

UDC 616-006.6-091

DOI: 10.32345/USMYJ.2(110).2019.31-41

**Яновицька Марія Олександрівна**

Асистент кафедри патологічної анатомії №1

НМУ ім.О.О.Богомольця, Київ, Україна

**Захарцева Любов Михайлівна**

Доктор медичних наук, завідувач кафедри патологічної анатомії №1

НМУ ім.О.О.Богомольця, Київ, Україна

## ПУХЛИНО-ІНФІЛЬТРУЮЧІ ЛІМФОЦИТИ У ТРИЧІ НЕГАТИВНОМУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ: КОРЕЛЯЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ВЛАСНИХ ДАНИХ ТА ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

***Анотація** Стаття узагальнює дані та представляє власне дослідження щодо значення пухлино-інфільтруючих лімфоцитів як прогностичного фактору для карцином молочної залози, зокрема так званих тричі негативних карцином, які не мають рецепторів до естрогену, прогестерону та ампліфікації HER2<sup>new</sup>. Ця група пухлин є гетерогенною та має нижчі показники загальної та безрецидивної виживаності, терапевтичні опції для даної групи пухлин обмежені порівняно з люмінальними та HER2-позитивними пухлинами. Саме тому тричі негативні пухлини молочної залози привертають увагу науковців, оскільки потребують більш індивідуалізованого підходу в лікуванні та пошуку додаткових прогностичних факторів. Метою дослідження є проведення кореляційного аналізу пухлино-інфільтруючих лімфоцитів з показниками виживаності, стадією захворювання та ступенем диференціювання тричі негативних пухлин, визначення найбільш «імуногенних» гістологічних підгруп тричі негативного раку молочної залози, а також порівняння показника пухлино-інфільтруючих лімфоцитів як безперервного та за розподілом на групи. У дослідженні були використані зразки пацієнтів (n=143), що проходили лікування у Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2010-2015рр, та яким вперше було встановлено діагноз раку молочної залози, який не має рецепторів до естрогену, прогестерону та ампліфікації HER2<sup>new</sup>. Оцінка кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів проводилась на гістологічних скельцях ретроспективно, за рекомендаціями міжнародної групи з визначення імунно-онкологічних біомаркерів. Кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів була оцінена як безперервна величина, а також розподілена на групи А (0-10%), В (10-40%) та С (40-90%). За результатами дослідження було визначено наявність високої прямої кореляції між безперервним показником пухлино-інфільтруючих лімфоцитів та показником, розподіленим за групами (А,В,С). Було виявлено слабкий прямий кореляційний зв'язок між показником пухлино-інфільтруючих лімфоцитів та ступенем диференціювання пухлини, слабкий обернений кореляційний зв'язок між кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів та загальною виживаністю та стадією захворювання, зокрема розміром пухлини. Показник пухлино-інфільтруючих лімфоцитів для всіх карцином з медулярними характеристиками склав 100%, що вказує на високу «імуногенність» даного гістологічного підтипу пухлин. Дослідження підтверджує, що пухлино-інфільтруючі лімфоцити виступають у якості додаткового прогностичного маркера для злоякісних пухлин молочної залози, зокрема, тричі негативних. Визначення кількості*

пухлино-інфільтруючих лімфоцитів є доцільним у рутинній практиці патологоанатома під час дослідження злоякісних пухлин молочної залози, оскільки не потребує додаткових реакцій та є економічно обґрунтованим. Доцільним є використання рекомендацій міжнародної групи з визначення імунно-онкологічних біомаркерів щодо розподілу цього показника за групами А, В, С для зручності опису.

**Ключові слова:** інтратуморальні лімфоцити, прогностичні показники раку молочної залози, пухлино-інфільтруючі лімфоцити, рак молочної залози, тричі негативний рак молочної залози, пухлинне мікрооточення.

### **Вступ**

Показники захворюваності на рак молочної залози (РМЗ) найвищі серед усіх онкологічних захворювань жінок у світі (за виключенням раку шкіри). Щороку у світі понад 1,6 мільйона жінок захворюють на РМЗ і більше ніж 500 тис. з них помирають від цієї пухлини (за даними Ghoncheh, Pournamdar and Salehiniya, 2016). За даними Національного канцер-реєстру №20 за 2017-2018рр. в Україні питома вага раку молочної залози в структурі захворюваності на злоякісні новоутворення склала 20,1% (перше місце серед жінок). Найвищий показник (19,9%) мають злоякісні новоутворення молочної залози в структурі смертності від злоякісних новоутворень.

Історично було прийнято вважати, що РМЗ – це «низько імуночутливі» пухлини. Але дослідження останніх років вказують, що це твердження є неправомірним. Розвиток імунотерапії в онкології останніми роками вже змусив онкологів передивитися лікування таких пухлин як лімфома, меланома, нирково-клітинний рак і не дрібно-клітинний рак легенів (Farkona, Diamandis and Blasutig, 2016). Це стало можливим лише останні десятиріччя завдяки розвитку таргетних специфічних антитіл, що націлені на окремі контрольні точки у цілому ланцюгу імунної відповіді. В цьому аспекті актуальним стає дослідження лімфоцитарної інфільтрації пухлин молочної залози, що

опосередковано може вказувати на їх «імуногенність».

Сучасна молекулярна класифікація виділяє чотири основні підгрупи раку молочної залози: люмінальний А (який за фенотипом має рецептори до естрогену (ER) та прогестерону (PR), не має ампліфікації HER2/new та має низький індекс проліферативної активності Ki67<10%), люмінальний В (що за фенотипом є також ER-, PR-позитивним, HER2/new–позитивним або негативним, проте має вищий індекс проліферативної активності (Ki67>10%)), HER2-позитивний (який за фенотипом не має рецепторів до естрогену та прогестерону, проте має ампліфікацію HER2/new) та тричі негативний рак (який за визначенням не має ані рецепторів до ER та PR, ані ампліфікації HER2/new).

Підгрупа тричі-негативних кА-рцином молочної залози - це гетерогенна група пухлин, яка становить приблизно 10-15% від усіх карцином молочної залози і має найгірші показники виживаності. На відміну від люмінальних та HER2-позитивних пухлин, вона не має опції гормонотерапії та таргетної анти-HER2 терапії. Ця група пухлин має нижчі показники загальної та безрецидивної виживаності (Pistelli et al., 2014), проте деякі тричі негативні карциноми навпаки відрізняються сприятливим прогнозом. Не виключено, що це залежить від кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. І саме підгрупа тричі негативних

карцином, за даними багатьох досліджень, найбільш асоційована з наявністю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (ПІЛ), які опосередковано вказують на імуночутливість цих пухлин (Hammerl et al.,2018). Тому тричі негативні карциноми молочної залози є об'єктом багатьох клінічних досліджень із застосуванням імунотерапії, що наразі тривають (за даними US Clinical trials.gov). Основна категорія цих досліджень сконцентрована на імунотерапії, що представлені інгібіторами протеїнкіназ (та їх комбінаціями), що блокують PD-1, PD-L1, CTLA-4 та LAG-3, а також пептидними вакцинами, аутотрансплантацією Т-, НК- клітин тощо (Hammerl et al.,2018).

Саме тому дослідження пухлино-інфільтруючих лімфоцитів у даній підгрупі карцином молочної залози є доцільним та може допомогти клініцистам обрати оптимальну терапію та спрогнозувати перебіг захворювання.

### **Огляд літератури**

Тканина молочної залози в нормі містить невелику кількість лейкоцитів, зокрема Т-клітин (що зазвичай експресують маркери CD3, CD4 або CD3, CD8), В-лімфоцитів (CD20), макрофагів (CD68) та дендритних клітин (CD11c) (Degnim et al,2014). Кількість CD8 Т-клітин може змінюватись залежно від гормональних змін (найвищі показники у лютеальну фазу менструального циклу) (Alfonso et al.,2016). Проте поява злоякісної пухлини у молочної залозі, як правило, супроводжується підвищеною інфільтрацією лімфоцитів, включаючи мієлоїдні клітини, В-клітини та цитотоксичні CD8 Т-клітини. (Hussein and Hassan,2006). Їх кількість може варіювати у різних підтипах РМЗ. Сам факт наявності таких лімфо-

цитів у мікрооточенні пухлини вказує на те, що імунна система реагує на патологічний процес. Також численними дослідженнями доведено, що у людей з імунodefіцитними станами шанси розвитку злоякісних пухлин стрімко зростають (Chapman, Webster & Wong, 2013), а, отже, пухлино-інфільтруючі лімфоцити можуть мати вплив на розвиток пухлинного процесу. Тому гіпотеза про те, що кількість лімфоцитарного інфільтрату може дати нам розширену інформацію про те, як реагує імунна система на пухлину, вже давно стала актуальною темою для дослідження. Чому ж одні пухлини мають значну кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, а інші – їх повну відсутність? Вперше це питання дуже детально описали Dunn, Old та Schreiber у 2004 році. У своїй роботі про три «Е» імунного «редагування» (Three Es of Cancer Editing – elimination, equilibrium and escape) вони вказують, що існує процес, під час якого пухлини здатні «сховатись» від імунного розпізнавання та ерадикації. На початку цього процесу, лімфоцити, що беруть участь у імунній відповіді (зокрема, CD8+ Т-лімфоцити, CD4+Т-хелпери та НК – натуральні кілери) здатні розпізнавати та елімінувати зло якісні клітини і тим самим ефективно протидіяти пухлинній проліферації. Це називається фазою елімінації (*elimination phase*). Проте, пухлинні клітини продовжують свій розвиток та проходять «дарвінський» відбір, при цьому активно починають розмножуватись саме ті клони пухлини, які здатні уникнути розпізнавання з боку імунної системи шляхом використання декількох стратегій. Злоякісні клітини стають «невидимими» через зменшення експресії поверхневих антигенів,

тим самим різко знижуючи «імуногенність» таких пухлин (за Dunn et al, цей процес називається фазою еквілібріум - *equilibrium phase*). Також злоякісні пухлини намагаються пригнічити роботу лімфоцитів, що оточують пухлину через гіперекспресію молекул імуних контрольних точок (checkpoints), що стимулюють проліферацію та збереження імуносупресивних клітин (це, зокрема, FOXP3+ Т-клітини та міелоїдопохідні супресивні клітини MDSCs). Таким чином імуні контрольні точки, які в нормі забезпечують відсутність аутореактивності на власні тканини, починають грати негативну роль для організму. На цьому етапі пухлина експресує дуже низьку кількість антигенів (або не експресує їх зовсім). Цей стан називається фазою зникнення (*escape phase*). Окрім того, гіперекспресія таких контрольних молекул як PD-L1/PD-L2 (programmed cell death ligand-1/2) усуває вплив тих імуних клітин, які все же здатні розпізнати пухлину. Неконтрольована проліферація MDSC-клітин та FOXP3+ Т-клітин як наслідок надмірної продукції пухлиною інтерлейкіну-10, інтерлейкіну-35 та трансформуючого фактору росту (TGF)- $\beta$  продовжує сприяти формуванню мікрооточення, що по суті, має імуносупресивний вплив. Якщо пухлина розвивається за даним сценарієм, то очевидно, що присутність пухлино-інфільтруючих лімфоцитів може не означати, що організм насправді дає «імунову відповідь» на злоякісну пухлину. Тому наявність ПІЛ повинна досліджуватись для різних локалізацій пухлин в контексті виживаності та прогнозу в цілому цих пацієнтів задля розуміння їх значення. Проте ще більш очеви-

дним є факт того, що якщо патолог бачить повну відсутність ПІЛ у злоякісній пухлині, це і може вказувати, на те, що пухлина не сприймається імуною системою взагалі і її спроба «втекти» є вдалою. Звідси такі пухлини можуть бути більш агресивними. Використання такої інформації в майбутньому дозволить клініцистам більш індивідуалізовано підходити до вибору терапії.

Щодо тричі негативних карцином, декілька досліджень вказують на те, що наявність ПІЛ у цих пухлинах виступає як прогностичний фактор та корелює з тривалішими показниками загальної та безрецидивної виживаності як для нелікованого тричі негативного раку, так і для лікованих пухлин після неoadювантної хімотерапії (Stanton, Adams & Disis, 2016; García-Martínez, 2014; Denkert, 2018). Пухлини, що мають більше 50% ПІЛ відрізняються кращим прогнозом (Ohtani, Mori-Shiraishi, Nakajima & Ueki, 2015). Кількість ПІЛ також може бути предиктивним показником лікувального патоморфозу четвертого ступеню після неoadювантної хімотерапії (García-Tejido, Cabal, Fernández & Pérez, 2016, Denkert et al, 2018).

Фактично, у всіх (не тільки тричі негативних) операбельних пухлинах молочної залози з вираженим запальним інфільтратом кількість ПІЛ виявилась більш значущим прогностичним маркером, аніж рецепторний статус та залучення лімфатичних вузлів (Mohammed, Going, Edwards, Elsberger & McMillan, 2013).

Імуноклітинні інфільтрати в карциномах молочної залози складаються з різних популяцій імуних клітин, які виконують широкий спектр функцій. І оскільки популяція ПІЛ є неоднорідною, деякі дослі-

дження вказують на те, що субкласифікація лімфоцитів дає більш повну інформацію щодо прогнозу захворювання.

Зокрема Мао et al (2016) у метааналізі вказують, що, наприклад, CD8+ лімфоцити асоційовані з кращими показниками безрецидивної виживаності, в той час як FOXP3+ лімфоцити навпаки, з гіршими показниками безрецидивної та загальної виживаності. Huang et al (2015) у власному дослідженні також показали, що CD8 + T-лімфоцити є ключовою популяцією ефекторних клітин, що опосередковано відповідають за ефективний протипухлинний імунітет, та їх наявність є асоційована з кращим прогнозом захворювання. Проте, внутрішньопухлинні CD4 + T-клітини мають, навпаки, негативний прогностичний вплив на результати лікування хворих на рак молочної залози.

Згідно з дослідженнями Li et al (2018) деякі з імунних клітин, такі як MDSC (CD33), що беруть участь у «втечі» пухлини від імунітету, можуть також вказувати на несприятливий прогноз, і їх підвищена кількість корелює з нижчою виживаністю у групі естроген-негативних карцином. Кількість нейтрофільних гранулоцитів також вказує на несприятливий прогноз тричі негативних пухлин (Wei, 2016), проте за рекомендаціями міжнародної групи з визначення імунно-онкологічних біомаркерів, нейтрофіли не повинні бути включені у рутинне дослідження імунного інфільтрату при РМЗ (Hendry et al, 2017).

Не дивлячись на велику кількість досліджень, де підгрупи лімфоцитів розподіляються за своїм імунотипом, необхідно розуміти, що у рутинному дослі-

дженні навряд чи такі дослідження будуть зручними для використання. Тому у нашому дослідженні ми, в першу чергу, оцінюємо параметри, які можна оцінити від час рутинного дослідження на препаратах, пофарбованих гематоксилін-еозином, та які можуть дати нам прогностичну та предиктивну інформацію щодо лікування та перебігу захворювання.

**Метою** даного дослідження є проведення кореляційного аналізу пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (ПІЛ) з показниками загальної виживаності, стадією захворювання та ступенем диференціювання пухлин, визначення найбільш «імуногенних» гістологічних підгруп РМЗ, а також порівняння показника ПІЛ як безперервного та за розподілом на групи.

#### **Методологія та методи дослідження**

У дослідженні були використані зразки пацієнтів (n=143), що проходили лікування у Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2010-2015рр, та яким вперше було встановлено діагноз раку молочної залози, який не має рецепторів до естрогену, прогестерону та ампліфікації HER2<sup>new</sup> (тричі негативні пухлини). Вік пацієнток становив 28-78 років (середній вік 56,02 роки). Оцінювався біопсійний та операційний матеріал (гістологічні зразки, пофарбовані гематоксилін-еозином) тих пацієнтів, які не отримували попередньо неoad'ювантну хімотерапію. Відбір тричі негативних пухлин базувався на попередньо зробленому імуногістохімічному дослідженні з ER (Clone EP1, Dako, USA), PR( Clone PgR 636, Dako, USA) та HER2<sup>new</sup> (Clone SP3, Thermo-scientific, USA).

Оцінка кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (ПІЛ)

проводилась на гістологічних скельцях ретроспективно, за рекомендаціями міжнародної групи з визначення імунно-онкологічних біомаркерів (Hendry et al, 2017) у РМЗ. Кількість ПІЛ була оцінена як безперервна величина, а також ро-

зподілена на групи А (0-10%), В (10-40%) та С (40-90%). Даний аналіз був зосереджений на визначенні саме стромальних ПІЛ (різниця між стромальними та інтратуморальними ПІЛ вказана в табл.1.

**Табл.1. Відмінності між інтратуморальними та стромальними пухлино-інфільтруючими лімфоцитами (Ravelli et al,2017)**

<b>Інтратуморальні ПІЛ</b>	<b>Стромальні ПІЛ</b>
Прямий контакт з пухлинними клітинами	Немає контакту з пухлинними клітинами безпосередньо
Менша кількість	Підрахунок не обмежений щільністю самої пухлини
Більш складно знаходити на препараті	Легше знайти, оцінити та ізолювати
Більш висока гетерогенність	Менша гетерогенність

Показник ПІЛ оцінювався лише в межах інвазивної пухлини. Лімфоцитарний інфільтрат за межами пухлин, а також в області неінвазивного *in situ* компоненту не оцінювався. Враховувався лише моноцитарний інфільтрат, нейтрофільні гранулоцити не оцінювались. Зони некрозу та осередки з неінвазивним компонентом також не підлягали оцінці. З дослідження були виключені пацієнти з 4 ста-

дією, а також ті, що мали інші онкологічні захворювання. Період спостереження склад від 5 до 9 років.

Більшість з досліджених пухлин (93%) було класифіковано як неспецифічні (протокові) карциноми за гістологічною класифікацією ВООЗ, проте також були долькові, медулярні, папілярні та секреторна карциноми. Клінічні дані та більш детальна характеристика пацієнтів наведена в табл.2.

**Табл.2. Морфологічна характеристика пухлин та клінічні дані пацієнтів.**

	<b>N</b>	<b>%</b>
<i>Загальна кількість пацієнтів</i>	143	100%
<i>Гістологічний підтип NOS</i>	133	(93%)
Карцинома з медулярними рисами	3	(2%)
Долькова карцинома	3	(2%)
Папілярна карцинома	3	(2%)
Секреторна карцинома	1	(0,6%)
<i>Вік пацієнток</i>		
Діапазон	28-78 років	
Середній вік	56	
Діапазон спостереження	5-9 років	
<i>Ступінь диференціювання пухлин</i>		
G2	92	64%
G3	51	36%
<i>Група за кількістю пухлиноінфільтруючих лімфоцитів (за RESIST)</i>		
А (0%-10%)	47	33%
В (10%-40%)	30	21%
С (>40%)	66	46%

Стадія захворювання	31	22%
I	82	57%
II	30	21%
III		
Розмір пухлини (T)		
T1	42	29%
T2	86	60%
T3	8	6%
T4	7	5%
Метастази у регіонарні лімфатичні вузли (N)		
N0	82	57%
N1	38	27%
N2	15	10%
N3	8	6%
Показник загальної виживаності на кінець дослідження (2019 рік)	110	77%
Живий	33	23%
Помер		

### Статистичний аналіз

Статистичну обробку даних проводили з використанням прикладного статистичного пакету Medstat. Для встановлення зв'язку між показниками проводили ранговий кореляційний аналіз Спірмена. Оскільки даний метод є непараметричним, оцінка на нормальність розподілу в даному випадку не потрібна. Рівень статистичної достовірності був прийнятий на рівні 0,05.

Було визначено наявність високої прямої кореляції між безперервним показником ПЛЛ та показником, розподіленим за групами (A,B,C). Наявний слабкий прямий кореляційний зв'язок між показником ПЛЛ та ступенем диференціювання пухлини (G), слабкий обернений кореляційний зв'язок між кількістю ПЛЛ та загальною виживаністю та стадією захворювання, зокрема розміром пухлини (T). (Дані представлено в табл.3)

### Результати.

Табл.3. Показники рангової кореляції Спірмена

	Ступінь диференціювання пухлин (G)	Група ПЛЛ (A,B,C)	Безперервний показник ПЛЛ	Стадія захворювання	Розмір пухлини (T)	Метастази у регіонарні лімфатичні вузли (N)	Загальна виживаність
(G)	-	0,188	0,278	-	-	-	-
Група ПЛЛ (A,B,C)	0,188	-	0,891	-0,195	-0,207	-	-0,21
Безперервний показник ПЛЛ	0,278	0,891	-	-0,187	-0,19	-	-0,196
Стадія захворювання	-	-0,195	-0,187	-	0,673	0,847	0,207
(T)	-	-0,207	-0,19	0,673	-	0,294	0,184
(N)	-	-	-	0,847	0,294	-	0,168
Загальна виживаність	-	-0,21	-0,196	0,207	0,184	0,168	-

Показник ПІЛ для всіх карцином з медулярними характеристиками склав 100%, що вказує на високу «імуногенність» даного гістологічного підтипу пухлин.

### **Дискусія**

Наявність високої прямої кореляції між безперервним показником ПІЛ та показником, розподілим за групами (А,В,С) вказує на те, що використання розподілу на групи за рекомендаціями міжнародної групи з визначення імунно-онкологічних біомаркерів є зручним у використанні та може замінити використання безперервних чисел. Дані щодо розподілу пухлини до певної групи (А,В,С) легко вказати в патологогістологічному дослідженні.

Наявний слабкий прямий кореляційний зв'язок між показником ПІЛ та ступенем диференціювання пухлини (G) може вказувати на те, що пухлини, які є менш диференційованими, мають більш вижарений лімфоцитарний інфільтрат. Це може означати, що для низько-диференційованих пухлин застосування імунотерапії може стати вдалою опцією лікування. Можливо, пухлини з високим ступенем диференціювання є менш «імуногенними», хоча дана гіпотеза потребує додаткових досліджень. Цікавим також є факт, що ступінь диференціювання пухлини сам по собі не має жодної статистично достовірної кореляції з показником загальної виживаності.

Дані щодо наявності зв'язку між кількістю інтратуморальних лімфоцитів та загальною виживаністю підтверджують дані літератури та вказують на те, що кількість ПІЛ може виступати у ролі додаткового прогностичного фактору. Обернений зв'язок між стадією та кількістю ПІЛ також вказує на те, що пухлини з меншою кількістю ПІЛ, як правило, діагно-

стуються на більш пізній стадії, а отже, можна зробити припущення, що вони є більш агресивними у своєму перебігу через імунну «втечу».

Загалом отримані дані свідчать про значущість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів як прогностичного фактору, проте подальші дослідження з детальним аналізом виживаності та більшою вибіркою пацієнтів необхідні.

Включення кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів у рутинне патологоанатомічне дослідження злоякісних пухлин молочної залози, зокрема тричі негативних пухлин, які суттєво різняться між собою за діапазоном життєвих інтервалів, є абсолютно доцільним та може дати клініцистам додаткову інформацію для більш індивідуалізованого підходу при виборі тактики лікування.

Тричі негативний рак молочної залози гетерогенний за морфологією. За класифікацією ВООЗ пухлин молочної залози (Lakhani, 2012) переважна більшість тричі негативних пухлин (50-80%) відносяться до так званих неспецифічних інвазивних карцином (NOS) молочної залози (в минулому, інвазивних протокових карцином). Проте ми можемо зустріти більш рідкі гістологічні форми, як то медулярна, секреторна та метапластична карциноми, аденоїд-кістозна карцинома та аденосквамозна карцинома низького ступеню (low grade). Цікавим залишається питання, чи справді такий підтип, як медулярна карцинома (або карцинома з медулярними рисами), виступає в ролі самостійної гістологічної форми, або ж це той самий «імуногенний» рак молочної залози, оскільки він має виражений лімфоцитарний інфільтрат за визначенням. Наше дослідження підтверджує дані про те, що даний гістологічний підтип є найбільш «імуногенним», оскільки



кількість ПІЛ для всіх пухлин з медулярними рисами склав 100%. Можливо, це вказує на те, що карциноми з медулярними характеристиками не проходять етап «втечі» від імунної відповіді, тому саме в цих пухлинах ми бачимо найбільш виражений лімфоцитарний інфільтрат під час гістологічного дослідження.

#### **Висновки.**

1. Стрімкий розвиток імунотерапії змусив передивитися погляди щодо «імуногенності» багатьох пухлин, зокрема, раку молочної залози. За останні десятиріччя завдяки досягненням генної інженерії вийшли роботи, що детально описали імунну відповідь на злоякісну пухлину.

2. Пухлино-інфільтруючі лімфоцити виступають у якості додаткового

прогностичного маркера для злоякісних пухлин молочної залози, зокрема, тричі негативних.

3. Визначення кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів є доцільним у рутинній практиці патологоанатома під час дослідження злоякісних пухлин молочної залози, оскільки не потребує додаткових реакцій та є економічно обґрунтованим.

4. Доцільним є використання рекомендацій міжнародної групи з визначення імунно-онкологічних біомаркерів щодо розподілу цього показника за групами А, В, С для зручності опису.

5. Подальші дослідження необхідні.

#### **ЛІТЕРАТУРА**

- Бюлетень національного канцер-реєстру України №20. Київ-2019.
- Alfonso, J. C. L., Schaadt, N. S., Schönmeier, R., Brieu, N., Forestier, G., Wemmer, C., ... & Hatzikirou, H. (2016). In-silico insights on the prognostic potential of immune cell infiltration patterns in the breast lobular epithelium. *Scientific reports*, 6, 33322.
- Chapman, J. R., Webster, A. C., & Wong, G. (2013). Cancer in the transplant recipient. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(7), a015677.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=triple+negative+breast+cancer+immunotherapy&term=&cntry=&state=&city=&dist=>
- Degnim, A. C., Brahmabhatt, R. D., Radisky, D. C., Hoskin, T. L., Stallings-Mann, M., Laudenschlager, M., ... & Visscher, D. W. (2014). Immune cell quantitation in normal breast tissue lobules with and without lobulitis. *Breast cancer research and treatment*, 144(3), 539-549.
- Denkert, C., von Minckwitz, G., Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B. I., Weber, K. E., ... & Schmitt, W. D. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The lancet oncology*, 19(1), 40-50
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 329-360.
- Farkona, S., Diamandis, E. P., & Blasutig, I. M. (2016). Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC medicine*, 14(1), 73.
- García-Martínez, E., Gil, G. L., Benito, A. C., González-Billalabeitia, E., Conesa, M. A. V., García, T. G., ... & de la Peña, F. A. (2014). Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast cancer research*, 16(6), 488.
- García-Tejido, P., Cabal, M. L., Fernández, I. P., & Pérez, Y. F. (2016). Tumor-infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer: the future of immune targeting. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 10, CMO-S34540.
- Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., & Salehiniya, H. (2016). Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17(S3), 43-46.
- Hammerl, D., Smid, M., Timmermans, A. M., Sleijfer, S., Martens, J. W. M., & Debets, R. (2018, October). Breast cancer genomics and immuno-oncological markers to guide immune therapies. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 52, pp. 178-188). Academic Press.
- Hendry, S., Salgado, R., Gevaert, T., Russell, P. A., John, T., Thapa, B., ... & Sanders, M. (2017). Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in melanoma, gastrointestinal tract carcinomas, non-small cell lung carcinoma and mesothelioma, endometrial

and ovarian carcinomas, squamous cell carcinoma of the head and neck, genitourinary carcinomas, and primary brain tumors. *Advances in anatomic pathology*, 24(6), 311.

Huang, Y., Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., ... & Peng, G. (2015). CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*, 6(19), 17462.

Hussein, M. R., & Hassan, H. I. (2006). Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. *Journal of clinical pathology*, 59(9), 972-977.

Lakhani, S. R. (Ed.). (2012). *WHO Classification of Tumours of the Breast*. International Agency for Research on Cancer.

Li, F., Zhao, Y., Wei, L., Li, S., & Liu, J. (2018). Tumor-infiltrating Treg, MDSC, and IDO expression associated with outcomes of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Cancer biology & therapy*, 19(8), 695-705.

Mao, Y., Qu, Q., Chen, X., Huang, O., Wu, J., & Shen, K. (2016). The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 11(4), e0152500.

Mohammed, Z. M. A., Going, J. J., Edwards, J., Elsberger, B., & McMillan, D. C. (2013). The relationship between lymphocyte subsets and clinico-pathological determinants of survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *British journal of cancer*, 109(6), 1676.

Ohtani, H., Mori-Shiraishi, K., Nakajima, M., & Ueki, H. (2015). Defining lymphocyte-predominant breast cancer by the proportion of lymphocyte-rich stroma and its significance in routine histopathological diagnosis. *Pathology international*, 65(12), 644-651.

Pistelli, M., Caramanti, M., Biscotti, T., Santinelli, A., Pagliacci, A., De Lisa, M., ... & Berardi, R. (2014). Androgen receptor expression in early triple-negative breast cancer: clinical significance and prognostic associations. *Cancers*, 6(3), 1351-1362.

Ravelli, A., Roviello, G., Cretella, D., Cavazzoni, A., Biondi, A., Cappelletti, M. R., ... & Bottini, A. (2017). Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: beyond the prognostic and predictive utility. *Tumor Biology*, 39(4), 1010428317695023.

Stanton, S. E., Adams, S., & Disis, M. L. (2016). Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. *JAMA oncology*, 2(10), 1354-1360.

Wei, B., Yao, M., Xing, C., Wang, W., Yao, J., Hong, Y., ... & Fu, P. (2016). The neutrophil lymphocyte ratio is associated with breast cancer prognosis: an updated systematic review and meta-analysis. *OncoTargets and therapy*, 9, 5567.

## **TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER: CORRELATIVE ANALYSES OF OWN DATA AND LITERATURE REVIEW**

**Zakhartseva Liubov**

PhD, Head of Pathology Anatomy №1 Department, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

**Yanovytska Mariia**

Assistant of Pathology Anatomy №1 Department, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

**Annotation** The article summarizes data and presents own study about the value of tumor-infiltrating lymphocytes as a prognostic factor for breast cancer including triple negative breast cancer lacking estrogen and progesterone receptors and HER2/new amplification. This tumor group is heterogeneous and has lower overall and disease-free survival rates; therapeutic options for this tumor group are limited compared to luminal and HER2-positive tumors. Triple negative breast tumors attract the attention of scientists as they require more individualized approach and additional prognostic factors in the treatment. The aim of this study is to conduct correlation analysis of tumor-infiltrating lymphocytes with survival rates, stage of disease and degree of differentiation of triple negative breast tumors. Also determination of the most "immunogenic" histological subgroups of triple negative breast cancer is done, as well as comparing of tumor-infiltrating lymphocytes measurement as a continuous number and divided into groups. Samples (n = 143) from patients with triple negative breast cancer undergoing treatment at the Kyiv City Clinical Oncology Center during 2010-2015 were used. The assessment of the number of tumor-infiltrating lymphocytes was performed on histological glasses retrospectively, following the recommendations of an international group for the determination of immune-oncological biomarkers. The number of tumor-infiltrating lymphocytes was evaluated as a continuous number and also divided into groups A (0-10%), B (10-40%) and C (40-90%). According to the results of the study, there was a high direct correlation between the continuous number of tumor-infiltrating lymphocytes and divided into groups (A, B, C). A weak direct correlation was found between tumor-infiltrating lymphocytes and tumor differentiation rates, a weak inverse correlation between tumor-infiltrating lymphocytes count and overall survival and stage of disease, in particular tumor size. The rate of tumor-infiltrating lymphocytes for all carcinomas with medullary characteristics was 100%, indicating a high "immunogenicity" of this histological subtype of tumors. The study confirms that tumor-infiltrating lymphocytes act as an additional prognostic marker for malignant breast tumors, in particular, triple negative breast cancer. Determination of tumor-infiltrating lymphocytes is advisable in the routine practice of the pathologist who investigates malignant breast tumors since it requires no additional reactions and is economically viable. It is advisable to use the recommendations of an international group of the determination of immuno-cancer biomarkers for the distribution of this indicator by groups A, B, C for convenience of description.

**Keywords:** Intratumoral lymphocytes, breast cancer prognostic factors, tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer, triple negative breast cancer, tumor micro-environment.

Manuscript is received 22.05.2019

Manuscripted is accepted 19.06.2019