

На правах рукописи

Кузнецова Ольга Александровна

**ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ МОРФОЛОГИИ И
ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАКА
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.03.02 – Патологическая анатомия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации на кафедре патологической анатомии.

Научный руководитель:

Франк Георгий Авраамович - доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России

Научный консультант:

Завалишина Лариса Эдуардовна - доктор биологических наук, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Раскин Григорий Александрович доктор медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением Общества с ограниченной ответственностью «Лечебно-диагностический центр Международного института биологических систем имени Сергея Березина» (ООО «ЛДЦ МИБС»), Санкт-Петербург

Артемьева Анна Сергеевна кандидат медицинских наук, доцент, заведующая отделением, руководитель научной лаборатории морфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына», адрес: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

Защита диссертации состоится «22» декабря 2021 года в 12.00 на заседании диссертационного совета ПДС 0300.006 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; сайт <http://dissovet.rudn.ru>).

Автореферат размещен на сайте www.vak.ed.gov.ru

Автореферат разослан «19» ноября 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
ПДС 0300.006 кандидат медицинских наук

Горячев В. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В последние годы был разработан новейший подход к лечению злокачественных новообразований – иммунотерапия. Однако при большинстве локализаций рака это лечение показано только пациентам, имеющим положительный PD-L1 статус или доказанное наличие микросателлитной нестабильности.

Рак молочной железы (РМЖ) в настоящее время является самой распространенной в России злокачественной опухолью среди женского населения и, несмотря на имеющийся прогресс в лечении этого заболевания, продолжает занимать лидирующие позиции среди причин женской смертности от злокачественных новообразований (Каприн А.Д. и др. 2019). Согласно отечественным рекомендациям по лечению этого заболевания и классификации Всемирной организации здравоохранения все опухоли молочной железы разделяются на подтипы по маркерам, которые они экспрессируют. Это разделение диктует дальнейшее лечение пациента (WHO Classification of Tumours 2019, Клинические рекомендации Рак молочной железы 2020). Крупные клинические исследования показали высокую эффективность иммунотерапии в первой линии при тройном негативном фенотипе рака молочной железы у пациенток с позитивным PD-L1 статусом (Schmid P.J. et al. 2019).

Хотя тройной негативный РМЖ – это агрессивный вариант рака, нередко опухоли и других молекулярно-биологических подтипов не реагируют на проводимое лечение в достаточной степени. Высокая остаточная опухолевая нагрузка является неблагоприятным фактором прогноза вне зависимости от наличия экспрессии рецепторов гормонов и HER2 (Symmans W.F. et al. 2017). Несмотря на это экспрессия PD-L1 в опухолях, подвергшихся химиотерапевтическому лечению изучена крайне мало.

Анализ на PD-L1 выполняется при помощи иммуногистохимического метода и имеет целый ряд ограничений. Наличие нескольких производителей диагностикумов, использование разных клонов антител для конкретных иммунотерапевтических препаратов вносят дополнительные трудности при попытке выполнения исследования. Сегодня описано не менее пяти методик, по которым можно оценивать экспрессию PD-L1 в опухоли. Часть из них учитывает только опухолевые (к примеру, Tumor Proportional Score - TPS) или только иммунные клетки (методика Immune Cells - IC), иные – комбинируют подсчет

различных клеток (Combined Proportional Score - CPS). Наличие оборудования и расходных материалов только одного производителя нередко ограничивает лабораторию в выборе методов и порождает проблему гармонизации этих исследований.

Еще одна значимая проблема заключается зачастую в недоступности материала из первичного очага по различным причинам. В литературе встречаются противоречивые данные относительно возможности использования опухолевой ткани РМЖ, полученной из метастатических очагов в лимфатическом узле или висцерального органа. Хотя в инструкции к антителу допустимо использование метастаза – ряд авторов полагает, что результаты анализа могут сильно отличаться (Okabe M. et al. 2017, Polónia A. et al. 2017).

Весьма перспективным для изучения является феномен микросателлитной нестабильности. Для ряда опухолей, например для рака толстой кишки, было показано что экспрессия PD-L1 тесно связана с наличием микросателлитной нестабильности в опухоли (Gatalica Z. et al. 2014).

Все вышеперечисленные факты, а также отсутствие возможности осмысленного сравнения исследований ввиду использования для анализа различных платформ, диагностикумов и методик, нуждаются в более тщательном исследовании, проведенном на одной выборке пациентов.

Степень разработанности темы

На сегодняшний день в мире существует целый ряд лекарственных препаратов – чек-пойнт ингибиторов иммунного ответа, действующих через блокирование PD-L1. Совместно с фармакологическими фирмами были разработаны диагностикумы к различным частям лиганда программируемой клеточной гибели 1, как следствие - одни и те же образцы опухолевой ткани окрашиваются по-разному. Абсолютное количество окрашенных опухолевых и иммунных клеток варьирует от антитела к антителу (Zavalishina L. et al. 2018). Для назначения препарата необходимо определить статус опухоли, а не абсолютное число окрашенных клеток, для этого были разработаны схемы для оценки реакций с антителами к PD-L1 для таких нозологий как уротелиальный рак мочевого пузыря (Interpretation Manual - Urothelial Cancer, 2018), немелкоклеточный рак легкого (Interpretation Manual - NSCLC, 2017). Для рака молочной железы подобные рекомендаций существуют только для одного клона (SP142) и применяются только для тройного негативного рака молочной железы.

Учитывая опыт лечения пациентов с HER2-позитивным раком, становится понятно, что иммуногистохимическая реакция в отрыве от морфологических

особенностей опухоли не несёт клинической значимости, однако какие особенности строения опухоли влияют на прогноз выживаемости, ответа больных на терапию соответствующими препаратами изучены недостаточно.

Известно, что высокая экспрессия PD-L1 опухолевыми клетками рака молочной железы свидетельствует о худшем прогнозе: это часто сочетается с низкой степенью дифференцировки опухолевых клеток (Ghebeh H. et al. 2006). В то же время высокий уровень микросателлитной нестабильности отмечается как в высоко, так и в низкодифференцированных колоректальных карциномах, при этом чаще этот феномен выявляют в низкодифференцированных опухолях (Karahana B. et al. 2015). Подобных данных для опухолей молочной железы практически не описано.

Nashimoto T. с соавторами (Nashimoto T. et al. 2019) описывают отсутствие связи между микросателлитной нестабильностью и PD-L1 статусом опухолей желудка. Для рака молочной железы взаимосвязь этих маркеров не исследована.

Экспрессия лиганда программируемой клеточной гибели 1 – это способ ухода опухоли от иммунного ответа, так как активация пути PD-1 – PD-L1 инактивирует Т-хелперы, останавливая каскад реакций иммунного ответа (Chen L. 2004). Изучая ответ опухолей толстой кишки на блокаторы PD-L1, ученые обратили внимание на то, что на лечение ответили только опухоли с высокой микросателлитной нестабильностью (Le D.T. et al. 2015). Данный факт подчеркивает связь между двумя способами ускользания опухоли от иммунного ответа, однако для опухолей молочной железы подобные исследования не проводились.

Цель исследования

Выявление роли иммунотерапевтических маркеров при тройном негативном и люминальном В, HER2-негативном раке молочной железы.

Задачи исследования

1. Сопоставить методики оценки PD-L1-статуса в раке молочной железы при использовании различных клонов антител (22C3 и SP142) и определить возможность их взаимозаменяемости.
2. Сопоставить результаты определения PD-L1-статуса в первичной опухоли и в региональных метастазах.
3. Оценить интратуморальную инфильтрацию иммунными клетками и ее связь с PD-L1-статусом.

4. Оценить возможности иммуногистохимического метода оценки микросателлитной нестабильности в тройном негативном и люминальном В, HER2-негативном раке молочной железы, выявить возможную связь с PD-L1-статусом опухоли.
5. Разработать алгоритм исследования операционного материала рака молочной железы для выбора оптимальной тактики лечения.

Научная новизна

В результате научной работы были получены первые результаты по гармонизации исследований PD-L1 с различными клонами антител (22C3 и SP142) на материале рака молочной железы. Показано отсутствие конкордантности между получаемыми данными при использовании различных методик оценки PD-L1-статуса опухоли, а также значительная разница в экспрессии антигена. Отмечена важность планирования лечения на этапе диагностики.

Показаны возможности использования для анализа не только материалов из первичного очага опухоли, но и из метастазов в лимфатические узлы. Согласно полученным данным результаты анализов, проведенных на парных материалах с использованием различных клонов статус PD-L1, полученный из первичного очага с высокой долей вероятности совпадет со статусом метастаза. Данное утверждение правомерно при использовании методик IC и CPS с пограничным значением на уровне $\geq 1\%$.

Данная работа позволила выявить новую потенциальную группу для назначения иммунотерапевтических препаратов. Проведенный анализ уровней экспрессии PD-L1 и оценке статусов опухолей после лечения позволил определить высокую частоту встречаемости PD-L1-позитивных опухолей у пациентов с высокой остаточной опухолевой нагрузкой.

Впервые в России методом иммуногистохимии была предпринята попытка анализа микросателлитной нестабильности в клетках рака молочной железы. В результате проведенного исследования получены данные о низкой чувствительности данного метода в опухолях молочной железы.

Теоретическая и практическая значимость

Разработан алгоритм изучения материала рака молочной железы при проведении патологоанатомического исследования. Показаны возможности использования ткани опухоли, полученной из различных источников. Установлено отсутствие статистически достоверной значимости различий

между клетками карциномы из висцеральных метастазов и лимфатических узлов. Обозначены критерии выбора используемого диагностикума и методики оценки при анализе на PD-L1 в раке молочной железы. Разработаны рекомендации по созданию потенциальных групп для назначения иммунотерапевтических препаратов, таких как пациенты с высокой остаточной опухолевой нагрузкой и с карциномами с выраженной воспалительной лимфоидной инфильтрацией. Охарактеризованы связи между морфологическими особенностями опухоли, степенью ее инфильтрации лимфоцитами и уровнем экспрессии иммунотерапевтических маркеров. Продемонстрирована низкая чувствительность иммуногистохимического метода при исследовании микросателлитной нестабильности при раке молочной железы, рекомендованы генетические методы.

Методология и методы исследования

Методология исследования построена на системном и комплексном анализе данных. Методы, использованные в работе: морфологический анализ, иммуногистохимическое исследование, анализ ряда клинических данных, статистическая обработка результатов.

Предмет исследования: морфологические характеристики и специфические биомаркеры рака молочной железы, отражающие молекулярно-генетические механизмы канцерогенеза опухоли.

Объект исследования: парафиновые блоки из архивов кафедры патологической анатомии (материал пациенток клиники РМАНПО) и Рязанского областного онкологического диспансера с операционным и биопсийным материалом больных раком молочной железы за период с 2014 по 2017 г. Объем исследования: 72 пациента.

Положения, выносимые на защиту

1. Определено, что использование клонов 22C3 и SP142 приводит к абсолютно различным результатам анализа вне зависимости от выбранной методики оценки.
2. Установлено, что использование ткани метастаза для определения PD-L1-статуса опухоли дает результаты равнозначные полученным на ткани первичного опухолевого очага.
3. Доказано, что случаи с высокой остаточной опухолевой нагрузкой после неоадьювантной терапии чаще являются PD-L1-позитивными.

4. Показана крайне низкая чувствительность иммуногистохимического метода для выявления микросателлитной нестабильности при раке молочной железы, что требует использования генетических методов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Область настоящего диссертационного исследования соответствует п.2 («прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов, научный анализ патологического процесса, лежащего в основе заболевания») паспорта специальности 14.03.02 – «патологическая анатомия».

Внедрение в практику и учебный процесс

Результаты исследования внедрены в практическую деятельность патологоанатомического отделения Государственного учреждения Рязанской области «Областной клинический онкологический диспансер» и патологоанатомического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая онкологическая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы», используются в учебных циклах кафедры патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения.

Степень достоверности и апробация результатов

Выводы соответствуют задачам и логически следуют из результатов, полученных в ходе исследования. Достоверность результатов обоснована изучением достаточного объема материала и использованием современных методов, отвечающих поставленным задачам. Выбраны корректные методы статистического анализа.

Материалы исследования доложены на 30 Конгрессе европейского общества патологов, Испания (30th European Congress of Pathology, 2018, Bilbao, Spain), 31 Конгрессе европейского общества патологов, Франция (31th European Congress of Pathology, 2019, Nice, France), XXII Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2018), XXIII Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2019), X Конференции молодых ученых «Трансляционная медицина: возможное и реальное» (Москва, 2019).

Личный вклад автора заключался в планировании и проведении исследования, обработке полученных данных, их представлении, подготовке публикаций и написании текста диссертации.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, входящих в перечень МЦБ и 4 публикации в материалах всероссийских и международных научных конференций.

Объем и структура диссертации

Объем диссертации составляет 140 страниц и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, 2 главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы. Список литературы представлен 165 источниками отечественных и иностранных авторов. Работа иллюстрирована 46 рисунками и 30 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы

В данное исследование включены 72 пациентки с раком молочной железы в возрасте от 36 до 86 лет (медиана 60, средний возраст 61,36 лет). Изучали опухоли пациентов клиники ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ и Рязанского областного онкологического диспансера. Основными критериями для включения в исследование были: наличие достаточного объема опухолевой ткани в парафиновом блоке и биологический подтип опухоли. Наблюдение за пациентами осуществлялось с начала декабря 2014 года и до конца июня 2019 года. За время наблюдения у 3 пациенток выявлен рецидив заболевания в виде появления отдаленных метастазов (печень, кости), 14 пациенток скончались от рака молочной железы, 3 пациента выбыли из-под наблюдения.

Проведение диссертационного исследования одобрено Комитетом по этике научных исследований ФГБОУ ДПО РМАНПО (11 декабря 2018 года, протокол №12).

Методика определения TILs была использована согласно рекомендациям International TILs Working Group 2014 (Salgado R. et al. 2015). По данным рекомендациям исследование проводилось на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином.

Формула подсчета TILs:

$$TILs = \frac{\text{Площадь, занимаемая лимфоцитами и плазмочитами, расположенными в пределах исследуемой площади стромы опухоли}}{\text{Площадь стромы опухоли}} \times 100$$

TILs были оценены для каждой опухоли и выражены в процентах

Для выявления CD8-позитивных лимфоцитов было проведено стандартное иммуногистохимическое исследование материала первичного очага и метастаза. Для проведения реакции использовались мышиные антитела производства фирмы Agilent, клон C8/144В с системой детекции EnVision Flex. Результат оценки – это доля CD8 позитивных лимфоцитов, среди ассоциированных с опухолевым процессом иммунных клеток.

Из включенных в исследование больных неoadьювантную терапию проводили 31 пациентке. В этих случаях была произведена оценка опухолевой регрессии по системе RCB (Symmans WF и др, 2007). Данные о размерах опухолевого ложа, средней клеточности, наличии и размерах метастазов вносились в формулу:

$$RCB = 1,4[(1 - (\%CIS/100 \cdot \%CA/100))\sqrt{d_1 d_2}]^{0.17} + [4(1 - 0.75^{LN} d_{met})]^{0.1}$$

где d_1 , d_2 — микроскопические размеры ложа опухоли, CIS — процент карциномы in situ, CA — выраженность инвазивного компонента, рассчитанная на основании процента карциномы in situ в опухоли, LN — число лимфатических узлов с метастазами, d_{met} — наибольший диаметр метастаза в лимфатическом узле. Получаемое в результате математических действий число позволяло отнести опухоль к одному из классов. В данном исследовании приняли участие только пациенты с умеренной и выраженной остаточной опухолью, согласно критериям включения и исключения.

В данном исследовании для определения PD-L1 статуса опухоли использовалось 2 антитела: клон 22C3 (Agilent) и клон SP142 (производство Ventana) и 2 методики: Combined Positive Score (CPS) и Immune Cells (IC).

Для выявления микросателлитной нестабильности был выбран иммуногистохимический метод. Для окрашивания использованы 3 первичных мышинных моноклональных антитела: Ventana anti-MLH1 (клон M1), Ventana anti-MSH2 (клон G219-1129), Ventana anti-PMS2 (клон A16-4), и одно кроличье моноклональное первичное антитело Ventana anti-MSH6 (клон SP93). В каждом случае использовалась система детекции OptiVeiw DAB IHC Detection Kit с OptiVeiw Amplification Kit.

В каждом случае оценивалось наличие или отсутствие ядерного окрашивания опухолевых клеток при наличии окрашивания ядер нормальных клеток, например лимфоцитов и фибробластов. Оценка производилась только в первичном очаге. При обнаружении выпадения экспрессии одного из четырех антител выставлялся статус MSI-L (низкий уровень микросателлитной нестабильности), двух – MSI-H (высокий уровень микросателлитной нестабильности). Если не выявлялось выпадение окрашивания каких-либо маркеров – выставлялся статус MSS (микросателлитная стабильность).

Статистическая обработка данных производилась в программе R-Studio. Уровень значимости p-value для всех исследований был принят на уровне 0,05 для всех нижеописанных сравнений. Проверка на нормальность распределения выборок осуществлялась методами Шапиро-Уилка и построения квантильных графиков. Для анализа количественных независимых переменных использовался метод Манна-Уитни, связанных выборок – критерий Уилкоксона. Анализ количественных выборок, разделенных на три подгруппы, производился при помощи дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллису. Сравнение качественных независимых переменных было проведено при помощи точного критерия Фишера, зависимых – критерий Мак-Немара без поправок Йейтса и Эдвардса. Для сравнения различных антител и методов исследования был выполнен ROC-анализ с построением кривой, вычислением площади под ней и оценкой чувствительности и специфичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

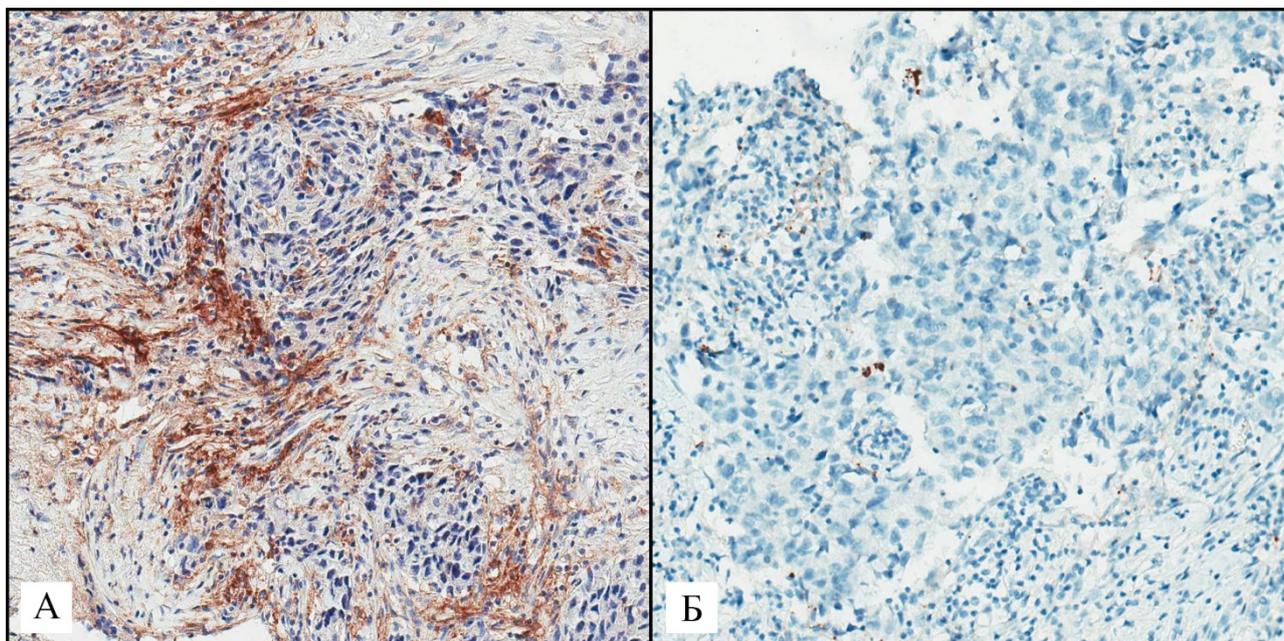
Сравнение клонов антител PD-L1 и методик оценки PD-L1-статуса опухоли CPS, IC

Антитела SP142 (Roche) и 22C3 (Agilent) продемонстрировали четкое мембранное окрашивание опухолевых и иммунных клеток. Было отмечено что опухоли по-разному проявляют экспрессию PD-L1 в зависимости от того, какое антитело было использовано для анализа. Уровень экспрессии в одних и тех же опухолях мог варьировать весьма значительно (рисунок 1). Наблюдались, отличия как в количестве окрашенных опухолевых клеток, так и иммунных клеток (клон 22C3 проявил значительно больший тропизм к опухолевым клеткам).

В данной работе были проанализированы 2 методики оценки при анализе с клоном 22C3: методика CPS и IC. В каждом случае проведено сравнение не только уровней экспрессии PD-L1 в параллельных срезах опухолей, но и PD-L1 статусов. Сравнение статусов PD-L1, полученных при помощи различных

маркеров и методов проводилось при помощи критерия Мак-Немара и ROC-анализа (за стандартный метод принят анализ SP142, методика IC).

При сравнении PD-L1-статусов первичного очага, полученных при использовании различных клонов вне зависимости от используемой методики была обнаружена достоверная разница между вариантами анализа (для метода CPS $p = 0,01052$, IC – $p = 0,004556$).



Первичный очаг или метастаз

В процессе исследования было отмечено, что средний уровень экспрессии в метастазе ниже, чем в первичном очаге – для клона 22С3 разница между средними значениями достигает 4,25 (при использовании методики CPS), а для SP142 – 0,47%. На рисунке 2 представлены графики распределения плотности уровней экспрессии PD-L1 в позитивных случаях при использовании различных методик, где можно четко увидеть различия в окрашивании метастазов и первичных очагов вне зависимости от используемой методики.

Применение Хи-квадрата Мак-Немара показало отсутствие разницы между PD-L1-статусами первичного очага и метастаза вне зависимости от используемых клонов и методик (таблица 1). Однако ROC-анализ продемонстрировал невысокую чувствительность каждого метода, а также

низкую специфичность (таблица 2). При сравнении первичный очаг был принят за эталон.

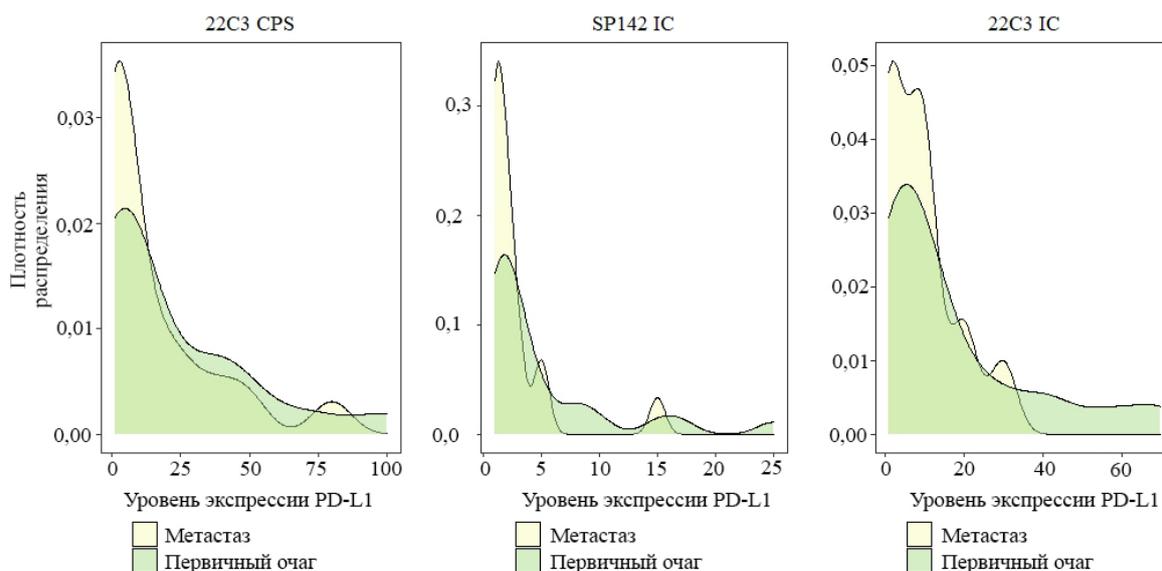


Рисунок 2 – Графики распределения плотности позитивных случаев с различным уровнем экспрессии PD-L1 между метастазом и первичным очагом

Таблица 1 – Сравнение PD-L1-статуса в первичном очаге и метастазе

| Клон | Методика | Хи-квадрат Мак- Немара | Число степеней свободы | Доверитель- ный уровень | p-value |
|-------|----------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------|
| 22C3 | CPS | 0,4 | 1 | 95% | 0,5271 |
| SP142 | IC | 1,8 | 1 | 95% | 0,1797 |
| 22C3 | IC | 1,0 | 1 | 95% | 0,3173 |

Таблица 2 – Чувствительность и специфичность методов при анализе метастаза по сравнению с первичным очагом

| Метод | Чувствитель- ность | Специфичность | Площадь под кривой | p-value |
|------------|-----------------------|---------------|-----------------------|---------|
| CPS (22C3) | 0,7000 | 0,7778 | 0,739 | 0,012 |
| IC (SP142) | 0,8261 | 0,4737 | 0,880 | 0,0001 |
| IC (22C3) | 0,6304 | 0,8462 | 0,752 | 0,008 |

Анализ зависимости экспрессии PD-L1 от возраста, стадий T и N, степени дифференцировки опухоли

Хотя возраст пациенток варьировал от 36 до 86 лет, основная доля заболевших пришлась на 6–7 декаду жизни. Зависимость уровня экспрессии PD-

L1 от возраста пациенток исследовалась при помощи метода Спирмена. Ни в одном варианте анализа не было выявлено даже незначительной корреляции. Попытки найти зависимость в метастазе также не показали статистической значимости или значимых коэффициентов. Кроме того, при анализе PD-L1-статусов также не выявлено зависимости от возраста. Уровень экспрессии и PD-L1 статус оказались не связаны со стадией N и степенью дифференцировки.

Опухоль инфильтрирующие лимфоциты – TILs

Количество лимфоцитов, ассоциированных с опухолью, варьировало в исследовании от 1% до 80%, при этом большая часть карцином демонстрировала невысокий уровень инфильтрации. Не было выявлено зависимости уровня TILs от молекулярно-генетического типа опухоли (тройной негативный или люминальный B, HER2-негативный), при использовании критерия Манна-Уитни сумма рангов составила 652,5 а p-value – 0,6041. Схожие результаты были выявлены при сравнении уровня TILs карциномах с различной степенью дифференцировки ($U = 489,5$, $p = 0,1868$) и опухолями с различным классом RCB ($U = 139,5$, $p = 0,3768$).

Метод Спирмена показал наличие слабой положительной связи ($r = 0,36$) между количеством опухоль инфильтрирующих лимфоцитов и долей CD8-позитивных лимфоцитов среди них ($p = 0,002$). Однако связи инфильтрации первичного очага иммунными клетками с количеством CD8-позитивных клеток в метастазе выявлено не было ($r = 0,09$, $p = 0,5847$). При сравнении уровня TILs с возрастом пациенток связи также не обнаружено ($r = 0,004$, $p = 0,9752$).

Сравнение количества опухоль инфильтрирующих лимфоцитов с уровнями PD-L1 показало наличие от слабой до умеренной положительной связи в первичном очаге при использовании различных методик и клонов антител: $r > 0,32$, $p < 0,005$. Однако связь TILs и уровня экспрессии PD-L1 в метастазе оказалась статистически значима лишь при использовании маркера SP142 и методики IC ($r = 0,41$, $p = 0,0098$).

Сравнительный анализ экспрессии PD-L1 и CD8

Доля CD8-позитивных лимфоцитов в воспалительном инфильтрате первичной опухоли варьировала от 1% до 60%, в метастазе – от 0 до 30%. У большей части пациентов этот показатель не превышал 40%, не зависел от возраста ($p = 0,7678$), степени дифференцировки опухоли ($p = 0,7189$) и стадии T ($p = 0,2446$).

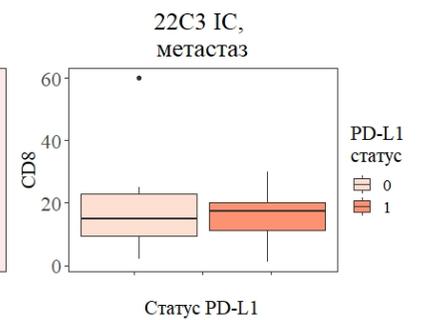
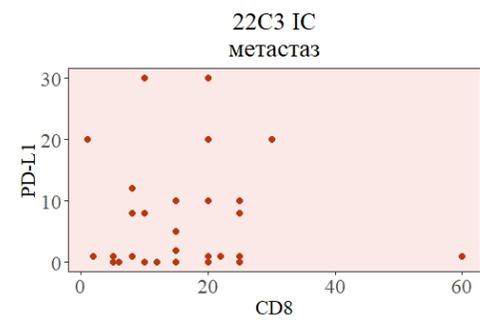
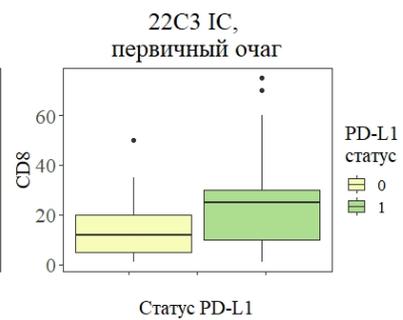
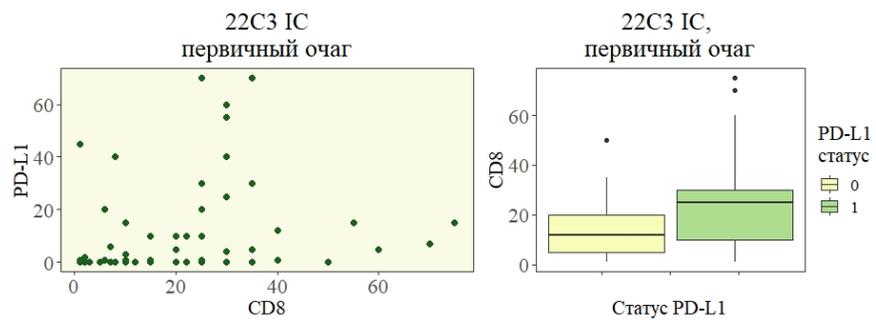
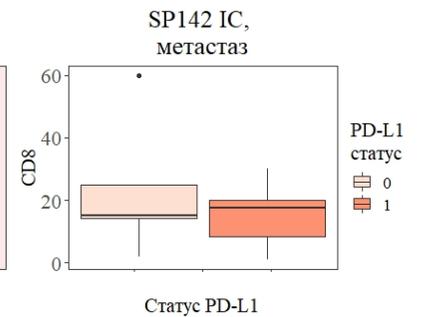
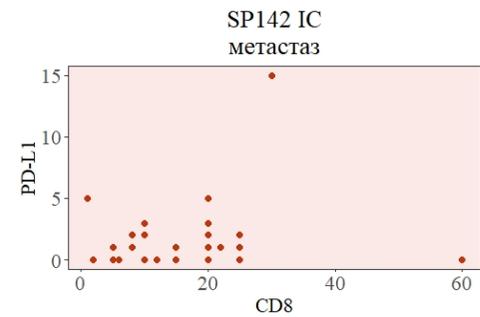
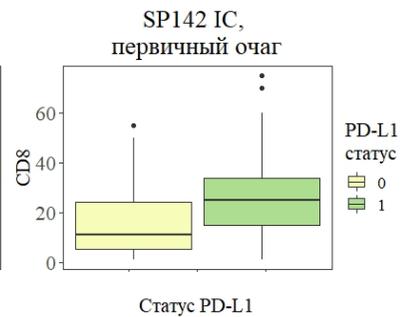
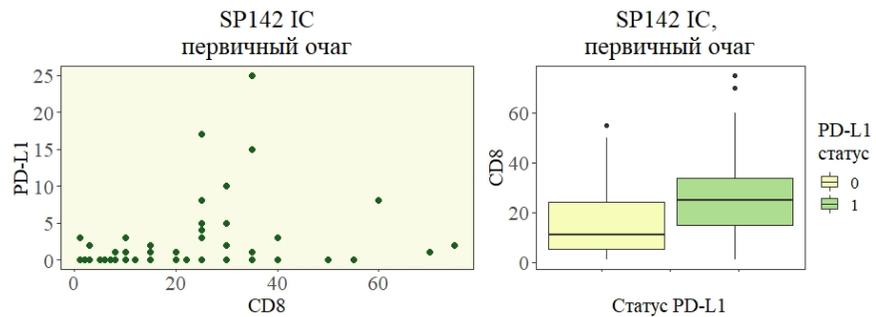
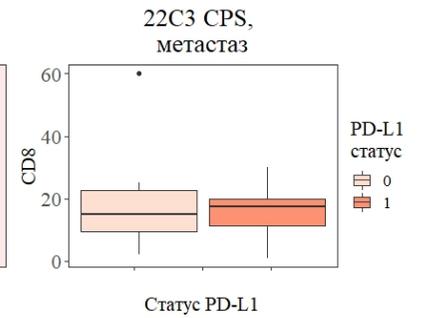
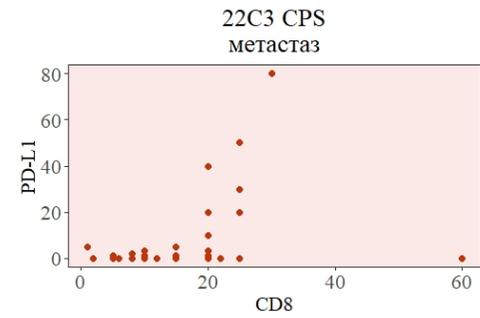
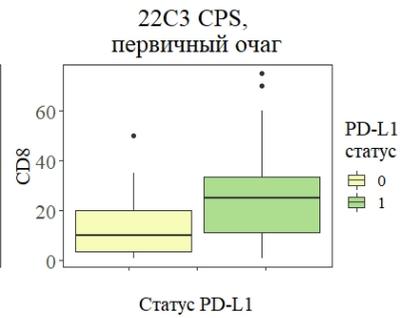
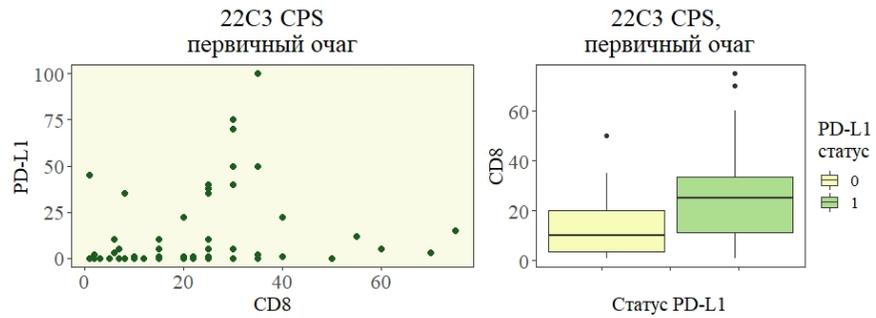
Как видно на боксплотах рисунка 3 уровень экспрессии CD8 в первичном очаге выше в PD-L1-позитивных опухолях. Эта разница достигла статистической значимости. Сравнение несвязанных выборок критерием Манна-Уитни показало статистически достоверное различие для первичного очага вне зависимости от используемой методики оценки PD-L1 статуса или клона ($p < 0,02$). Однако разница между уровнями экспрессии CD8 в метастазе не достигла статистической значимости во всех выборках ($p > 0,40$). Примеры окрашивания приведены на рисунке 4.

Сравнительный анализ экспрессии PD-L1 при различных молекулярно-биологических подтипах

Достоверные отличия PD-L1-статусов между суррогатными подтипами были получены только при использовании клона 22C3, методики CPS в первичном очаге ($p = 0,03157$) (таблица 3). Преобладание PD-L1-позитивных опухолей среди тройных негативных раков при использовании других методик оказалось статистически недоказанным ($p > 0,05194$).

Таблица 3 – Анализ PD-L1-статусов в зависимости от молекулярно-биологического подтипа

| Клон | Методика | Материал | P Критерий Фишера | Число степеней свободы | Доверительный уровень | p-value |
|-------------|-----------------|-----------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|
| 22C3 | CPS | Первичный очаг | 0,3625117 | 1 | 95% | 0,05194 |
| | | Метастаз | 0,2956605 | 1 | 95% | 0,1008 |
| SP142 | IC | Первичный очаг | 0,4837938 | 1 | 95% | 0,2088 |
| | | Метастаз | 0,7557101 | 1 | 95% | 0,7449 |
| 22C3 | IC | Первичный очаг | 0,3299157 | 1 | 95% | 0,02977 |
| | | Метастаз | 0,260349 | 1 | 95% | 0,08105 |



CD8

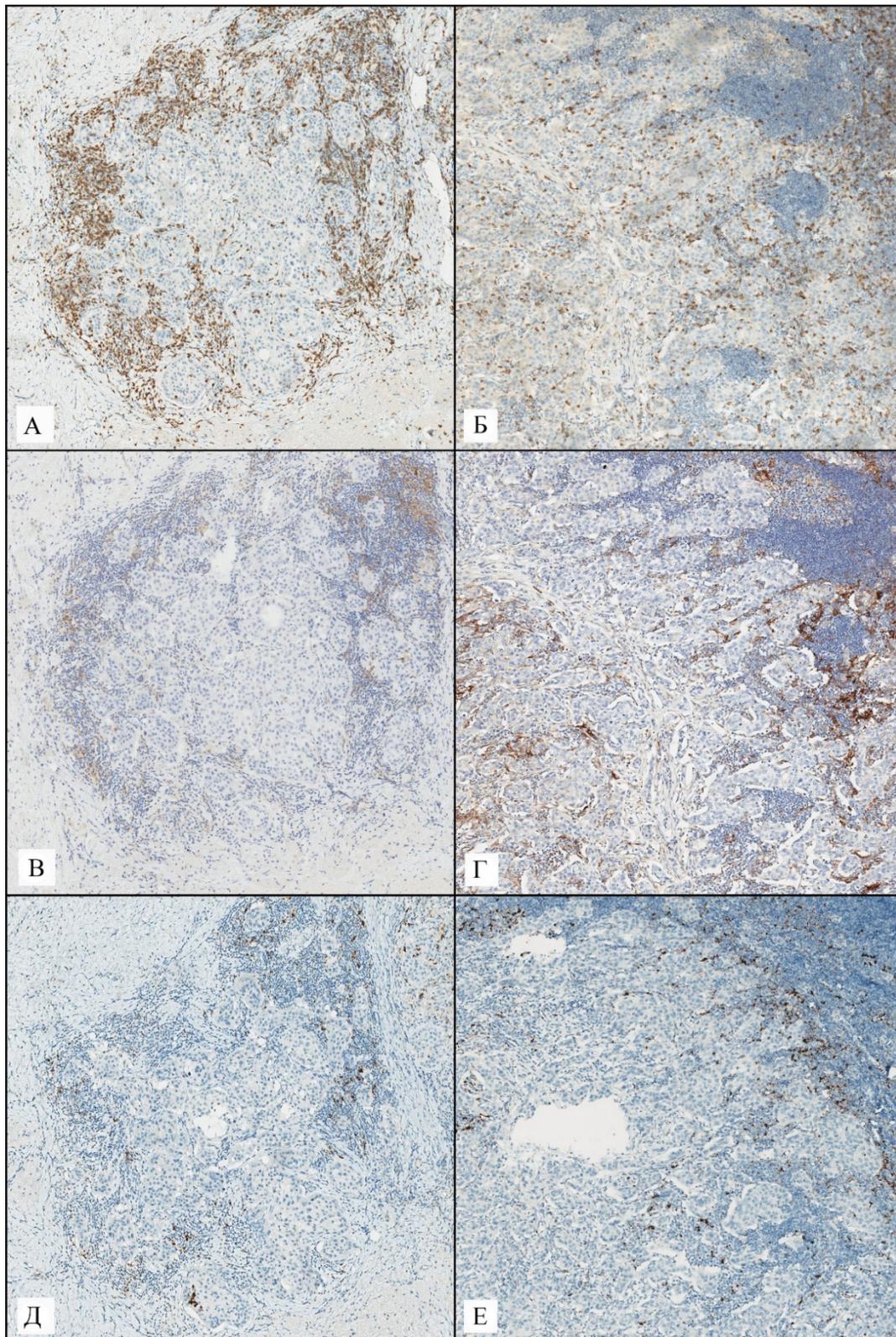


Рисунок 4 – Рак молочной железы: А, В, Д – первичный очаг, увеличение x10, Б, Г, Е – метастаз, увеличение x20; А, Б – исследование с антителами к CD8; В, Г - исследование с антителами к PD-L1 (клон 22C3); Д, Е - исследование с антителами к PD-L1 (клон SP142)

Анализ влияния неоадьювантной химиотерапии на характеристики опухоли

Для оценки влияния неоадьювантной терапии на уровень PD-L1 все пациентки были разделены на две группы: с оперативным лечением на первом этапе и неоадьювантной химиотерапией предшествующей операции. В опухолях без лечения достоверно чаще встречались позитивные первичные очаги ($p = 0.049$), в то время как в метастазах уровень статистической ошибки превысил 5% (рисунок 5).

Как удалось выяснить, класс остаточной опухолевой нагрузки также влияет на уровень экспрессии PD-L1. Достоверно более высокие уровни PD-L1 отмечались в опухолях с RCB-III по сравнению с RCB-II при использовании клона 22C3 методики CPS и клона SP142 методики IC в первичном очаге ($p < 0,02$). Однако при исследовании материалов метастаза заметная разница не получила статистического подтверждения ($p > 0,11$).

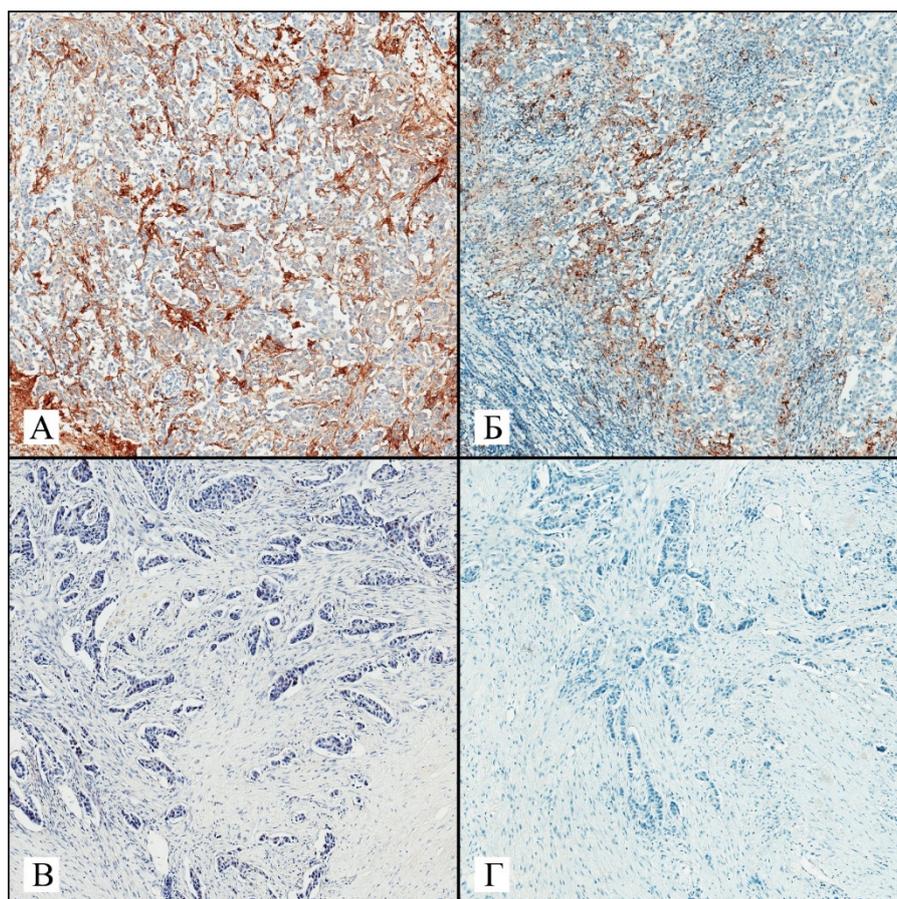


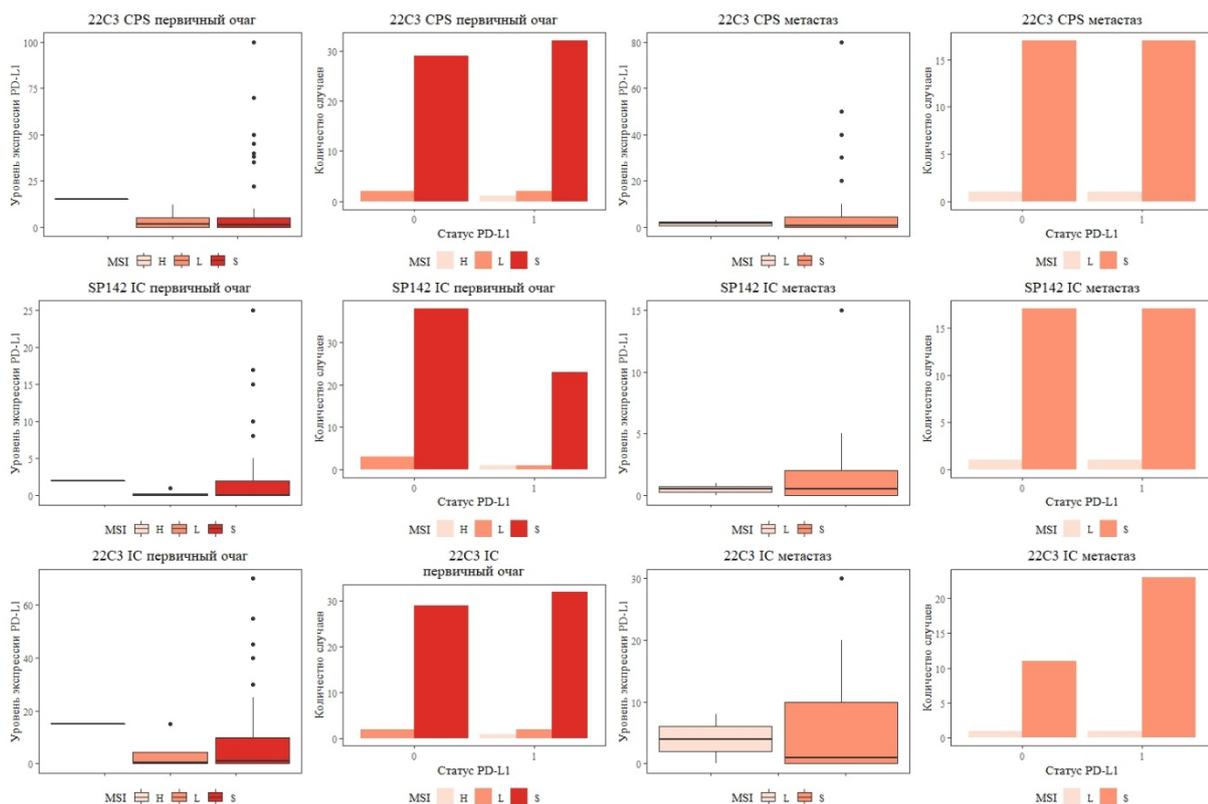
Рисунок 5 – Рак молочной железы: А – PD-L1-позитивная опухоль без предшествующего лечения, исследование с антителами PD-L1 22C3, увеличение $\times 20$; Б – PD-L1-позитивная опухоль без предшествующего лечения, исследование с антителами PD-L1 SP142, увеличение $\times 20$; В – PD-L1-негативная

опухоль, после неoadъювантной химиотерапии, исследование с антителами PD-L1 22C3, увеличение x10; Г – PD-L1-негативная опухоль, после неoadъювантной химиотерапии, исследование с антителами PD-L1 SP142, увеличение x10.

Преобладание PD-L1-позитивных случаев среди опухолей с высокой остаточной нагрузкой достигло статистической значимости только при использовании клона SP142 методики IC (p = 0,01). При использовании клона 22C3 или материала метастаза разница не выявлена.

Оценка микросателлитной нестабильности

При проведении анализа микросателлитной нестабильности было выявлено очень малое количество опухолей с наличием отклонений. Лишь в 7,58% случаев были обнаружены выпадения каких-либо маркеров, при этом только 1 случай (1,52%) получил статус MSI-H. К сожалению, ни один из анализируемых методов оценки PD-L1 не продемонстрировал статистически значимых отличий между опухолями с различным уровнем микросателлитной нестабильности (рисунок 6).



PD-L1 степени

микросателлитной нестабильности.

ВЫВОДЫ

1. Позитивный PD-L1-статус определяется чаще в тройном негативном раке молочной железы, чем в люминальном В, HER2-негативном подтипе как по результатам исследования с антителом 22С3 (37,04% и 62,22% для люминального В, HER2-негативного и тройного негативного подтипов соответственно), так и с антителом SP142 (28,93% и 42,22% соответственно).

2. Сопоставление результатов тестирования с использованием антител 22С3 и SP142 указывает на низкую чувствительность и невысокую специфичность анализа 22С3 (63,04% и 80,77% соответственно). Также достоверно различны показатели PD-L1-статуса при использовании данных антител (Хи-квадрат Мак-Немара 6,5; $p=0,01$)

3. Для оценки PD-L1-статуса можно использовать как материал из первичного очага, так и регионарный метастаз, так как статистически достоверных различий между образцами в исследовании получено не было.

4. Карциномы с высокой остаточной опухолевой нагрузкой (RCB-III) после лечения чаще PD-L1-позитивны, чем новообразования с RCB-II.

5. Имеется прямая корреляция между повышением уровня опухоли инфильтрующих лимфоцитов (TILs) и позитивным PD-L1-статусом.

6. В исследованной группе опухолей микросателлитная нестабильность выявлялась крайне редко (5 из 66 случаев, 7,58%), что, возможно, связано с низкой чувствительностью иммуногистохимического метода для рака данной локализации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Использование антител SP142 и 22С3 для определения статуса рака молочной железы не является взаимозаменяемым и выбор зависит от предполагаемого назначения конкретного иммунотерапевтического препарата. Для определения PD-L1-статуса пригоден материал как первичной опухоли (биопсийный и операционный), так и ткань метастаза.

После неoadъювантной химиотерапии целесообразно определение PD-L1-статуса в образованиях с высокой остаточной опухолевой нагрузкой (RCB-III).

При высоком уровне инфильтрации опухоли иммунными клетками также может быть проведен анализ на выявление экспрессии PD-L1, так как высока вероятность выявления позитивного статуса.

Необходимо использовать стандартный алгоритм исследования материала для оптимизации сроков проводимых исследований и выбора тактики лечения рака молочной железы (рисунок 7).

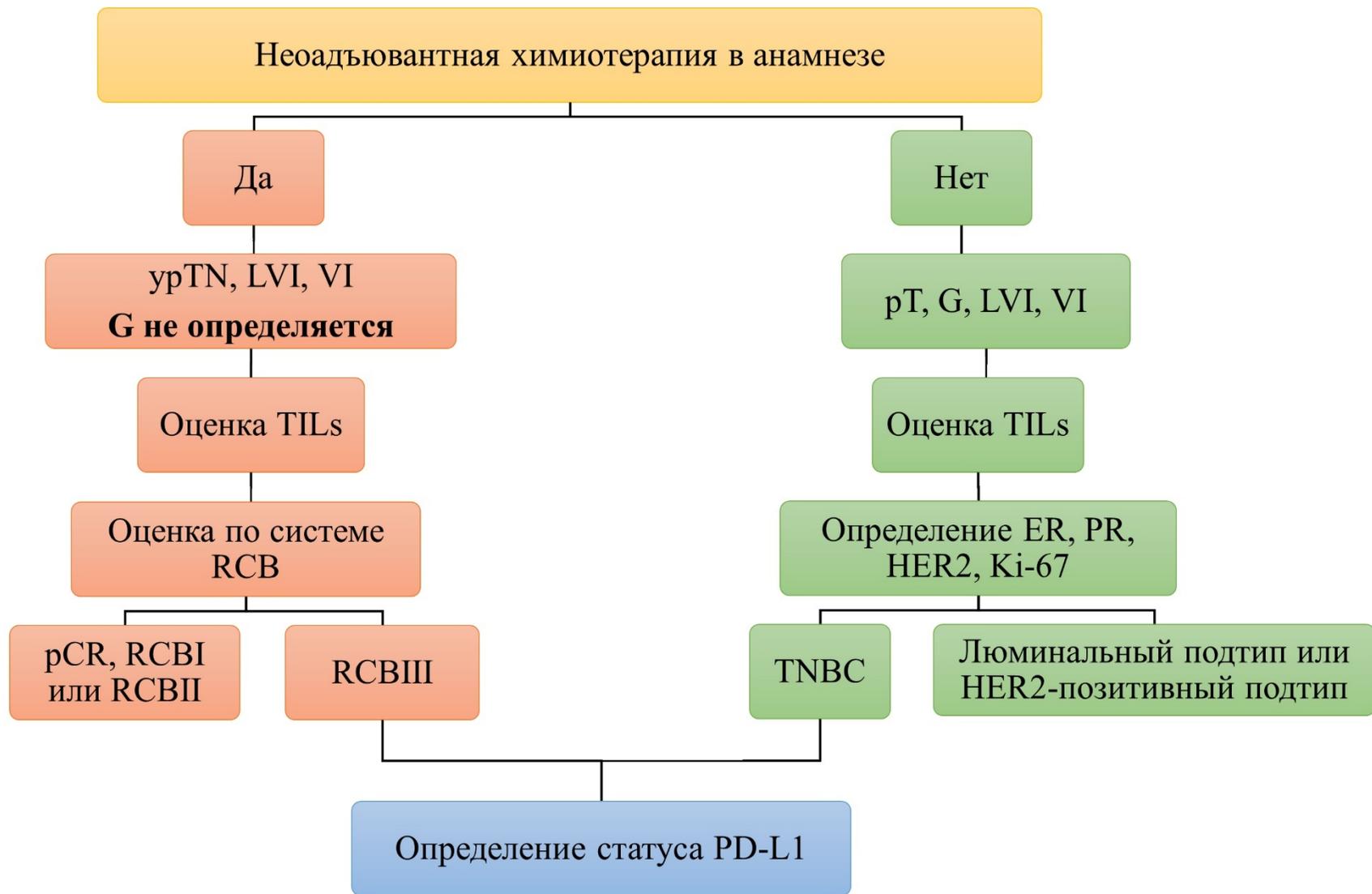


Рисунок 7 – Алгоритм исследования операционного материала рака молочной железы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение изученных клонов антител показало существенное различие между диагностикумами, которое невозможно преодолеть, изменяя методику интерпретации анализа. Гармонизация анализов определения PD-L1 статуса ТНРМЖ для применения в клинике на данный момент не представляется возможной. Использование материала регионарного метастаза является абсолютно оправданным, так как несмотря на разницу в количестве окрашенных клеток статус опухоли не отличается от такового в первичном очаге.

Анализ морфологических характеристик опухоли показал возможность выявления позитивного PD-L1-статуса у больных с люминальным В, HER2-негативным подтипом рака с высоким уровнем TILs. Корреляция стадии заболевания и возраста пациенток с PD-L1-статусом опухоли не выявлено. В то же время, получены значимые результаты при исследовании опухолей после проведенной неoadъювантной химиотерапии: карциномы с высокой остаточной опухолевой нагрузкой чаще оказывались PD-L1-позитивными, что дает потенциальную возможность использования иммунотерапии во второй линии.

Иммуногистохимическое определение микросателлитной нестабильности выявило малое количество опухолей, обладающих данным феноменом, учитывая данные литературы необходимо проведение исследования MSI с применением методов секвенирования.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективным направлением развития исследований в области данной темы является изучение влияния экспрессии PD-L1, выявленной в опухоли различными маркерами на объективный ответ опухоли на иммунотерапевтическое лечение, общую и безрецидивную выживаемость. Также перспективным является исследование других маркеров чувствительности опухоли к данному виду терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Франк Г. А., Кузнецова О. А., Завалишина Л. Э., Андреева Ю. Ю., Олюшина Е. М., Виноградов И. Ю., Виноградов М. И., Куликов Е. П., Шомова М. В. PD-L1-статус рака молочной железы / Г. А. Франк // Архив патологии. – 2019. – Т81. №2. – С. 3–9.
2. Франк Г. А., Кузнецова О. А., Завалишина Л. Э., Андреева Ю. Ю., Москвина Л. В. Исследование PD-L1-статуса рака молочной железы с использованием моноклонального антитела SP142 и перспективы для определения лечебной тактики. / Г. А. Франк // Архив патологии. – 2019. – Т81. – №5. – С. 5–10.
3. Франк Г. А., Кузнецова О. А., Завалишина Л. Э., Андреева Ю. Ю., Тюляндин С. А. Первый опыт PD-L1-тестирования тройного негативного рака молочной железы маркером SP142 в России. / Г. А. Франк // Архив патологии. – 2020. – Т82. – №3. – С. 5–15.
4. Кузнецова О. А., Завалишина Л. Э., Андреева Ю. Ю., Виноградов М. И., Шомова М. В., Франк Г. А. Иммуногистохимическое исследование маркеров MSI при раке молочной железы. / О. А. Кузнецова // Архив патологии. 2021. – Т83. – №1. – С. 12–17.
5. Кузнецова О. А., Завалишина Л. Э., Андреева Ю. Ю., Франк Г. А. Исследование PD-L1 статуса тройных негативных и люминальных В HER2-негативных карцином молочной железы. / О. А. Кузнецова // Злокачественные опухоли. – 2018. – Т8. – №3s1. – С. 133.
6. Frank G., Kuznetsova O., Zavalishina L., Andreeva Y, Shomova M., Vinogradov M. PD-L1 status in triple negative and luminal B HER2-negative breast carcinomas after neoadjuvant therapy. / G. Frank // Virchows Archiv. – 2019. – №475 (Suppl 1). – P. 85
7. Кузнецова О. А., Завалишина Л. Э., Андреева Ю. Ю., Москвина Л. Э., Франк Г. А. CD8 позитивные TILs в карциномах молочной железы с различным PD-L1 статусом. / О. А. Кузнецова, Л. Э. Завалишина, Ю. Ю. Андреева, Л. В. Москвина, Г. А. Франк // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т9. – №3s1. – С. 54–55.
8. Frank G., Kuznetsova O., Zavalishina L., Andreeva Y., Moskvina L., Karaseva V., Tjulandin S. PD-L1 status of triple negative breast cancer in Russia. / G. Frank // Virchows Archiv. – 2020. – №477 (Suppl 1). – P.232

Аннотация

На диссертацию Кузнецовой Ольги Александровны «Прогностическая роль морфологии и иммунотерапевтических маркеров рака молочной железы».

В настоящем диссертационном исследовании изучена роль иммунотерапевтических маркеров при тройном негативном и люминальном В, HER2-негативном раке молочной железы, определена прогностическая значимость степени остаточной опухолевой нагрузки (RCB) для выявления позитивного PD-L1-статуса. Анализ проведен при помощи двух вариантов диагностикума и различных методик оценки. Результаты исследования демонстрируют достоверную разницу между различными диагностикумами, применяемыми для определения PD-L1-статуса в опухолях молочной железы. Позитивный PD-L1-статус опухоли чаще был выявлен в опухолях с RCB-III, а также в опухолях без предшествующего неoadъювантного лечения. Иммуногистохимический метод определения микросателлитной нестабильности показал свою низкую чувствительность для опухолей молочной железы. Проведенное исследование позволило предложить оптимальный алгоритм иммуногистохимического исследования рака молочной железы.

Abstract

Kuznetsova Olga Aleksandrovna «Prognostic role of morphology and immunotherapeutic markers of breast cancer»

In this dissertation research, the role of immunotherapy markers in triple negative and luminal B, HER2-negative breast cancer was studied. The prognostic significance of the degree of residual tumor burden (RCB) for detecting positive PD-L1 status was determined. The analysis was carried out using two variants of diagnosticums and various assessment methods. The results of the study demonstrate a significant difference between two diagnosticums used to determine the PD-L1 status in breast tumors. The positive PD-L1 status of the tumor was more often detected in tumors with RCB-III, as well as in tumors without previous neoadjuvant treatment. The immunohistochemical method for determining microsatellite instability has shown its low sensitivity for breast tumors. The conducted research allowed us to propose an optimal algorithm for immunohistochemical research of breast cancer.