ряде зарубежных работ доказана роль «истощенных» лимфоцитов в формировании супрессорного фенотипа микроокружения опухоли и подавления противоопухолевого иммунного ответа [22]. В то же время нами показано, что содержание ICOS и PD-1 имеет обратную взаимосвязь, что, возможно, связано с двойственной ролью молекулы ICOS, которая может как усиливать ингибиторный эффект супрессорных популяций, так и выступать в роли активационной молекулы. Корреляционный анализ показал большую роль популяции лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>. Ранее было обнаружено, что CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-/low</sup> Treg, экспрессирующие молекулы ICOS, обладают повышенным супрессорным потенциа-

лом и вносят большой вклад в формирование проопухолевого микроокружения и проопухолевой иммунной реакции. Установлено, что CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-/low</sup> Treg теряют способность к иммуносупрессии при экспрессии молекулы GITR [23]. Из наших данных видно, что содержание данной популяции связано с CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-/low</sup> Treg лимфоцитами ( $r = 0,44$  для ПК и  $r = 0,85$  для ЛИО), что подтверждает обратная корреляция с содержанием GITR и CD4<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup> клеток. Также CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> подтверждают статус негативного маркера обратной корреляцией с эстрогеновыми и прогестероновыми рецепторами. Обращает на себя внимание более тесная ассоциация CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> с CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-/low</sup> Treg в ЛИО, чем в ПК (коэффициенты корреляции представлены выше), что свидетельствует о более высоком супрессивном потенциале CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-/low</sup> Treg в опухоли. И содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-/low</sup> Treg, и ICOS в структуре ЛИО имели прямую корреляцию с иммуносупрессорными популяциями НКТ-клеток, такими как CD4<sup>+</sup> НКТ-лимфоциты и двойные негативные НКТ-клетки, и обратную — с цитотоксическими CD8<sup>+</sup> НКТ.

Для лимфоцитов ПК и опухолевой ткани установлен тот факт, что при повышении содержания CD8 лимфоцитов также увеличивается количество PD-1, Lag-3 и НКТ-клеток. Все эти популяции либо обладают супрессорным потенциалом, либо свидетельствуют об истощении и несостоятельности противоопухолевого иммунного ответа [24, 25]. Таким образом, можно заключить, что повышенное содержание CD8<sup>+</sup> лимфоцитов не может быть однозначно благоприятным прогностическим фактором и необходимо проводить более глубокий анализ фенотипа этой популяции клеток. При этом данный факт указывает на хорошие терапевтические перспективы применения блокаторов PD-1 и Lag-3 и «переобучения» «истощенных» Т-лимфоцитов.

### Заключение

Проанализированы показатели системного и локального иммунитета 68 больных первично операбельным РМЖ.

Обнаружена связь клинических и иммунологических параметров больных РМЖ. Для маркера пролиферации Ki-67 показана взаимосвязь с содержанием ЦТЛ и Т-лимфоцитов в ПК и В-клеток в ЛИО.

Для эстрогеновых и прогестероновых рецепторов установлена обратная зависимость от содержания супрессорных популяций лимфоцитов, в первую очередь CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, а также экспрессией Lag-3.

Взаимосвязи экспрессии ингибиторных молекул более выражены в опухолевой тка-

ни, чем в ПК, что свидетельствует о более супрессорном фенотипе опухолевого микроокружения.

Показано, что повышение содержания CD8 клеток в ПК и ЛИО сопровождается повышением коэкспрессии супрессорных молекул, что указывает на неблагоприятную прогностическую значимость этой популяции, однако открывает возможности для применения иммунотерапии таких больных.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Greaves P., Gribben J.G. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy // *Blood*. 2013. Vol.121(5). P. 734–44. doi: 10.1182/blood-2012-10-385591.
2. Wilcox R.A. A three-signal model of T-cell lymphoma pathogenesis // *Am J Hematol*. 2016.9 Vol.91(1). P. 113–22. doi: 10.1002/ajh.24203.
3. Leung J, Suh WK. The CD28-B7 Family in Anti-Tumor Immunity: Emerging Concepts in Cancer Immunotherapy // *Immune Netw*. 2014. Vol.14(6). P.265–76. doi: 10.4110/in.2014.14.6.265.
4. Collin M. Immune checkpoint inhibitors: a patent review (2010–2015) // *Expert Opin Ther Pat*. 2016. Vol. 26(5). P. 555–64. doi: 10.1080/13543776.2016.1176150.
5. Looi C.K., Chung F.F., Leong C.O., Wong S.F., Rosli R., Mai CW. Therapeutic challenges and current immunomodulatory strategies in targeting the immunosuppressive pancreatic tumor microenvironment // *J Exp Clin Cancer Res*. 2019. Vol. 38 (1). P.162. doi: 10.1186/s13046-019-1153-8
6. Wang X., Guo G., Guan H., Yu Y., Lu J., Yu J. Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma // *J Exp Clin Cancer Res*. 2019. Vol. 38 (1). P. 87. doi: 10.1186/s13046-019-1085-3;
7. Sanmamed M.F., Pastor F., Rodriguez A., Perez-Gracia J.L., Rodriguez-Ruiz M.E., Jure-Kunkel M., et al. Agonists of Co-stimulation in Cancer Immunotherapy Directed Against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS // *Semin Oncol*. 2015. Vol. 42 (4). P. 640–655. doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.014.
8. Rotte A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer // *J Exp Clin Cancer Res*. 2019. Vol. 38(1). P. 255. doi: 10.1186/s13046-019-1259-z
9. Rotte A., D'Orazi G., Bhandaru M. Nobel committee honors tumor immunologists // *J Exp Clin Cancer Res*. 2018. Vol. 37(1). P.262. doi: 10.1186/s13046-018-0937-6.
10. Redoglia V., Dianzani U., Rojo JM., Portolés P., Bragardo M., Wolff H. et al. Characterization of H4: a mouse T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/T cell receptor // *Eur J Immunol*. 1996. Vol. 26(11). P. 2781–9. doi: 10.1002/eji.1830261134. PMID: 8921969.
11. Hutloff A., Dittrich A.M., Beier K.C., Eljaschewitsch B., Kraft R., Anagnostopoulos I., Kroczeck R.A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28 // *Nature*. 1999. Vol.397(6716). P. 263–6. doi: 10.1038/16717. PMID: 9930702.
12. Zeng H., Zhou Q., Wang Z., Zhang H., Liu Z., Huang Q. et al. Stromal LAG-3<sup>+</sup> cells infiltration defines poor prognosis subtype muscle-invasive bladder cancer with immunoevasive contexture // *J Immunother Cancer*. 2020. Vol.8(1): e000651. doi: 10.1136/jitc-2020-000651.
13. Andrews L.P., Marciscano A.E., Drake C.G., Vignali D.A. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target // *Immunol Rev*. 2017. Vol.276(1). P.80–96. doi: 10.1111/imr.12519.
14. Brunn N.D., Mauze S., Gu D., Wiswell D., Ueda R., Hodges D. et al. The Role of Anti-Drug Antibodies in the Pharmacokinetics, Disposition, Target Engagement, and Efficacy of a GITR Agonist Monoclonal Antibody in Mice // *J Pharmacol Exp Ther*. 2016. Vol. 356(3). P.574–86. doi: 10.1124/jpet.115.229864.
15. Savas P., Salgado R., Denkert C., Sotiriou C., Darcy P.K., Smyth M.J., Loi S. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic // *Nat Rev Clin Oncol*. 2016. Vol.13(4). P. 228–41. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.215.

16. Adams S., Gatti-Mays M.E., Kalinsky K., Korde L.A., Sharon E., Amiri-Kordestani L et al. Current Landscape of Immunotherapy in Breast Cancer: A Review // JAMA Oncol. 2019. Vol.5(8). P.1205–1214. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.7147.
17. Amatore F., Gorvel L., Olive D. Inducible Co-Stimulator (ICOS) as a potential therapeutic target for anti-cancer therapy // Expert Opin Ther Targets. 2018. Vol. 22(4). P. 343–351. doi: 10.1080/14728222.2018.1444753.
18. Dai D., Liu L., Huang H., Chen S., Chen B., Cao J. et al. Nomograms to Predict the Density of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients With High-Grade Serous Ovarian Cancer // Front Oncol. 2021. Vol.11. 590414. doi: 10.3389/fonc.2021.590414.
19. Garnelo M., Tan A., Her Z., Yeong J., Lim C.J., Chen J. et al. Interaction between tumour-infiltrating B cells and T cells controls the progression of hepatocellular carcinoma // Gut. 2017. Vol. 66(2). P.342–351. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310814.
20. Lee H.E., Luo L., Kroneman T., Passow M.R., Del Rosario K.M., Christensen M.R et al. Increased Plasma Cells and Decreased B-cells in Tumor Infiltrating Lymphocytes are Associated with Worse Survival in Lung Adenocarcinomas // J Clin Cell Immunol. 2020. Vol.11(1). P. 584.
21. Wagner J., Rapsomaniki M.A., Chevrier S., Anzeneder T., Langwieder C., Dykgers A. et al. A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer // Cell. 2019. Vol.177(5). P.1330–1345.e18. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.005.
22. Li H., van der Leun A.M., Yofe I., Lubling Y., Gelbard-Solodkin D., van Akkooi A.C.J. et al. Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma // Cell. 2020. Vol.181(3). P. 747. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.017. Erratum for: Cell. 2019 Feb 7;176(4):775–789.e18.
23. Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T., Ishida Y., Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance // Nat Immunol. 2002. Vol. 3(2). P.135–42. doi: 10.1038/ni759
24. Wang H., Yin S. Natural killer T cells in liver injury, inflammation and cancer // Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2015. Vol.9(8). P.1077–85. doi: 10.1586/17474124.2015.1056738. Epub 2015 Jun 11.
25. Miller B.C., Sen D.R., Al Aboosy R., Bi K., Virkud Y.V., LaFleur M.W. et al. Subsets of exhausted CD8<sup>+</sup> T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade // Nat Immunol. 2019. Vol.20(3). P. 326–336. doi: 10.1038/s41590-019-0312-6.

## АВТОРЫ

*Заботина Татьяна Николаевна*, заведующая отделом клинико-лабораторной диагностики НИИ КО им. акад. РАН и РАМН Н.Н.Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, доктор биологических наук, Москва, e-mail: tatzabotina@yandex.ru, SPIN-код: 8628-9705, <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

*Zabotina Tatiana N.*, PhD, head of the Department of clinical and laboratory diagnostics of FSBI «Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, e-mail: tatzabotina@yandex.ru, SPIN-code: 8628–9705, <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

*Табачков Дмитрий Вячеславович*, научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, кандидат медицинских наук, Москва, e-mail: dtabakov91@mail.ru, SPIN-код: 1233–6671, <https://orcid.org/0000-0002-1509-2206>

*Tabakov Dmitrii V.*, PhD, Research Associate of FSBI «Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, e-mail: dtabakov91@mail.ru, SPIN-code: 1233-6671, <https://orcid.org/0000-0002-1509-2206>

*Захарова Елена Николаевна*, научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, кандидат медицинских наук, Москва, e-mail: zakharovaen@yandex.ru, SPIN-код: 9334-0459, <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>

*Zakharova Elena N.*, PhD, Research Associate of FSBI «Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, e-mail: zakharovaen@yandex.ru, SPIN-code: 9334-0459, <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>

*Чантурия Наиля Валерьевна*, врач-онколог №16 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, e-mail: naily.chanturia@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7903-6417>

*Chanturia Naily V.*, oncologist of FSBI «Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, e-mail: naily.chanturia@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7903-6417>

*Сельчук Владимир Юрьевич*, заведующий кафедрой онкологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор, Москва, e-mail: selvu@gmail.com, SPIN-код: 6180-5569

*Selchuk Vladimir Y.*, PhD, Professor, Head of the Department of Oncology of Federal State Budgetary Educational Institution of the Higher Education «A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, e-mail: selvu@gmail.com, SPIN-code: 6180-5569