Н.О. Верьовкіна
Л.А. Сивак
М.С. Кротевич

Національний інститут раку МОЗ України, Київ, Україна

Ключові слова: *рак молочної залози, пухлино-інфільтруючі лімфоцити, хіміотерапія.*

ЛІМФОЇДНА ІНФІЛЬТРАЦІЯ ТА ЇЇ ВПЛИВ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ПЕРЕДОПЕРАЦІЙНОЇ ХІМІОТЕРАПІЇ ПРИ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПАХ МІСЦЕВО-ПОШИРЕНОГО РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Мета: *визначити особливості лімфоїдного інфільтрату в тканині пухлини та його вплив на ефективність неоад'ювантної хіміотерапії при різних молекулярних підтипах місцево-поширеного раку молочної залози (РМЗ).* ***Об'єкт і методи****: досліджували операційний матеріал 62 хворих на місцево-поширений РМЗ T1–3N0–3M0 стадії. Ступінь лікувального патоморфозу та обсяг лімфоїдної інфільтрації (ЛІ) оцінювали в препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином. Виявлення біомолекулярних маркерів здійснювали на депарафінізованих зрізах пухлин молочної залози імуногістохімічним методом.* ***Результати****: встановлено, що V ступінь лікувального патоморфозу (повна патоморфологічна відповідь) за класифікацією Miller — Раупе був у 2 (3,3%) пацієнток, IV — у 7 (11,3%), III — у 50 (80,6%), II — у 3 (4,8%) хворих, I ступеня лікувального патоморфозу не зафіксовано у жодної пацієнтки. Виявлено, що низький (+) рівень ЛІ спостерігався у 20 (32,25%) пацієнток, помірний (++) — у 22 (35,5%) та значний (+++) — у 20 (32,25%) хворих. Встановлено, що обсяг ЛІ та особливості фенотипу субпопуляцій лімфоцитів, які його утворюють, відрізнялися при різних молекулярних підтипах РМЗ (p = 0,01). Неоад'ювантна хіміотерапія була достовірно ефективнішою у пацієнток зі значним (+++) рівнем ЛІ.* ***Висновок:*** *необхідне подальше вивчення предиктивного та прогностичного значення параметрів ЛІ при різних молекулярних підтипах РМЗ з метою включення їх у діагностичні та терапевтичні алгоритми при цьому захворюванні.*

ВСТУП

Припущення щодо ролі порушень системи імунного захисту в патогенезі пухлинної прогресії стали формуватися одночасно із зародженням імунології. Ще на початку 1900-х років P. Ehrlich був, мабуть, одним із перших вчених, який висунув гіпотезу про те, що розповсюдженість раку в організмів, які живуть довго, була б значно вищою, якби не захисна роль імунної системи. Проте в той час так мало було відомо про будову та функції останньої, що значущість цього припущення залишилася неоціненою. Пройде більше п'ятдесяти років, поки ідея імунного контролю в розвитку злоякісних новоутворень знову зацікавить дослідників завдяки більш глибокому розумінню функціонування імунної системи в поєднанні з доказами існування пухлинних антигенів. Формування імунологічної теорії раку прийнято пов'язувати з F. Burnet і L. Thomas, які опублікували фундаментальні роботи на цю тему наприкінці 1950-х років [1]. Відповідно до сучасної теорії канцерогенезу загальновизнаним є положення про те, що одні лише пухлинні клітини (ПК) не маніфестують онкологічне захворювання. Вони «змушують» нормальні клітини організму, як ті, що містяться в органі або тканині, в якому формується пухлина, так і клітини інших органів і тканин, «працювати» на себе [2–4].

Рак молочної залози (РМЗ) є найбільш поширеним типом раку і найбільш частою причиною смерті від злоякісних новоутворень серед жінок у всьому світі. Згідно з даними Міжнародної агенції з дослідження раку (International Agency for Research on Cancer), опублікованими у 2014 р., протягом 2012 р. було зареєстровано більше 1,6 млн нових випадків і 520 тис. смертей від РМЗ [5]. За даними Національного канцер-реєстру України, щорічний приріст цього захворювання перевищує 2%. Так, у 2014 р. в Україні зареєстровано 13 744 нові випадки хвороби, а загальна кількість померлих від РМЗ

жінок становила 5926. Серед причин смерті у жінок питома вага РМЗ найбільша і становить 20,1% [6]. Незважаючи на успіхи в лікуванні при цьому захворюванні, за результатами метааналізу Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group у 20–30% пацієнтів із ранніми стадіями РМЗ виникне рецидив із віддаленим метастазуванням [7].

Підвищення ефективності протипухлинного лікування залишається одним з найбільш актуальних завдань сучасної онкології. Включення цитостатиків в схеми комбінованої протипухлинної терапії проводиться з метою досягнення максимальної циторедукції первинної пухлини та/або метастатичних вогнищ шляхом індукції апоптозу, некрозу або блокування неконтрольованої проліферації [8]. Необхідно відзначити, що сучасні терапевтичні стратегії, спрямовані на максимальне видалення ПК, пов'язані з високим ризиком серйозних побічних ефектів для пацієнта, при цьому розвиток резистентності ПК, які вижили, фактично забезпечує неможливість досягнення повної регресії [9–13]. При проведенні неоад'ювантної поліхіміотерапії (НАПХТ) з використанням цитостатиків і таргетних препаратів при лікуванні РМЗ, навіть у випадках повної патологічної регресії (залежно від локалізації процесу, застосованих режимів терапії та тривалості спостереження), у 10–40% випадків наступав рецидив захворювання [14, 15]. Вивчення цих питань у великій кількості фундаментальних та клінічних досліджень у галузі онкології, імунології, молекулярної біології сприяло розумінню того, що при проведенні специфічного лікування значну роль у процесі циторедукції відіграють власні протипухлинні механізми організму і, перш за все, імунна система. Клітини, що належать як до системи вродженого, так і набутого імунітету (макрофаги, природні кілери, різні субпопуляції Т-клітин), активно залучаються до зростаючої пухлини, починаючи з найбільш ранніх етапів її розвитку. На сьогодні в доступній літературі активно обговорюються роль імунної системи та механізми дії імунних клітин не тільки у канцерогенезі, а й у визначенні ефективності цитостатичної та таргетної терапії при різних видах солідних пухлин [9, 16–21]. До останнього часу РМЗ не розглядався як типова імуногенна пухлина. Але багатьма дослідниками переконливо доведена роль імунної системи в процесах виникнення та прогресування РМЗ, а також показаний кореляційний зв'язок між інфільтрацією тканини пухлини імунокомпетентними клітинами (пухлино-інфільтруючі лімфоцити — ПІЛ) та відповіддю на НАПХТ і виживаністю [22–26]. Актуальними на сьогодні є роботи, присвячені ролі окремих підтипів лімфоїдних клітин, які входять до складу імунного інфільтрату, а також його варіації (низький, середній та високий ступінь ПІЛ) при різних молекулярних підтипах РМЗ. Більш детальне розуміння параметрів імунного мікрооточення пухлини, а також введення в клінічну практику методів якісного та кількісного їх визначення дозволять виділити групу пацієнтів, що потребують менш токсичної терапії, а також здійснити відбір хворих для застосування нових видів лікування (імунотерапія) та поєднувати їх із класичними методами (променева терапія, хіміотерапія (ХТ) та ін.).

З урахуванням вищенаведеного мета дослідження полягала у вивченні особливостей імунного інфільтрату в тканині пухлини та його впливу на ефективність НАПХТ при різних молекулярних підтипах місцево-поширеного РМЗ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У статтю включено результати дослідження операційного матеріалу від 62 хворих (віком 29–69 років) на РМЗ Т1–3N0–3M0 стадії, які були обстежені та одержали передопераційну ХТ за схемою FAC згідно зі стандартами (циклофосфамід 500 мг/м², доксорубіцин 50 мг/м², флуороурацил 500 мг/м² у 1-й день) у відділенні хіміотерапії солідних пухлин Національного інституту раку МОЗ України. Оцінку відповіді пухлини (за критеріями RECIST 2.0) проводили після кожних двох курсів ХТ. Обсяг операції відповідав радикальній резекції або радикальній мастектомії. Усі пацієнтки дали інформовану згоду на використання їх біологічного матеріалу в дослідницьких цілях.

Морфологічне дослідження післяопераційного матеріалу проводили за стандартною методикою, забарвлювали гематоксиліном та еозином. Оцінку лікувального патоморфозу виконували на основі визначення об'єму життєздатної залишкової пухлинної тканини (ОЖЗПТ; за класифікацією Miller — Payne), наявності раку *in situ*, а також кількості та розмірів уражених лімфатичних вузлів (ЛВ). Інфільтрацію пухлинної тканини імунокомпетентними клітинами (лімфоїдну інфільтрацію — ЛІ) оцінювали в препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, аналізували у 10 полях зору (ПЗ) та визначали у відсотках із такими градаціями: відсутня або слабовиражена (+) — < 10%, помірна (++) — 10–50%, значно виражена (+++) — > 50%.

Імуногістохімічне (ІГХ) виявлення біомолекулярних маркерів здійснювали на депарафінізованих зрізах пухлин з використанням МкАТ: до рецепторів естрогенів (estrogen receptor (ER) α — Dako IS657 Monoclonal Mouse Anti-Human, Clone 1D5) та прогестерону (progesterone receptor (PR) — Dako IS068 Monoclonal Mouse Anti-Human, Clone PgR 636), до c-erbB-2 (DBS DS-PDR003-A Rabbit Polyclonal Antibody to Human); маркера проліферуючих клітин Ki-67 (Dako IS626, Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1). Оцінювали вміст у ЛІ лімфоцитів (Лц) FOXP3$^+$ (FOXP3, клон 5H5L12, «Invitrogen», США), CD4$^+$ та CD8$^+$ (MoHu anti CD4 T-Cell, Clone MT310, MoHu anti-CD8, T-Cell, Clone C8/144B, «Dako», Данія). Для

детекції зазначених білків застосовували систему візуалізації з використанням EnVisionTM FLEX («Dako», Данія). Результати ІГХ реакції оцінювали напівкількісним методом шляхом підрахунку позитивно забарвлених клітин — індекс мітки (ІМ) у відсотках. Експресію маркерів визначали при вивченні 1000 ПК, кількість FOXP3$^+$-, CD4$^+$- та CD8$^+$-Лц аналізували у 10 ПЗ та виражали у відсотках. Морфологічні та ІГХ дослідження проводили у патологоанатомічному відділенні Національного інституту раку МОЗ України.

Обробку отриманих даних виконували з використанням пакета програм «Statistica10.0». Для оцінки розподілу варіант використовували ANOVA, для проведення кореляційного аналізу та виявлення різниці між змінними — *t*-критерій Стьюдента, критерій χ^2 та методи логістичної регресії. Статистично значущими вважали дані з достовірністю різниці при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Клінічну характеристику пацієнток, включених у дослідження, наведено в таблиці. Більш ніж у половини хворих (69,3%) виявлено експресію в ПК ER та PR, майже у третини пацієнток (30,6%) ПК не експресували рецептори зазначених гормонів. Після закінчення передопераційної ХТ часткову відповідь пухлини на лікування зафіксовано у 31 (50,0%), стабілізацію процесу — у 28 (45,0%), прогресування захворювання — у 3 (4,9%) хворих. При проведенні патогістологічного дослідження операційного матеріалу тільки у третини (32,2%) пацієнток не були уражені аксилярні ЛВ, тоді як у більшості (67,8%) хворих виявлено метастази у регіонарних ЛВ. При оцінці лікувального патоморфозу за класифікацією Miller — Payne V ступінь (повна патоморфологічна відповідь) встановлено лише у 2 (3,3%), IV — у 7 (11,3%), III — у 50 (80,6%), II — у 3 (4,8%) пухлинах. Першого ступеня лікувального патоморфозу не виявлено у жодному випадку. У 20 (32,25%) пацієнток зареєстровано значно виражену інфільтрацію пухлини Лц, у 22 (35,5%) — помірну та у 20 (32,25%) — слабковиражену ЛІ.

Таблиця

Характеристика пацієнток, включених у дослідження

Показник	Кількість пацієнток, n (%)
Кількість пацієнток	62 (100,0)
Середній вік, років	49 ± 20 (29–69)
Рецепторний статус: ER$^+$PR$^\pm$ ER$^-$PR$^-$	 43 (69,3) 19 (30,6)
Аксилярні ЛВ: відсутність метастазів (N0) наявність метастазів (N1–3)	 20 (32,2) 42 (67,8)
ЛІ пухлинної тканини: + відсутня бо слабковиражена ++ помірно виражена +++ значно виражена	 20 (32,25) 22 (35,5) 20 (32,25)
Відповідь пухлини на ХТ: часткова відповідь стабілізація процесу прогресування	 31 (50,0) 28 (45,1) 3 (4,9)

При вивченні особливостей лімфогенного метастазування місцево-поширеного РМЗ та специфіки локального інфільтрату з імунокомпетентних клітин у пацієнток без метастазів в аксилярні ЛВ та низьким (+) ступенем ЛІ достовірно частіше виявляли пухлини з низькою проліферативною активністю (за експресією Ki-67) порівняно з пухлинами із середнім (++) ступенем ЛІ ($p = 0,04$). У групі пацієнток із метастатичним ураженням аксилярних ЛВ переважали ($p < 0,001$) пухлини з високим проліферативним індексом та відсутністю експресії рецепторів стероїдних гормонів. Індекс проліферативної активності був достовірно вищим у пухлинах з вираженою (+++) ЛІ порівняно з пухлинами з відсутньою або слабковираженою (+) ЛІ ($p < 0,001$).

На сьогодні кількість ПІЛ можна розглядати як незалежний, достовірний прогностичний та предиктивний біомаркер, який доцільно включати в діагностичний алгоритм при РМЗ. Так, C. Denkert та співавтори [22] оцінювали значимість ПІЛ у якості незалежного фактора, який прогнозує відповідь пухлини на НАПХТ при РМЗ. У цьому ретроспективному дослідженні вивчали ЛІ строми пухлини за матеріалами двох клінічних досліджень неоад'ювантних режимів ХТ на основі антрациклінів та таксанів GeparDuo (NCT00793377) і GeparTrio (NCT00544765). Кінцевою точкою дослідження GeparTrio була оцінка рівня патоморфологічної регресії. Автори виділили підгрупу хворих на РМЗ, якій притаманні значна ЛІ пухлини (лімфоцит-предомінантний підтип РМЗ — lymphphocyte-predominant breast cancer — LPBC), а також сильно виражена відповідь на передопераційну ХТ. На основі даних рандомізованого дослідження BIG 02–98 [23] вивчено взаємозв'язок між ступенем і локалізацією ЛІ та наслідком захворювання у 2009 пацієнток із РМЗ з ураженням аксилярних ЛВ. Кінцевими точками були загальна і безрецидивна виживаність та взаємозв'язок з видом ХТ. Медіана спостереження — 8 років. Показано, що підвищення як внутрішньопухлинної, так і стромальної ЛІ на кожні 10% при тричі негативному РМЗ асоційовано зі зниженням ризику рецидиву на 17 та 15% відповідно. Відмічено зниження ризику смерті від РМЗ при тричі негативному підтипі пухлини на 27 та 17% відповідно при збільшенні на кожні 10% внутрішньопухлинної та стромальної інфільтрації.

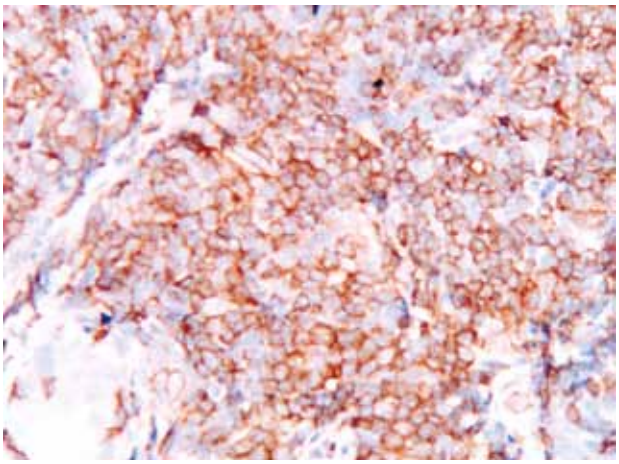
Рівень ЛІ не єдиний чинник, який модулює перебіг захворювання та впливає на кінцевий результат лікування. Фенотип Лц, які входять до складу імунного інфільтрату, їх співвідношення та динаміка в процесі лікування роблять вагомий внесок у кінцевий результат. Розвиток імунної реакції I типу характеризується проліферацією CD8$^+$ Т-клітин, необхідних для знищення пухлини. Відбувається активація CD4$^+$ Т-хелперів I типу (Tx1). Вони секретують низку цитокінів (фактор некрозу

пухлини, інтерферон-γ та ін.), необхідних для презентації антигену CD8+ Т-клітинам, які безпосередньо реалізують цитотоксичний вплив. При розвитку імунної реакції II типу відбуваються активація CD4+ Т-хелперів — індукторів II типу (Тх2) та секреція ними інтерлейкінів-5 та -6, які підтримують проліферацію В-Лц і розвиток гуморальної імунної відповіді. На сьогодні роль В-Лц менш чітко визначена, особливо з урахуванням того факту, що ці клітини притаманні імуносупресивному мікрооточенню, яке стимулює пухлинний ріст [1, 3, 4, 17, 18]. До складу лімфоцитарного інфільтрату також входить субпопуляція Т-регуляторних CD4+ клітин (Т-рег), фізіологічна роль яких полягає у пригніченні надмірної імунної реакції та запобіганні аутоімунному пошкодженню нормальних тканин. CD4+ Т-рег характеризуються вираженою експресією білка FOXP3 (forkhead box protein 3). Роль цих клітин не така однозначна, як CD8+ Т-Лц. Ступінь інфільтрації пухлини FOXP3+ клітинами мав позитивну кореляцію з підвищенням ступеня злоякісності, відсутністю експресії ER, експресією онкобілка HER2 та асоціювався з несприятливим прогнозом РМЗ [21]. Таким чином, доведено прогностичну/предиктивну роль ПІЛ при лімфоцит-предомінантному підтипі РМЗ. Роль помірної та слабковираженої ЛІ чітко не визначена. Прогностичне значення різних субпопуляцій мононуклеарів при різноманітних молекулярних підтипах РМЗ потребує подальшого вивчення [27].

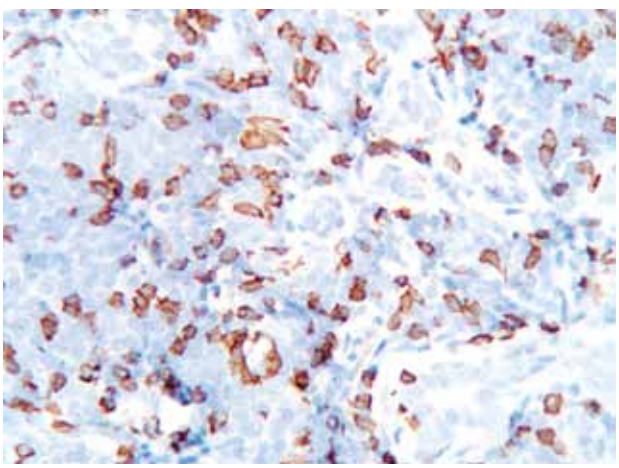
Результати ІГХ дослідження післяопераційного матеріалу засвідчили, що у пацієнток із метастазами у регіонарних ЛВ за відсутності експресії ER та PR кількість CD4+- та CD8+-Лц в імунному інфільтраті була достовірно більшою (p = 0,01) порівняно з люмінальними типами РМЗ. Середній обсяг CD4+-Лц в групі ER–PR– пухлин становив 21,5% порівняно з 3,9% при ER+PR+ пухлинах (p = 0,01). Середня кількість CD8+-Лц в групі ER–PR– пухлин становила 34,1% порівняно з 15,2% при ER+PR+ пухлинах (p = 0,01) (рис. 1).

У пацієнток з місцево-поширеним РМЗ, незалежно від молекулярного підтипу та статусу регіонарних ЛВ, виявлено прямий кореляційний зв'язок проліферативної активності ПК з рівнями CD4+- та CD8+-Лц. З підвищенням індексу Ki-67 зростала кількість CD4+- (r = 0,38; p = 0,007) та CD8+-Лц (r = 0,31; p = 0,02) (рис. 2). Також виявлено прямий кореляційний зв'язок між різними субпопуляціями лімфоїдних клітин, які формують інфільтрат. Так, при збільшенні кількості CD4+-Лц зростала і кількість CD8+-Лц (r = 0,31; p = 0,03), а збільшення кількості FOXP3+-Лц асоціювалося з підвищенням вмісту CD4+-клітин (r = 0,6; p < 0,001).

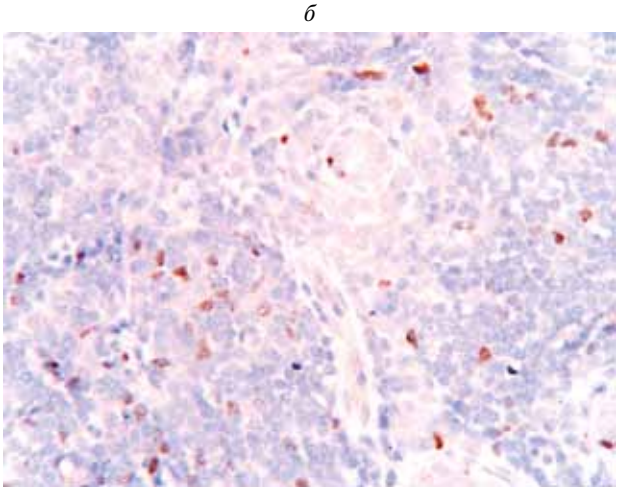
У пацієнток із пухлинами без експресії рецепторів стероїдних гормонів із значно вираженою (+++) ЛІ відсоток CD8+-Лц був достовірно вищим порівняно з пухлинами з помірною (++) ЛІ (p = 0,02). У хворих з люмінальними типами РМЗ



а



б



в

Рис. 1. Експресія антигенів CD4 (*а*), CD8 (*б*), FOXP3 (*в*) в ПІЛ низькодиференційованої (G3) карциноми молочної залози. ІГХ метод, × 400

таких відмінностей не виявлено. Крім того, ми показали, що рівень ЛІ достовірно впливав на ефективність передопераційної ХТ незалежно від розміру первинної пухлини, ураження ЛВ, гістологічного типу інфільтративного протокового раку, індексу проліферативної активності (Ki-67), негативного рецепторного статусу стероїдних гормонів у пухлині (рис. 3).

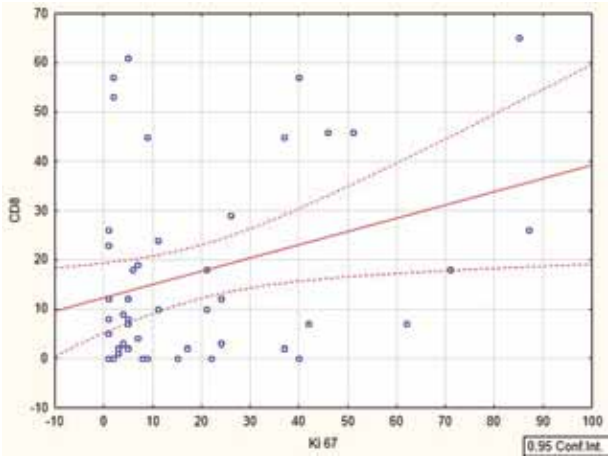


Рис. 2. Зростання кількості $CD8^+$-Лц при підвищенні індексу Ki-67 (r = 0,31; p = 0,02)

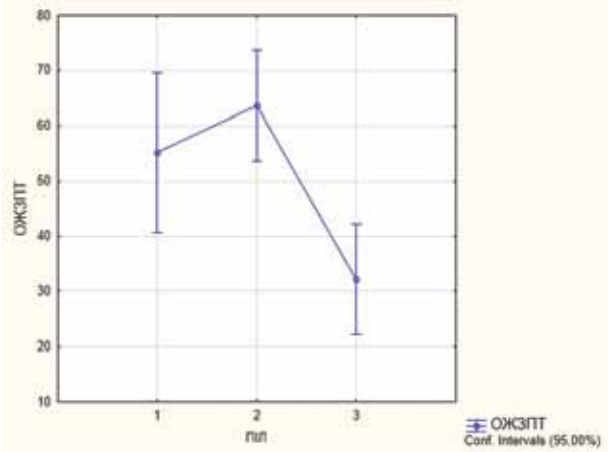


Рис. 3. Вплив ПІЛ на рівень ОЖЗПТ

При більш детальному аналізі встановлено, що у групі хворих на РМЗ без експресії стероїдних гормонів відповідь на НАПХТ була кращою при значному (+++) ступені ЛІ порівняно з пухлинами із середньою (++) (p = 0,002) та низькою (+) ЛІ (p = 0,008). При пухлинах люмінального типу ступінь патоморфозу статистично достовірно відрізнявся тільки в групах зі значною та слабкою ЛІ. ОЖЗПТ був достовірно меншим за наявності вираженої (+++) ЛІ порівняно з групою з відсутньою або низькою (+) ЛІ (p = 0,01) (див. рис. 3).

За результатами наших досліджень із використанням методів логістичної регресії проаналізовано вплив різноманітних факторів, притаманних як самій пухлині, так і її мікрооточенню, на ефективність передопераційної ХТ, а саме на ОЖЗПТ; побудована регресійна модель такого виду:

ОЖЗПТ = 50,82 — 0,794 ($CD4^+$) + 0,28 Ki-67.

За допомогою бета коефіцієнтів встановлено, що внесок інфільтруючих пухлину $CD4^+$-Лц у зміни ОЖЗПТ становить 72%. Модель є адекватною (F = 3,2; p < 0,05).

Отримані результати свідчать про важливість детального вивчення параметрів імунного мікрооточення пухлини. Введення в клінічну практику методів якісного та кількісного визначення таких параметрів дозволить виділити групу пацієнтів, що потребують менш токсичної терапії. Це дасть можливість визначити хворих, яким показане застосування нових видів лікування, таких як імунотерапія та її поєднання з класичними методами протипухлинної терапії.

ВИСНОВКИ

1. Величина ЛІ та особливості фенотипу субпопуляцій Лц, які його утворюють, відрізняються при різних молекулярних підтипах РМЗ.

2. У хворих на РМЗ без експресії стероїдних гормонів патоморфологічні прояви відповіді на НАПХТ були кращими при значному (+++) ступені ЛІ порівняно з пухлинами з середнім (++) (p = 0,002) та низьким ступенем (+) ЛІ (p = 0,008).

3. При пухлинах люмінального підтипу ОЖЗПТ був достовірно меншим за наявності вираженої (+++) ЛІ порівняно з пухлинами з відсутньою або низькою (+) ЛІ (p = 0,01).

4. НАПХТ була достовірно ефективнішою у пацієнток з вираженою ЛІ.

5. Необхідне подальше вивчення предиктивного та прогностичного значення параметрів ЛІ при різних молекулярних підтипах РМЗ з метою включення їх у діагностичні та терапевтичні алгоритми при цьому захворюванні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Schreiber RD, Old LJ.** Cancer immunoediting: intergrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science 2011; **331**: 1565–70.

2. **Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. Cell 2000; **100**: 57–70.

3. **Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of Cancer: The Next Generation Cell 2011; **144** (5): 646–74.

4. **Осинский СП.** Микроокружение опухолевых клеток и опухолевая прогрессия. Здоров'я України 2012: 34–35.

5. **Forman D, Ferlay J.** The global and regional burden of cancer. In: *Stewart BW, Wild CP*, eds. World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer, 2014: 64–185.

6. Рак в Україні, 2014–2015. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл Нац канцер-реєстру України, 2016; (17): 46–7.

7. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet 2005; **365**: 1687–717.

8. **Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G.** Immunological aspects of cancer chemotherapy. Nat Rev Immunol 2008; **8**: 59–73.

9. **Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G.** Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. Nat Rev Clin Oncol 2011; **8**: 151–60.

10. **Andre F, Dieci M, Dubsky P, *et al.*** Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer. Clin Cancer Res 2012; **19** (1): 28–33.

11. **Denkert C, Darb-Esfahani S, Loibl S, *et al.*** Anti-cancer immune response mechanisms in neoadjuvant and targeted therapy. Semin Immunopathol 2011; **33**: 341–51.

12. **Имянитов ЕН.** Спорные аспекты фундаментальной онкологии. Практ онкол 2014; **15** (2): 49–60.

13. **Bhatia S, Frangioni JV, Hoffman RM, *et al.*** The challenges posed by cancer heterogeneity. Nat Biotechnol 2012; **30** (7): 604–10.

14. **de Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, *et al.*** Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. Lancet Oncol 2014; **15** (10): 1137–46.

15. **Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, *et al.*** NeoALTTO Study Team: Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. Lancet 2012; **379** (9816): 633–40.

16. **De Nardo D, Brennan D, Rexhepaj E, *et al.*** Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. Cancer Discovery 2011; **1** (1): 54–67.

17. **Fang H, DeClerck YA.** Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. Cancer Res 2013; **73** (16): 4965–77.

18. **Ming-Ju Tsai, Wei-An Chang, Ming-Shyan Huang, Po-Lin Kuo.** Tumor microenvironment: a new treatment target for cancer. ISRN Biochemistry 2014; **2014**. 8 p.

19. **Кжышковская ЮГ, Чердынцева НВ.** Иммунная система и эффективность противоопухолевого лечения. Томск: Изд-во ТГУ, 2015. 164 с.

20. **Kroemer G, Senovilla L, Galluzzi L, *et al.*** Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. Nat Med 2015; **21** (10): 1128–35.

21. **Stanton SE, Adams S, Disis ML.** Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes a systematic review. JAMA Oncol 2016; **2** (10): 1354–60.

22. **Denkert C, Loibl S, Noske A, *et al.*** Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. J Clin Oncol 2010; **28** (1): 105–13.

23. **Loi S, Sirtaine N, Piette F, *et al.*** Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of Docetaxel to Doxorubicin with Doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02–98. J Clin Oncol 2013; **31** (7): 860–7.

24. **Loi S, Michiels S, Salgado R, *et al.*** Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. Ann Oncol 2014; **25** (8): 1544–50.

25. **Ali HR, Provenzano E, Dawson S-J, *et al.*** Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. Ann Oncol 2014; **25** (8): 1536–43.

26. **Ruffell B, Au A, Rugo HS, *et al.*** Leukocyte composition of human breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2012; **109**: 2796–801.

27. **Liu S, Foulkes WD, Leung S, *et al.*** Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. Breast Cancer Res 2014; **16** (5): 432.

TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES AND THEIR IMPACT ON THE EFFECTIVENESS OF THE PREOPERATIVE CHEMOTHERAPY IN VARIOUS MOLECULAR SUBTYPES OF LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER

N.O. Verovkina, L.A. Syvak, M.S. Krotevych

Summary. ***Aim:*** *to asses the features of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and their impact on the effectiveness of the perioperative chemotherapy in different molecular subtypes of the locally advanced breast cancer.* ***Object and methods****: tumor tissue samples of 62 breast cancer patients with clinical stage T1–3N0–3M0 were assessed. TILs level and pathomorphological response to perioperative chemotherapy were evaluated in tissue samples stained with hematoxylin and eosin. We studied the post-treatment CD4$^+$, CD8$^+$, FOXP3 tumor-infiltrating immune cells and Ki-67 positive cells by immunohistochemistry.* ***Results:*** *pathological complete response (pCR) according to Miller — Payne classification to neoadjuvant chemotherapy was identified in 2 (3,3%) patients, the fourth level — in 7 (11.3%) patients, the third — in 50 (80, 6%) patients, the second — in 3 (4.8%) patients, the first-degree treatment pathomorphosis was not found in our study. Low levels of TILs were identified in 20 patients (32,25%), high levels of TILs were identified in 20 (32,25%) patients as well, and intermediate levels of TILs were identified in 22 (35,50%) patients. Immune cell profiles and TILs levels were found to differ in different molecular subtypes of breast cancer (p = 0,01). Neoadjuvant chemotherapy was significantly more effective in patients with a high levels of TILs.* ***Conclusion:*** *further study of predictive and prognostic values of TILs and immune cell profiles in different molecular subtypes of breast cancer is necessary for the purpose to include them in diagnostic and therapeutic algorithms for this disease.*

Key Words: breast cancer, tumor-infiltrating lymphocytes, chemotherapy.

Адреса для листування:
Верьовкіна Н.О.
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43
Національний інститут раку
E-mail: 15a78nataliia@gmail.com

Одержано: 19.05.2017