

# ЛИМФОИДНОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

**Т.Н. Заботина, Е.Н. Захарова, А.А. Борунова, Н.А. Козлов,  
А.С. Шевчук, И.В. Паниченко**

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, Москва

**Цель исследования.** Изучение особенностей лимфоидного микроокружения опухоли первично операбельных больных раком яичников.

**Материалы и методы.** В исследование включены образцы опухолевой ткани 53 пациенток с первично операбельным раком яичников. Оценивали степень инфильтрации опухоли лимфоцитами (ТИЛ) и их субпопуляции с помощью метода проточной цитометрии, пространственное расположение иммунных клеток на гистологических срезах (гематоксилин-эозин).

**Результаты.** Медиана содержания (ТИЛ) в образцах опухолевой ткани составила 1,35%. Результаты оценки количества ТИЛ, полученные двумя разными методами, оказались сопоставимы. При этом проточная цитометрия позволяет получить высокоточный результат автоматического подсчета клеток с учетом иммунологического фенотипа, а морфологический анализ дополняет особенности пространственного расположения ТИЛ в опухолевой ткани. Ключевым аспектом анализа ТИЛ является субпопуляционная структура клеток у пациенток с уровнем ТИЛ ниже (1-я группа) и выше (2-я группа) значений медианы. Выявлено, что среди «линейных» популяций ТИЛ у пациенток 2 группы уровень Т-клеток CD3+CD19- статистически значимо выше по сравнению с пациентками 1-й группы. И, напротив, процентное содержание НК-клеток с фенотипами CD3-CD16+CD56+ и CD3-CD8+ в группе больных с уровнем ТИЛ ниже медианы превышало показатели пациенток 2-й группы. Корреляционный анализ выявил значимую обратную зависимость количества НК-клеток от степени инфильтрации ТИЛ ( $r = -0,5117$ ). В структуре Т-клеток обнаружено, что у пациенток с содержанием ТИЛ >1,35%, выше доля CD3+CD4+ лимфоцитов. Исследование в опухолевой ткани 3-х популяций, опосредующих регуляторные функции — CD4, CD8, NKT лимфоцитов, выявило, что только популяция NKT-клеток с фенотипом CD3+CD16+CD56+ статистически значимо выше в группе больных с медианой ТИЛ <1,35%. Выявлена заметная прямая корреляция между плотностью ТИЛ в образцах ткани и уровнем Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4+CD279 (PD1)+ ( $r = 0,5975$ ).

**Заключение.** Лимфоидное микроокружение при раке яичников характеризуется следующими параметрами:

- 1) низкая степень инфильтрации опухоли лимфоцитами (ТИЛ);
- 2) пространственное расположение лимфоцитов не зависит от степени инфильтрации ТИЛ;
- 3) для структуры ТИЛ показана прямая значимая корреляция степени инфильтрации лимфоцитами и Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4+CD279 (PD1)+ ( $r = 0,5975$ ) и обратная корреляция с уровнем НК-клеток ( $r = -0,5117$ ).

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, ТИЛ, иммунофенотип, рак яичников.

## LYMPHOID MICROENVIRONMENT IN OVARIAN CANCER

**T.N. Zabolina, E.N. Zakharova, A.A. Borunova, N.A. Kozlov,  
A.S. Shevchuk, I.V. Panichenko**

Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology"  
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

**Objective of the study** is to research the specific features of tumor lymphoid microenvironment in primary operable patients with ovarian cancer.

**Materials and Methods.** Samples of tumor tissue of 53 patients with primary operable ovarian cancer were included in the research. A degree of lymphocyte infiltration of the tumor (TIL) and their subpopulations were evaluated using flow cytometry technique, spatial localization of immune cells — on histological sections (hematoxylin — eosin).

**Results.** A median of tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) content in the samples of tumor tissue was 1,35%. The results of the assessment of tumor-infiltrating lymphocyte count obtained by different techniques proved to be consistent. Herewith, flow cytometry provides highly accurate result of the automated cell counting based on immunological phenotype, while morphological analysis complements the features and peculiarities of spatial localization of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in tumor tissue. Cell subpopulation structure in patients with tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) level lower (group 1) and higher (group 2) than median values are the key aspect of tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) analysis. It was revealed, that among “linear” TIL populations in patients of group 2 the level of T-cells CD3CD19- is statistically significantly higher compared to patients of group 1. Conversely, a percentage content of NK-cells with CD3-CD16+CD56+ and CD3-CD8+ phenotypes in the group of patients with TIL level lower than a median value, exceeded the respective indicators of patients from group 2. Correlation analysis determined a significant inverse relationship between NK-cell count and a degree of lymphocyte infiltration of the tumor (TIL) ( $r = -0,5117$ ). T-cell structure reveals that a proportion of CD3+CD4+ lymphocytes is higher in patients with tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) content greater than 1,35%. The examination of tumor tissue of 3 populations, that mediate regulatory functions — CD4, CD8, NKT lymphocytes found that only NKT-cell population with CD3+CD16+CD56+ phenotypes is statistically significantly higher in a group of patients with a median of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) < 1,35%. A significant direct correlation between the tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) density in tumor samples and the level of T-regulatory cells with CD4+CD279(PD1)+ phenotype ( $r = 0,5975$ ) has been identified.

**Conclusion.** Lymphoid microenvironment in breast cancer is characterized by the following parameters:

- 1) low degree of tumor infiltration by lymphocytes (TIL);
- 2) a spatial localization of lymphocytes doesn't depend on a degree of tumor infiltration by lymphocytes (TIL);
- 3) a significant direct correlation of a degree of tumor infiltration by lymphocytes (TIL) with T-regulatory cells with CD4+CD279(PD1)+ phenotype ( $r = 0,5975$ ) and an inverse correlation with NK-cell level ( $r = -0,5117$ ) have been demonstrated for tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) structure.

**Keywords:** flow cytometry, tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), immunophenotype, ovarian cancer.

## Введение

Лечение злокачественных эпителиальных опухолей яичников — одна из наиболее трудных проблем онкогинекологии. В связи с тем, что большинство из них длительное время протекают бессимптомно, примерно у 70–75% больных диагноз ставится на поздних стадиях. Частично этим фактом объясняются самые высокие показатели летальности среди больных раком яичников (РЯ) по сравнению с аналогичными показателями у пациенток с другими новообразованиями женских половых органов [1, 2]. Даже при достижении полной ремиссии после комбинированного лечения рецидив возникает у 70–80% пациенток в течение 2–5 лет, а резистентность к лекарственным препаратам развивается рано или поздно у всех пациенток с прогрессированием заболевания, что приводит к летальному исходу [3, 4].

Механизм, лежащий в основе прогрессирования заболевания при раке яичников, не до конца ясен и может быть связан с изменениями в иммунной системе [5]. Особое внимание в этом контексте уделяется локальному иммунитету — иммунологическому микро-

окружению опухоли. Наличие лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (ТИЛ), в микроокружении РЯ уже доказано, и оно коррелирует с общей выживаемостью (ОВ), в то время как иммунные механизмы уклонения связывают с плохим прогнозом [6]. Прогностическое значение ТИЛ у больных раком яичников убедительно продемонстрировано в целом ряде зарубежных исследований. Zhang и коллеги в числе первых показали, что наличие ТИЛ в опухоли яичника на момент ее выявления, особенно CD3-положительных Т-клеток, обеспечивает 8-кратное увеличение 5-летней выживаемости [7]. Позже E. Sato и соавторы конкретизировали, что, в отличие от стромальных ТИЛ, именно интраэпителиальные (непосредственно внутриопухолевые) Т-клетки связаны с увеличением выживаемости [8].

Мета-анализ прогностической роли Т-клеток, инфильтрирующих опухолевую ткань больных раком яичников, указывает, что наличие ТИЛ является предиктором благоприятного клинического течения заболевания в исследовании Hwang W-TW с соавторами [9]. Взаимная передача сигналов между иммунными клетками и клетками

Таблица 1

**Распределение пациентов с учетом стадии заболевания**

| Стадия | N = 53 | %    |
|--------|--------|------|
| I      | 5      | 9,3  |
| II     | 3      | 5,6  |
| III    | 37     | 70,0 |
| IV     | 8      | 15,1 |

рака яичников в микроокружении опухоли может изменять иммунные реакции и регулировать прогрессирование заболевания. Federica Zito Marino с соавторами считает, что исходная плотность, локализация и субпопуляционная структура ТИЛ могут существенно повлиять на клиническую эффективность терапии, направленную на ингибиторы иммунных контрольных точек, предполагая их пользу при отборе пациентов для иммунотерапии рака, а в сочетании с PD-L1/PD-1 статусом возможность разработки индивидуальной программы лечения [10].

Новые клинические данные свидетельствуют о том, что иммунотерапия рака, при которой собственная иммунная система пациента используется для уничтожения опухолевых клеток, ляжет в основу лечения злокачественных опухолей, включая рак яичников [11]. Понимание связанных с опухолью изменений в иммунных клетках микроокружения может прояснить механизмы патогенеза заболевания и выявить новые биомаркеры и терапевтические мишени, формирующие иммунные реакции в микроокружении опухоли при раке яичников [12].

**Целью** данной работы было изучение особенностей лимфоидного микроокружения опухоли первично операбельных больных РЯ.

Таблица 2

**Распределение пациентов по гистологическому типу РЯ**

| Морфология               | N = 53 | %    |
|--------------------------|--------|------|
| Серозный рак             | 44     | 83,0 |
| Недифференцированный рак | 4      | 3,7  |
| Муцинозный рак           | 2      | 3,8  |
| Светлоклеточный рак      | 2      | 1,9  |
| Эндометриоидный рак      | 1      | 7,6  |

**Материалы и методы**

**Пациенты.** В исследование включены 53 пациентки, получавшие хирургическое лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2015 по 2021 год с гистологически верифицированным раком яичников. Все пациенты дали информированное согласие для проведения исследований. Распределение пациенток по стадиям заболевания и гистологической форме опухоли представлено в табл. 1 и 2. Медиана (нижн./верхн. квартиль) возраста пациенток составила 55,0 лет (44,0–64,0), минимум — 32, максимум — 80.

**Получение суспензии клеток из опухолевой ткани.** Образцы опухолевой ткани получали интраоперационно, помещали их в среду PBS или в физиологический раствор. При необходимости хранили образцы при температуре +4°C, но не более 12 ч. Для выделения внутриопухолевых лимфоцитов и опухолевых клеток ткань подвергали умеренной гомогенизации с помощью модуля BD Medimachine Module (BD Bioscience, США) при комнатной температуре с последующей фильтрацией через фильтр Filcon 50мкм (BD Bioscience, США) и использовали без дополнительной отмывки.

**Имунофенотипирование клеток.** Для анализа иммунофенотипа внутриопухолевых лимфоцитов и опухолевых клеток проводили стандартную прямую реакцию иммунофлуоресценции (РИФ). Для этого использовался набор специфических моноклональных антител (МКА) производства BD Bioscience, Beckman Coulter и e-Bioscience.

Субпопуляционную структуру лимфоцитов исследовали с применением следующих комбинаций меченых различными флуорохромами моноклональных антител: CD3/CD8/CD4 — Т-клетки и их субпопуляции, специфические (ЦТЛ) и неспецифические эффекторы; CD3/CD19/HLA-Dr- Т-клетки, В-клетки, активированные Т-клетки; CD3/CD16+56 — NK-клетки, NKT-клетки; CD4/CD25/CD127 — Treg, активированные Т-клетки; CD8/CD28/CD11b — Treg, активированные клетки, наивные клетки, клетки-эффекторы.

**Проточная цитометрия.** Для оценки экспрессии поверхностных и внутриклеточных

маркеров использовались проточные цитометры аналитического типа FACSCalibur и FACSCanto II (BD Bioscience, США) с программным пакетом CellQuest и FACSDiva 7.0 соответственно. В каждом образце анализировали 5000 событий в гейте CD45+ лимфоцитов.

Использованы различные современные подходы многопараметрового проточно-цитометрического анализа в сочетании со стратегией последовательного гейтирования лимфоидных эффекторных и супрессорных клеток опухолевой ткани больных РЯ. На первом этапе выделяли единичные клетки (singlets) в координатах FSC-H vs FSC-A, затем оценивали лимфоидные клетки по связыванию с МКА анти-CD45 в координатах SSC vs CD45, далее анализировали процентное содержание клеточного состава (рис. 1).

**Морфологический анализ.** Оценку выраженности и топографии лимфоцитарной инфильтрации опухоли проводили с помощью светового микроскопа в гистологических препаратах операционного материала, изготовленных по стандартной методике. Для анализа препаратов использовали световой микроскоп LeicaDM2000. При увеличении x100-x200 проводилась полуколичественная оценка площади, занимаемой ТИЛ в опухоли, с последующим разделением на стромальные ТИЛ (расположены в строме инвазивного рака без прямого кон-

такта с мембраной опухолевых клеток) и интра-туморальные ТИЛ (иммунные клетки непосредственно контактируют с клетками рака). Полуколичественная оценка ТИЛ подразделялась на следующие градации: отсутствие (нет различимых ТИЛ в опухоли), скудная (ТИЛ занимают 1–10% площади РЯ), умеренная (ТИЛ занимают 11–29% площади РЯ), выраженная (ТИЛ занимают  $\geq 30\%$  площади РЯ).

**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 2010. Статистический анализ проводился с использованием программы STATISTICA 12 (разработчик — StatSoft.Inc).

Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению, для этого использовался критерий Шапиро-Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерий Колмогорова-Смирнова (при числе исследуемых более 50), а также показатели асимметрии и эксцесса. Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывались при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1-Q3).

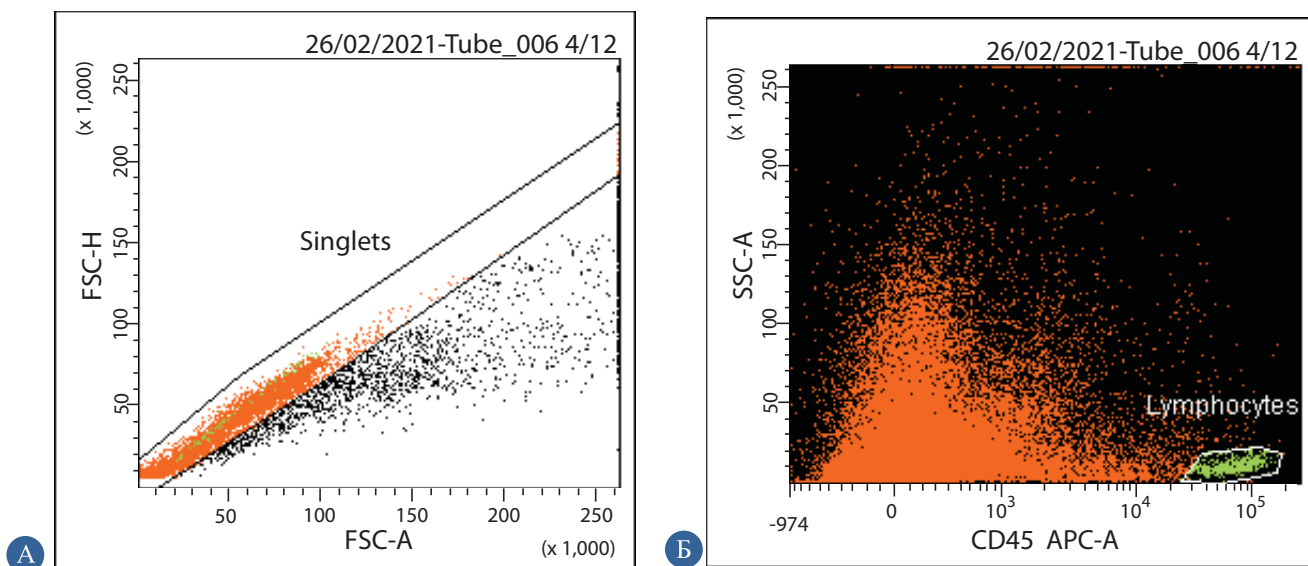


Рис. 1. Методический прием выделения единичных клеток (А) и лимфоидных клеток (Б) из суспензии клеток опухолевой ткани

Для сравнения независимых совокупностей в случаях отсутствия признаков нормального распределения данных использовался U-критерий Манна-Уитни. Рассчитанные значения U-критерия Манна-Уитни сравнивались с критическими при заданном уровне значимости: в том случае, если рассчитанное значение U было равно или меньше критического, признавалась статистическая значимость различий.

С целью изучения связи между явлениями, представленными количественными данными, распределение которых отличалось от нормального, использовался непараметрический метод — расчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

### Результаты исследования

Первым этапом нашего исследования было изучение степени или плотности инфильтрации опухоли CD45+ лимфоцитами. Диапазон числа ТИЛ в исследуемых образцах опухоли оказался в широких пределах от 0,18 до 30,4%, среднее значение 4,37%, при этом медиана содержания ТИЛ составила лишь 1,35%. При анализе доли пациенток с низким (менее 1%), средним (от 1 до 10%) и высоким содержанием (более 10%) ТИЛ в образцах ткани оказалось, что преобладают опухоли с низкой и средней инфильтрацией в равной пропорции — 43,5% (23/53) и 45,3% (24/53) соответственно, а высокая степень лимфоидных инфильтратов характерна только для 11,3% (6/53) пациенток (рис. 2).

Анализ распределения пациенток с различными клиническими стадиями и морфологическими типами опухоли показал, что в группах с содержанием лимфоцитов ниже (А) и выше (Б) медианы преобладали пациентки с III стадией заболевания (рис. 3).

Следует отметить, что в нашем исследовании отсутствовали пациентки со второй клинической стадией заболевания среди больных с медианой содержания ТИЛ ниже 1,35%, в то время как среди больных с медианой ТИЛ выше 1,35% не были выявлены пациентки с I стадией болезни. В обоих случаях преобладали пациентки с III стадией болезни, однако доля больных с IV стадией более чем в 3 раза чаще встречалась среди больных РЯ с низкой степенью инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами ( $p < 0,001$ ).

Распределение больных раком яичников по степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами с учетом гистологического типа опухоли выявил, что в обеих исследуемых группах (выше/ниже медианы) преобладали больные серозным раком яичников (76,9 и 88,9% соответственно) (табл. 3).

Важным компонентом оценки инфильтрации опухоли иммунными клетками является топографический характер их расположения в сочетании с плотностью. Нами исследован характер инфильтрации лимфоцитами 15 образцов опухолевой ткани с помощью морфологического анализа гистологических срезов

Число пациентов с различной степенью инфильтрации опухоли лимфоцитами

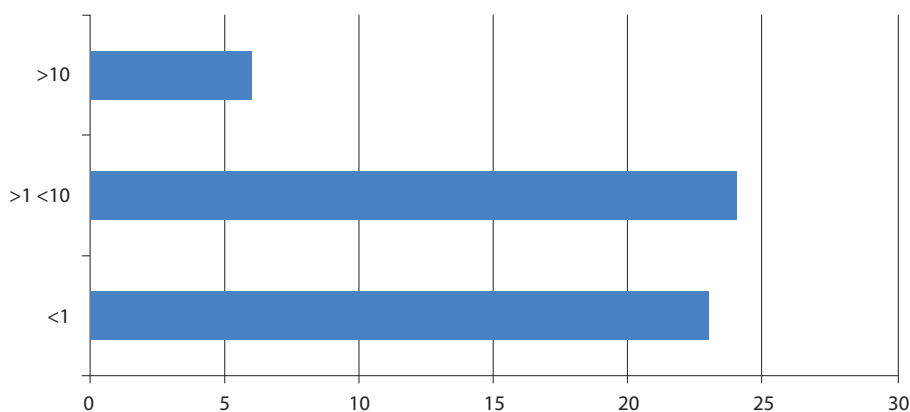


Рис. 2. Распределение пациенток с различной степенью инфильтрации опухоли лимфоцитами

Таблица 3

Распределение больных раком яичников по степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами с учетом гистологического типа опухоли

| Морфология               | ТИЛ<1,35%<br>N = 26 | ТИЛ>1,35%<br>N = 27 |
|--------------------------|---------------------|---------------------|
|                          | N (% от группы)     | N (% от группы)     |
| Серозный рак             | 20 (76,9%)          | 24 (88,9%)          |
| Недифференцированный рак | 2 (7,7%)            | 2 (7,4%)            |
| Муцинозный рак           | 2 (7,7%)            | —                   |
| Светлоклеточный рак      | 2 (7,7%)            | —                   |
| Эндометриоидный рак      | —                   | 1 (3,7%)            |

пациенток с различной степенью инфильтрации ТИЛ по результатам количественного автоматизированного анализа проточной цитометрии от 0,18 до 30,4%. В качестве примера приводим полученные данные пациенток с различным содержанием ТИЛ (рис. 4 а-г).

Таким образом, полученные двумя разными методами результаты оценки количества ТИЛ сопоставимы между собой. При этом проточная цитометрия позволяет получить высокоточный результат автоматического подсчета клеток с учетом иммунологического фенотипа, а морфологический анализ дополняет особенности пространственного расположения ТИЛ в опухолевой ткани.

Ключевым аспектом анализа ТИЛ является оценка субпопуляционной структуры клеток локального иммунитета непосредственно в опухолевой ткани. Был проведен анализ содержания иммунных клеток микроокружения опухоли

у пациенток с уровнем ТИЛ ниже (группа 1) и выше (группа 2) значений медианы (табл. 4).

Выявлено, что среди «линейных» (Т-, В-, НК-клетки) популяций ТИЛ у пациенток с большей инфильтрацией, уровень CD3+CD19-Т-клеток статистически значимо выше по сравнению с пациентками первой группы. И, напротив, процентное содержание НК-клеток с фенотипами CD3-CD16+CD56+ и CD3-CD8+в группе больных с уровнем ТИЛ ниже медианы статистически значимо превышало показатели пациенток второй группы.

Корреляционный анализ выявил значимую обратную зависимость количества НК-клеток от степени инфильтрации ТИЛ ( $r = -0,5117$ ).

При изучении субпопуляционной структуры Т-клеток обнаружено, что у пациенток с содержанием ТИЛ выше медианы статистически значимо выше доля CD3+CD4+ лимфоцитов.

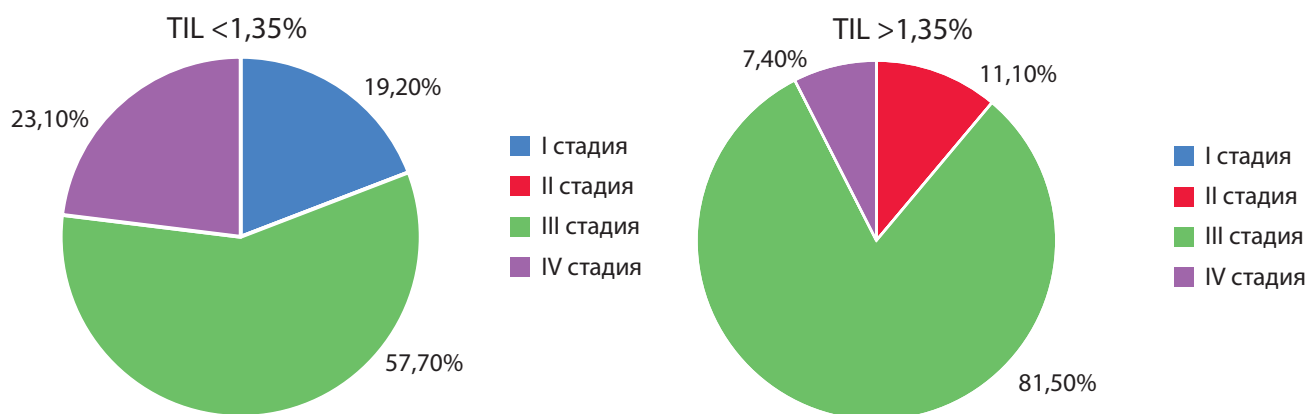
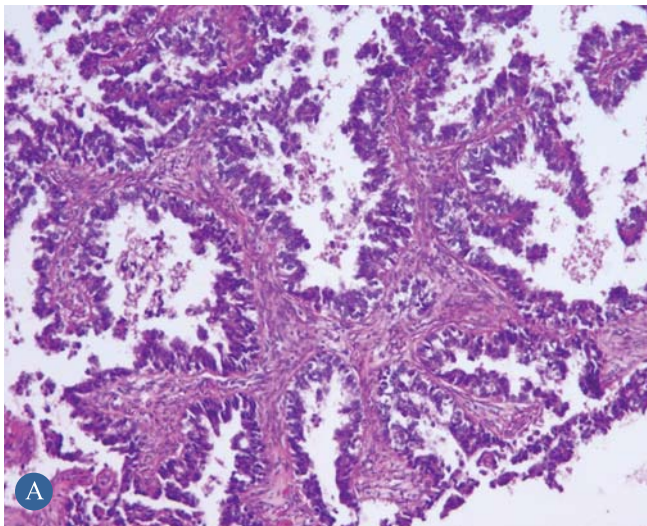


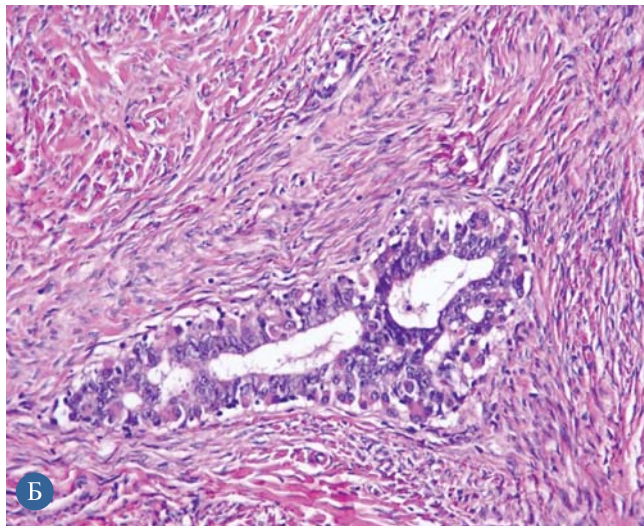
Рис. 3. Распределение больных раком яичников по стадиям заболевания в зависимости от степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами

Исследование содержания в опухолевой ткани трех основных популяций Т-клеток, опосредующих регуляторные или супрессорные функции CD4, CD8, NKT лимфоцитов, показало, что только популяция NKT-клеток с фенотипом CD3+CD16+CD56+ статисти-

чески значимо выше в группе больных с медианой ТИЛ < 1,35%. Выявлена заметная прямая корреляция между плотностью ТИЛ в образцах ткани и уровнем Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4+CD279 (PD1)+ ( $r = 0,5975$ ).

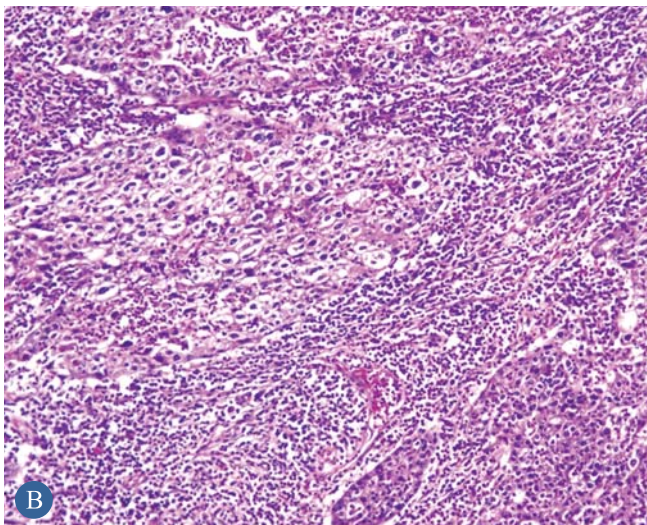


**Рис. 4а.** Больная О. — по результатам проточной цитометрии содержание ТИЛ 0,18%. По данным морфологического исследования — скудное содержание иммунных клеток в строме сосочков опухоли. Гематоксилин-эозин, увеличение  $\times 100$ .

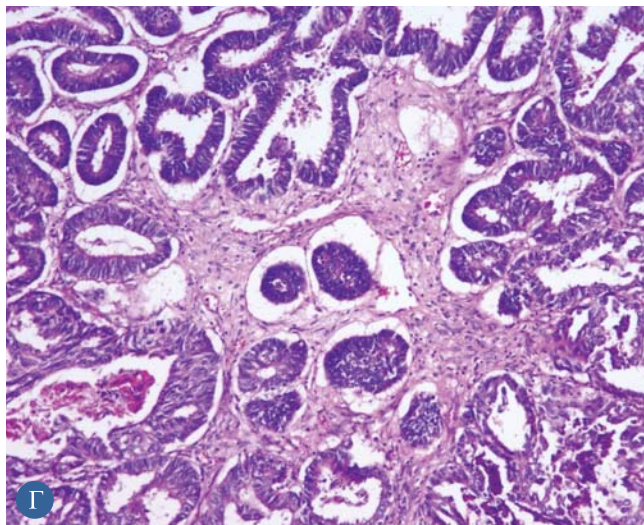


**Рис. 4б.** Больная А. — по результатам проточной цитометрии содержание ТИЛ 3,6%. По данным морфологического исследования — малое содержание иммунных клеток в строме опухоли, лимфоциты сконцентрированы на границе опухоли и стромы. Гематоксилин-эозин, увеличение  $\times 200$ .

Больная Л. — по результатам проточной цитометрии содержание ТИЛ 29,2%. По данным морфологического исследования — опухоль представлена низкодифференцированным (рис. 4в) и высокодифференцированным (рис. 4г) компонентами рака с топографически неоднородным содержанием ТИЛ.



**Рис. 4в.** Больная Л. — Низкодифференцированный компонент рака — выраженное содержание ТИЛ в строме опухоли. Гематоксилин-эозин, увеличение  $\times 100$ .



**Рис. 4г.** Больная Л. — Высоккодифференцированный компонент рака — скудное количество ТИЛ в строме опухоли. Гематоксилин-эозин, увеличение  $\times 100$ .

Содержание субпопуляций ТИЛ в группах пациентов с показателями ниже и выше медианы (1,35% медиана)

| Показатель          | Опухоль группа 1 (<1,35%)<br>N = 26 |      |      | Опухоль группа 2 (>1,35%)<br>N = 27 |      |      |
|---------------------|-------------------------------------|------|------|-------------------------------------|------|------|
|                     | М                                   | Q1   | Q3   | М                                   | Q1   | Q3   |
| % TIL в опухоли     | 0,4                                 | 0,2  | 0,8  | 3,6                                 | 1,8  | 9,9  |
| CD3+CD19-           | 76,7*                               | 70,6 | 88,8 | 86,3*                               | 82,4 | 92,9 |
| CD3+CD4+            | 27,7*                               | 20,8 | 32,5 | 37,7*                               | 23,5 | 47,0 |
| CD3+CD8+            | 46,3                                | 34,8 | 56,7 | 47,9                                | 36,6 | 58,1 |
| CD3-CD8+            | 3,8*                                | 1,8  | 5,4  | 2,6*                                | 0,9  | 4,3  |
| CD3-CD16+CD56+      | 12,0*                               | 9,6  | 23,9 | 9,2*                                | 3,5  | 10,1 |
| CD3+CD16+CD56+      | 12,0**                              | 9,8  | 21,9 | 11,2**                              | 5,7  | 12,5 |
| CD3-CD19+           | 2,1                                 | 0,4  | 4,3  | 2,6                                 | 0,4  | 3,4  |
| CD4+CD25+CD127-low  | 17,0                                | 12,5 | 29,5 | 19,5                                | 9,2  | 29,8 |
| CD8+ CD 11b- CD 28- | 56,8                                | 49,7 | 61,2 | 49,8                                | 33,8 | 63,4 |
| CD8+CD279 (PD1)+    | 34,7                                | 22,6 | 37,5 | 30,0                                | 18,4 | 46,6 |
| CD4+CD279(PD1)+     | 13,8                                | 10,2 | 19,5 | 21,0                                | 14,7 | 22,7 |

\*  $p < 0,0500$

\*\*  $p = 0,0590$

### Обсуждение

В данном исследовании изучались основные факторы, характеризующие лимфоидное микроокружение опухоли у первичных больных раком яичников: 1) степень инфильтрации; 2) топографический характер распределения; 3) субпопуляционная структура лимфоцитов в опухолевой ткани.

Утверждение, что высокая степень или плотность инфильтрации опухоли иммунными клетками, включая лимфоциты, является благоприятным прогностическим признаком при различных нозологических формах рака, в том числе и при раке яичников, сегодня неоспоримо. С этой целью был проведен анализ содержания пула лимфоидных клеток по окрашиванию МКА анти-CD45 методом проточной цитометрии. По мнению ряда авторов, именно этот подход имеет решающее значение для идентификации даже редких популяций клеток и позволяет идентифицировать и охарактеризовать новые подмножества клеток иммунной системы с точки зрения их морфологии, экспрессии поверхностных и внутриклеточных белков с высокой скоростью и чистотой [13, 14, 15]. Кроме того, окрашивание

ТИЛ и анализ методом проточной цитометрии не зависят от наличия гетерогенных популяций, в то время как другие приемы селективной изоляции могут значительно снизить выход лимфоцитов и без того редких популяций [16].

Следует отметить, что только в 11,3% (6/53) исследуемых образцов опухолевой ткани была выявлена высокая степень инфильтрации, в то время как 43,5% (23/53) и 45,3% (24/53) опухолей инфильтрированы очень слабо или имели промежуточную степень инфильтрации лимфоцитами. Эти данные подтверждают мнение, что рак яичников является слабо иммуногенной или «измененной иммуносупрессивной иммунной» опухолью, но не «исключенной иммунной» и не «холодной иммунной» опухолью [17]. В пользу этого свидетельствует тот факт, что ТИЛ определялись во всех исследуемых образцах опухолевой ткани, в то же время медиана оказалась лишь 1,35%. По-видимому, именно слабая инфильтрация опухоли иммунными клетками является причиной того, что до сих пор ни одно иммунотерапевтическое средство не получило одобрения регулирующих органов для лечения больных раком яичников.



Независимой биологической характеристикой является пространственное расположение клеток опухолево-иммунной среды. Оказалось, что опухоли с иммунными инфильтратами одинакового размера могут иметь различную пространственную организацию. В нашем исследовании помимо оценки степени инфильтрации методом проточной цитометрии проведено морфологическое изучение образцов ткани с помощью полуколичественной гистологической оценки. Показано, что пространственное расположение не зависит от числа ТИЛ.

В исследовании Leeat Keren с соавторами было показано, что общая выживаемость пациенток с компартиментированным (разделенным) типом опухолей, при которых иммунные клетки пространственно отделены от опухолевых клеток, имеют достоверно выше общую выживаемость в сравнении с пациентками со смешанным типом опухолей, где иммунные клетки диффузно смешаны с опухолевыми клетками (HR=4,97; P=0,03). Это свидетельствует о том, что на клинический исход влияет иммунное микроокружение опухоли и подчеркивает клиническую важность иммунной системы даже в неиммунотерапевтических условиях [18]. Выявленные особенности пространственного расположения ТИЛ пока не позволяют нам дать оценку их клинического значения ввиду небольшого периода наблюдения пациенток.

Структура иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, изучалась с помощью многопараметрового количественного метода проточной цитометрии. Для этого исследовался фенотипический профиль не менее 5000 CD45+ ТИЛ, обеспечивая высокую точность объективного подсчета даже минорных и/или резидуальных клеток.

Популяции клеток врожденного иммунитета (NK-клетки) преобладали в структуре ТИЛ у пациенток с низкой степенью инфильтрации, что указывает на неспецифические иммунные реакции. Проведенный корреляционный анализ выявил значимую обратную зависимость количества NK-клеток от степени инфильтрации ТИЛ ( $r = -0,5117$ ).

При высоком содержании в ткани ТИЛ отмечается увеличение числа CD3+Т-лимфоцитов. Такая же тенденция характерна для субпопуля-

ции CD3+CD4+ клеток, но не для CD3+CD8+ лимфоцитов, число которых не зависело от степени инфильтрации ТИЛ. О положительной роли инфильтрирующих опухоль CD4+ лимфоцитов, их ассоциации с лучшей выживаемостью без прогрессирования и общей выживаемостью при раке яичников указывают зарубежные авторы [19, 20, 21].

Когортное исследование, включающее более чем 5500 пациенток, показало улучшение выживаемости с увеличением количества CD8+ ТИЛ и констатирует, что степень инфильтрации опухолевой ткани CD8+ лимфоцитами является прогностическим критерием, и понимание факторов, приводящих к инфильтрации, будет ключом к разгадке гетерогенности результатов при раке яичников [22].

Интересным оказался тот факт, что при низкой инфильтрации регуляторное звено представлено NKT-клетками с фенотипом CD3+ CD16+CD56+, а с увеличением степени инфильтрации увеличивался уровень Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4+CD279(PD1)+. Ранее нами показано, что увеличение числа NKT-клеток на системном уровне является критерием раннего прогрессирования у пациенток диссеминированной меланомой [23]. И в целом наличие Т-регуляторных клеток в микроокружении опухоли при различных формах злокачественных новообразований, включая рак яичников, является серьезным препятствием для генерации эффективного противоопухолевого иммунного ответа.

### Заключение

Лимфоидное микроокружение при раке яичников характеризуется следующими параметрами:

- 1) низкая степень инфильтрации опухоли лимфоцитами (ТИЛ);
- 2) пространственное расположение лимфоцитов не зависит от степени инфильтрации ТИЛ;
- 3) для структуры ТИЛ — показана прямая значимая корреляция степени инфильтрации лимфоцитами и Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4+CD279 (PD1)+ ( $r = 0,5975$ ) и обратная корреляция с уровнем NK-клеток ( $r = -0,5117$ ).

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Hennessy B.T., Coleman R.L., Markman M.* Ovarian Cancer // *Lancet*. 2009. 374(9698). P. 1371–82. doi: 10.1016/s0140-6736(09)61338-6.
2. *Mirza M.R., Coleman R.L., González-Martín A., Moore K.N., Colombo N., Ray-Coquard I., et al.* The Forefront of Ovarian Cancer Therapy: Update on PARP Inhibitors // *Ann. Oncol.* 2020. Vol. 31 (9). P. 1148–59. doi: 10.1016/j.annonc.2020.06.004.
3. *De Angelis R., Sant M., Coleman M.P., Francisci S., Baili P., Pierannunzio D., et al.* Cancer Survival in Europe 1999–2007 by Country and Age: Results of EURO CARE–5-A Population-Based Study // *Lancet Oncol.* 2014. Vol. 15(1). P. 23–34. doi: 10.1016/s1470-2045(13)70546-14.
4. *Bogani G., Lopez S., Mantiello M., Ducceschi M., Bosio S., Ruisi S., et al.* Immunotherapy for Platinum-Resistant Ovarian Cancer // *Gynecol. Oncol.* 2020. Vol. 158 (2). P. 484–8. doi: 10.1016/j.ygyno.2020.05.681.
5. *Drakes M.L., Stiff P.J.* Regulation of Ovarian Cancer Prognosis by Immune Cells in the Tumor Microenvironment // *Cancers*. 2018. Vol. 10 (9). P. 302. doi: 10.3390/cancers10090302.
6. *Eleonora Ghisoni, Martina Imbimbo, Stefan Zimmermann and Giorgio Valabrega.* Ovarian Cancer Immunotherapy: Turning up the Heat // *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20(12). P. 2927. doi: 10.3390/ijms20122927.
7. *Zhang L., Conejo-Garcia J.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer // *N Engl J Med* [Internet]. 2003. [cited 2015 Jan 6]; 348:203–13. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa020177>; PMID:12529460; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa020177>
8. *Sato E., Olson S.H., Ahn J., Bundy B., Nishikawa H., Qian F., Jungbluth A., Frosina D., Gnjatic S., Ambrosone C., et al.* Intraepithelial CD8C tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8C/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. (102). P. 18538–43; PMID:16344461; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0509182102>.
9. *Hwang W.-T.W., Adams S.S.F., Tahirovic E., Hagemann I.S., Coukos G.* Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis // *Gynecol Oncol* [Internet] 2012 [cited 2015 Jan 6]; 124:192–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090825811008092>; PMID:22040834; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.09.039>
10. *Federica Zito Marino, Paolo Antonio Ascierto, Giulio Rossi et al.* Are tumor-infiltrating lymphocytes protagonists or background actors in patient selection for cancer immunotherapy? // *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2017. Vol. 17 (6). P. 735–746. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1309387>.
11. *Hanne Locy, Sven de Mey, Wout de Mey, Mark De Ridder, Kris Thielemans and Sarah K. Maenhout.* Immunomodulation of the Tumor Microenvironment: Turn Foe Into Friend // *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, Article 2909 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02909>
12. *Pogge von Strandmann E., Reinartz S., Wager U., Müller R.* Tumor-Host Cell Interactions in Ovarian Cancer: Pathways to Therapy Failure // *Trends Cancer*. 2017. Vol. 3(2). P. 137–48. doi: 10.1016/j.trecan.2016.12.005.
13. *Martina M. Sykora, Markus Reschke.* Immunophenotyping of Tissue Samples Using Multicolor Flow Cytometry // *Methods Mol Biol.* 2019. (1953). P. 253–268. doi: 10.1007/978-1-4939-9145-7\_16.
14. *Ilenia Pacella, Alfonso Grimaldi, Silvia Piconese* Assessment of lipid load in tumor-infiltrating Tregs by flow cytometry // *Methods Enzymol.* 2020. (632). P. 283–294. doi: 10.1016/bs.mie.2019.07.024.
15. *Florian Wiede, Tony Tiganis* Isolation and Characterization of Mouse Intrahepatic Lymphocytes by Flow Cytometry // *Methods Mol Biol.* 2018. (1725). P. 301–311. doi: 10.1007/978-1-4939-7568-6\_23.
16. *Karolina Woroniecka, Pakawat Chongsathidkiet, Aladine Elsamadicy, Harrison Farber, Xiuyu Cui, Peter E. Fecci.* Flow Cytometric Identification of Tumor-Infiltrating Lymphocytes from Glioblastoma // *Methods Mol Biol.* 2018. (1741). P. 221–226. doi: 10.1007/978-1-4939-7659-1\_18.
17. *Jérôme Galon, Daniela Bruni.* Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies // *Nature Reviews Drug DISCOvery*. 2019. Vol. 18. P.197–218
18. *Leeat Keren, Marc Bosse, Diana Marquez et al.* A Structured Tumor-Immune Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer Revealed by Multiplexed Ion Beam Imaging // *Cell*. 2018. Vol. 174(6). P. 1373–1387. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.039.
19. *Mauricio P. Pinto, Carlos Balmaceda, Maria L. Bravo et al.* Patient inflammatory status and CD4+/CD8+ intraepithelial tumor lymphocyte infiltration are predictors of outcomes in high-grade serous ovarian cancer // *Gynecologic Oncology*. 2018. Vol. 151. (1). P. 10–17 <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.07.025>
20. *Santoiemma P.P., Powell D.J.* Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer // *Cancer Biol. Ther.* 2015. (16). P. 807–820. doi: 10.1080/15384047.2015.1040960

21. *Weimin Wang, Weiping Zou, J. Rebecca Liu.* Tumor-infiltrating T cells in epithelial ovarian cancer: predictors of prognosis and biological basis of immunotherapy // *Gynecol Oncol.* 2018. Vol. 151(1). P. 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.09.005>
22. Ovarian Tumor Tissue Analysis (OTTA) Consortium // *JAMA Oncol.* 2017. Vol. 3. (12). P. 173290. doi:10.1001/jamaoncol.2017.3290
23. *Борунова А.А., Чадауа Г.З., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г., Короткова О.В., Черткова А.И., Табаков Д.В., Захарова Е.Н., Шоуа Э.К., Петенко Н.Н., Демидов Л.В., Михайлова И.Н.* Увеличение количества НКТ-клеток — маркер раннего прогрессирования при адьювантной вакцинотерапии пациентов с метастатической меланомой кожи. *Российский Биотерапевтический журнал.* 2019; Т. 18; 4; 82–89.

### АВТОРЫ

*Заботина Татьяна Николаевна*, заведующий отделом клинично-лабораторной диагностики НИИ КО им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор биологических наук, Москва, [tatzabotina@yandex.ru](mailto: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 «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, [tatzabotina@yandex.ru](mailto:tatzabotina@yandex.ru), SPIN-code: 8628–9705, <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

*Захарова Елена Николаевна*, научный сотрудник Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидат медицинских наук, Москва, [zakharovaen@yandex.ru](mailto:zakharovaen@yandex.ru), SPIN-код: 9334–0459, <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>

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

*Борунова Анна Анатольевна*, старший научный сотрудник Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидат медицинских наук, Москва, [a-borunova@yandex.ru](mailto:a-borunova@yandex.ru), SPIN-код: 1865–1417, <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>

*Borunova Anna A.*, Research Associate of FSBI «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, [a-borunova@yandex.ru](mailto:a-borunova@yandex.ru), SPIN-код: 1865–1417, <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>

*Козлов Николай Александрович*, врач-патологоанатом Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидат медицинских наук, Москва, [newbox13@mail.ru](mailto:newbox13@mail.ru), SPIN-код: 1847–6530, <https://orcid.org/0000-0003-3852-3969>

*Kozlov Nikolay A.*, PhD, pathologist of FSBI «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, [newbox13@mail.ru](mailto:newbox13@mail.ru), SPIN-код: 1847–6530, <https://orcid.org/0000-0003-3852-3969>

*Шевчук Алексей Сергеевич*, заведующий отделением Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидат медицинских наук, Москва, [oncogyn@live.ru](mailto:oncogyn@live.ru), SPIN-код: 9125–1811 <https://orcid.org/0000-0002-9259-4525>

*Shevchuk Aleksei S.*, PhD, head of Gynecologic oncology department of FSBI «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, [oncogyn@live.ru](mailto:oncogyn@live.ru), SPIN-код: 9125–1811 <https://orcid.org/0000-0002-9259-4525>

*Паниченко Игорь Валерианович*, научный сотрудник Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, Москва, [igorronc@mail.ru](mailto:igorronc@mail.ru), SPIN-код: 7274–4997, <https://orcid.org/0000-0002-8467-6942>

*Panichenko Igor V.*, PhD, Research Associate of FSBI «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, [igorronc@mail.ru](mailto:igorronc@mail.ru), SPIN-код: 7274–4997, <https://orcid.org/0000-0002-8467-6942>