DOI: 10.26693/jmbs06.06.044

УДК 618.193-006.04-018.98-076.5-036

Волос Л. І., Дудаш А. П.

ОСОБЛИВОСТІ ЛІМФОЇДНОГО МІКРООТОЧЕННЯ В ІНВАЗИВНОМУ ПРОТОВОМУ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,
Україна

Метою дослідження було оцінити розподіл інфільтруючих пухлину Т-і В-лімфоцитів та NK-клітин в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози і встановити їх зв'язок зі ступенем диференціації пухлини.

Матеріали та методи. Основою наукової роботи стало комплексне морфологічне, в тому числі імуногістохімічне дослідження 193 випадків інвазивного протокового раку грудної залози. Загальногістологічна обробка зразків виконувалася відповідно до стандартної методики. Імуногістохімічні дослідження для CD3, CD20, CD56, ER, PR, c-erbB2, Ki-67 проводилися відповідно до протоколу виробника з необхідними контролюми. Ступінь злоякісності визначався за модифікованою схемою P. Scarff, H. Bloom і W. Richardson. Наявність, локалізацію та інтенсивність експресії діагностичних та прогностичних біомаркерів CD3, CD20 і CD56 -позитивних клітин (Т-, В- і NK клітин відповідно) визначали за допомогою відкритої, потужної програмної платформи QuPath для аналізу біообразжень.

Результати. Відмінності, отримані в даному дослідженні, варіювали в залежності від субпопуляцій імунних клітин і їх розташування в пухлинній тканині. Щільність Т- і В-лімфоцитів була більшою внутрішньопухлинно і біля інвазивного краю в нелюмінальних фенотипах в порівнянні з люмінальними А і В фенотипами. В порівнянні зі щільністю Т-лімфоцитів, В-клітинний інфільтрат був достовірно ($p < 0,01$) менш виражений в пухлинах як люмінального, так і нелюмінального фенотипів. Найменша щільність NK-клітин серед пухлино-інфільтруючих лімфоцитів виявлялася внутрішньопухлинно при люмінальних підтипах. Відсоток інфільтратів Т- і В-клітин як всередині пухлинного вогнища, так і на інвазивному краї, а також NK-клітин на інвазивному краї був значно нижче при раку G1 і G2, ніж при раку G3 ($p < 0,01$). Що стосується внутрішньопухлинних NK-клітин, відмінності були виявлені тільки між ступенем диференціації

G2 і G3, причому між G1 і G2 відмінності статистично не значущі ($p > 0,05$). Якісна й кількісна оцінка інтенсивності експресії Т- і В- та NK-клітин продемонструвала також різний ступінь експресії лімфоцитів в залежності від молекулярного підтипу і розташування інфільтрату. Люмінальний підтип А характеризувався достовірним переважанням помірної експресії (2+) CD3 як внутрішньопухлинно, так і на інвазивному краї пухлини ($p < 0,05$), в той час, як у люмінальному В та Her2+ фенотипах інтенсивність експресії CD3 переважала на рівні 1+. Потрійно негативні пухлини характеризувалися вираженою експресією (3+) CD3 внутрішньопухлинно і на інвазивному краї пухлини у всіх досліджуваних випадках.

Висновки. Пухлино-інфільтруючі лімфоцити в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози можна вважати прогностичним біомаркером. Отримані результати вказують на взаємозв'язок між лімфоїдним інфільтратом і ступенем диференціації при інвазивному протоковому раку грудної залози, особливо при його менш сприятливих молекулярних підтипах.

Ключові слова: інвазивний протоковий рак грудної залози, інфільтруючі пухлину лімфоцити.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано згідно НДР кафедри патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Вивчення патоморфологічних особливостей захворювань щитоподібної залози, серцево-судинної, травної, сечовидільної та репродуктивної систем і перинатального періоду з метою удосконалення їх морфологічної діагностики», № державної реєстрації 0118U000100.

Вступ. Рак грудної залози - одна з найпоширеніших злоякісних пухлин серед населення усього світу та найчастіша злоякісна пухлина у жінок [1]. Оскільки лікування раку грудної залози є

складним, необхідне більш широке розуміння біології цієї злоякісної пухлини. З точки зору прогнозу, морфології та молекулярної біології рак грудної залози розглядається сьогодні як гетерогенне захворювання, яке включає кілька суб'єктів з різною клінічною поведінкою. Навіть пухлини, що належать до одного гістологічного типу, можуть мати різний клінічний перебіг, і протоковий рак, який є найчисельнішою групою, демонструє найбільшу неоднорідність. На основі чітких генетичних закономірностей виділяють кілька молекулярних підтипів, що відрізняються за клінічною поведінкою [2, 3, 4]. Найвідоміші молекулярні підтипи раку грудної залози включають люмінальний А і В, нелюмінальний з гіперекспресією HER2-neu та потрійно-негативний [5]. Базальноподібний рак грудної залози є предметом активних дискусій, оскільки він збігається з потрійним негативним підтипом, але не є його синонімом.

Важливі теми у дослідженні раку грудної залози включають епігенетичні дослідження [6], дослідження пухлинного мікросередовища [7, 8] та дослідження додаткових імуногістохімічних факторів. На сьогоднішній день інфільтрат імунних клітин став новим прогностичним біомаркером цього злоякісного новоутворення [9, 10]. Запальний інфільтрат в мікрооточенні пухлини складається з безлічі популяцій клітин, які надають різноманітний вплив на пухлинні клітини, починаючи від стимулювання розвитку пухлини до пригнічення її росту. Взаємодія пухлинних та імунних клітин відбувається в результаті прямого міжклітинного контакту або опосередкованого молекулами, що походять з лімфоїдних клітин, наприклад рецептори, цитокіни і хемокини.

Проведені дослідження доводять взаємодію між неопластичними та імунними клітинами і вплив на результат лікування пацієнтів [11, 12]. Пухлинне мікрооточення включає лімфоїдні клітини, Т- і В-лімфоцити, інфільтруючі пухлину, а також натуральні кілери (NK). Активність субпопуляцій Т-клітин варіюється від цитотоксичності щодо злоякісних клітин і посилення протипухлинної відповіді до індукції імунотолерантності і пригнічення імунітету [13]. Автори також повідомляють, що інфільтруючі пухлину В-лімфоцити є джерелом протипухлинних антитіл [14]. В той час, NK-клітини, подібно до Т-клітин, схильні контролювати ріст пухлини та її поширення, чим і пояснюється їх цитотоксична активність [15].

Останнім часом у науковій літературі з'являється все більше публікацій, що на клітини, які інфільтрують пухлину, істотно впливають як ракові клітини, так й інші елементи мікрооточення. Кілька авторів припускали прогностичне значення щільності лімфоцитів, що інфільтрують пухлину,

та їх субпопуляцій при раку грудної залози [16], а деякі навіть вказували на те, що показники імунного походження можуть мати більшу прогностичну цінність, ніж маркери на основі пухлини [17].

Метод оцінки пухлино-інфільтруючих лімфоцитів на гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином був вперше представлений Denkert C. et al. [18]. Нещодавно були розроблені міжнародні керівні принципи як посібник для патологів щодо гармонізації оцінки цього нового біомаркера [12]. Стромальні пухлино-інфільтруючі лімфоцити визначаються як відсоток стромальної ділянки пухлини, що містить лімфоцитарний інфільтрат без прямого контакту з пухлинними клітинами. Внутрішньопухлинні (інтратуморальні) пухлино-інфільтруючі лімфоцити визначаються як внутрішньоепітеліальні моноклеарні клітини, що знаходяться в гніздах пухлинних клітин або безпосередньо контактують з пухлинними клітинами. При раку грудної залози пухлино-інфільтруючі лімфоцити зазвичай більше поширені у стромі порівняно з внутрішньопухлинними ділянками, і оцінка лімфоцитів у стромі виявилася як найбільш відтворюваний імунний параметр, оцінений патологоанатомами. Стандартизація оцінки пухлино-інфільтруючих лімфоцитів була основною метою Міжнародної робочої групи з імуно-онкологічних біомаркерів раку грудної залози, до складу якої входять патологи, онкологи та імунологи [12]. Робота цієї групи продемонструвала, що відтворюваність оцінки пухлино-інфільтруючих лімфоцитів можлива при раку грудної залози [18]. Це дослідження є важливим кроком на шляху до потенційного використання пухлино-інфільтруючих лімфоцитів як майбутнього біомаркера при раку грудної залози.

Таким чином, оцінка інфільтруючих пухлину лімфоцитів при раку грудної залози нещодавно була запропонована як новий, додатковий показник перебігу захворювання у пацієнта заради його можливої клінічної значущості. У майбутньому додаткові дослідження щодо участі імунних клітин у прогресуванні раку грудної залози можуть сприяти розвитку імунотерапії – нового терапевтичного підходу, спрямованого на викликання сильної ефективної протипухлинної відповіді, а також на позбавлення від ракових клітин, що вийшли з імунонагляду [19].

Мета дослідження. Оцінити розподіл інфільтруючих пухлину Т-і В-лімфоцитів та NK-клітин в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози і встановити їх зв'язок зі ступенем диференціації пухлини.

Матеріал та методи дослідження. Основою наукової роботи стало комплексне морфологічне, в тому числі імуногістохімічне дослідження 193 випадків інвазивного протокового раку грудної

залози. Цільова вибірка для дослідження формувалася ретроспективно із загального варіаційного ряду хворих на інфільтративний протоковий рак грудної залози. Дослідження базувалося на відомостях з історій хвороби та амбулаторних карт диспансерного спостереження пацієнток, котрі проходили спеціалізоване протипухлинне лікування на базі Комунального некомерційного підприємства Львівської Обласної Ради «Львівський онкологічний регіональний лікувально-діагностичний центр» у 2017 році. Формування вибірки відбувалося відповідно до завдань наукового дослідження.

Дослідження виконані з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р.

У всіх випадках діагноз був верифікований гістологічно. Виконувалося морфологічне дослідження операційного матеріалу із застосуванням світлового мікроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems GmbH). Дослідження проведено з дотриманням основних біоетичних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997 р.), Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964–2008 рр.), наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., ухвалене комісією з питань етики наукових досліджень Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Основними показниками, які бралися до уваги і утворювали поріг включення, були характеристики онкологічного процесу, зокрема клінічно, рентгенологічно (мамографічно), ультрасонографічно, МРТ і морфологічно верифікований інфільтративний протоковий рак грудної залози без віддалених метастазів (M0), відсутність (N0) чи наявність регіонарної лімфаденопатії з морфологічно підтвердженим онкологічним походженням, що відповідає критеріям N1-3, виключення неoad'ювантного лікування. З урахуванням того, що досліджуваний матеріал набрався за 2017 рік, згідно з національними та міжнародними рекомендаціями використовувалася класифікація TNM сьомого видання.

Після проведення якісного аналізу клініко-патоморфологічної інформації, а саме стандартизації за віковими, клінічними та гістологічними параметрами вибірка із 193 хворих була розподілена на основі статусу експресії ER / PR / HER2 / neu та Ki-67 на чотири молекулярні підтипи відповідно

до консенсусних визначень молекулярних підтипів St. Gallen 2015 [20] і сформовані наступні когорти: люмінальний А підтип (79 випадків); люмінальний В підтип (43 випадки); Her2/neu (39 випадків); потрійно-негативний (32 випадки).

Гістологічний тип раку встановлювався відповідно до рекомендацій BOOЗ [21]. Ступінь злоякісності визначався за модифікованою схемою P. Scarff, H. Bloom і W. Richardson [22].

Загальногістологічна обробка зразків виконувалася відповідно до стандартної методики. Імуногістохімічні дослідження проводили в серійних парафінових зрізах тканини пухлини з використанням моноклональних антитіл відповідно до стандартного протоколу. Демаскування антигену проводили шляхом інкубації зразків в Трис-ЕДТА (pH = 9,0) буфері при 97° С на водяній бані протягом 30 хвилин, пригнічували активність ендогенної пероксидази 3 % розчином перекису водню та наносили блокуючу сироватку.

Інкубацію з первинними антитілами проводили згідно інструкцій фірм-виробників, візуалізацію ІГХ-реакції виконували з використанням системи детекції DAKO EnVision+System з діамінобензином («DAKO», США). Зрізи дозобарвлювали гематоксиліном Майєра та заключали в канадський бальзам. Імуногістохімічне дослідження (ІГХ) для CD3 (моноклональні кролячі антитіла, Clone SP7, Thermo scientific), CD20 (моноклональні мишачі антитіла, Clone L26, Thermo scientific), CD56 (моноклональні мишачі антитіла, Clone 123C3 Thermo scientific), рецептора естрогену ER (моноклональні кролячі антитіла, Clone SP1, Dako), рецептора прогестерону PR (моноклональні мишачі антитіла PgR 636, Dako Flex), c-erbB2 (моноклональні кролячі антитіла до Her2-neu, Clone SP3, Thermo scientific) і білка Ki-67 (моноклональні мишачі антитіла, clone MIB-1, Dako) проводилося відповідно до протоколу виробника з необхідними контролюми. Для зразків зі статусом HER2-neu 2+ за результатами імуногістохімічного дослідження була проведена флуоресцентна гібридизація in situ (FISH).

Оцінка імуногістохімічного забарвлення. Предметні скельця з гістологічними зрізами, пофарбованими на CD3, CD20 і CD56, досліджували в оптичному мікроскопі Leica DM750 при малому збільшенні (×25), щоб вибрати ділянки з найбільшим позитивним інфільтратом клітин. У дослідницьких цілях до дослідження застосовувалися три системи оцінки:

1. Щільність досліджених CD3- і CD20-позитивних клітин (Т- і В-клітин відповідно) оцінювали при збільшенні (×200) як відсоток позитивно забарвлених клітин інфільтрату до загальної кількості в полі зору. Клітини, розташовані не далі за

одного 100-кратного поля від краю пухлини, вважалися «інвазивним краєм». Внутрішньопухлинну популяцію визначали як позитивно забарвлені клітини, розташовані всередині острівців пухлинних клітин або оточуючих пухлинних острівців, з прямим контактом з неопластичною тканиною. Щільність клітин оцінювали як середнє значення (%), отримане в 5 полях потужності найвищого лімфоїдного інфільтрату.

2. Інтенсивність інфільтрату CD3- і CD20-позитивних клітин додатково оцінювали відповідно до візуально-аналогової шкали. Позитивною реакцією вважали забарвлення клітин коричневого кольору з різною інтенсивністю. Оцінка була наступною: 0 - немає, 1 - слабка, 2 - помірна, 3 - інтенсивний лімфоїдний інфільтрат. Ступінь інтенсивності також визначали у відсотках до позитивно забарвлених клітин інфільтрату.
3. Для оцінки CD56-позитивних (NK) клітин позитивно забарвлені клітини досліджували при збільшенні ($\times 200$) і вибирали ділянки з найбільшою кількістю позитивних клітин. Потім позитивно забарвлені клітини підраховували в п'яти полях з високим збільшенням ($\times 400$, площа поля займає $0,2 \text{ мм}^2$), які представляли 1 мм^2 досліджуваної тканини. Клітини, розташовані не далі за одного поля від краю пухлини, вважалися «інвазивним краєм». Внутрішньопухлинно популяцію визначали як позитивно забарвлені клітини, розташовані всередині острівців пухлинних клітин, або позитивно забарвлені клітини, що оточують пухлинні острівці, з прямим контактом з неопластичною тканиною.

Наявність, локалізацію та інтенсивність експресії ключових діагностичних, прогностичних та прогностичних біомаркерів CD3, CD20 і CD56 -позитивних клітин (Т-, В- і NK клітин відповідно) у зрізах тканини інвазивного протокового раку грудної залози, виявлених за допомогою антитіл і систем детекції на основі хромогенних речовин, визначали за допомогою відкритої, потужної програмної платформи QuPath для аналізу біозображень. Вбудовані алгоритми сегментації клітин QuPath можуть виявляти потенційно велику кількість клітин як об'єкти в межах одного поля зору, на додаток до вимірювання клітинної морфології та експресії біомаркерів. QuPath також підтримує класифікацію різних типів клітин відповідно до цих ознак, щоб створити комплексний фенотиповий опис кожної клітини у зразку тканини. Це, у свою чергу, забез-

печує кількісну клітинну карту всього зрізу тканини, яку згодом можна вибрати, запитати та відфільтрувати, щоб отримати дані зображення та виявити морфологічні тонкощі, які не відразу помітні під час традиційної патогістологічної оцінки. Все це, як правило, можна досягти за лічені хвилини, не вимагаючи спеціального обладнання.

Позитивна експресія ER і PR була встановлена, коли $\geq 1\%$ неопластичних клітин показали позитивне імунозабарвлення. Поріг розрізнення між низькою і високою експресією Ki-67 був встановлений на рівні $\geq 20\%$ позитивних клітин. Оцінка фарбування HER2-neu проводилася за стандартним методом [23].

Статистична обробка результатів дослідження. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою персонального комп'ютера, для аналізу даних використаний статистичний пакет Statistica® for Windows 13.0 (StatSoft Inc., ліцензія №JPZ804I382130ARCN10-J). Для всіх видів аналізу відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. У теперішнє дослідження увійшли профайли 193 пацієнтів з інвазивним протоковим раком грудної залози. Середній вік хворих на момент постановки діагнозу становив 54,7 років (діапазон: 28-85 років). Що стосується стадії захворювання, то переважали II і III стадії, відповідно 89 (46,11%) і 64 (33,16%) випадків. У 40 (20,73%) спостереженнях було діагностовано I стадію захворювання. Розміри пухлин грудної залози були наступні: pT1 - 61 (31,61%), pT2 - 96 (49,74%), pT3 - 19 (9,84%), pT4 - 17 (8,81%). Статус лімфатичних вузлів показав ураження (pN1-3) у понад 50,0% пацієнтів. Розподіл за гістологічним ступенем злоскісності (G) був наступним: G1 - 16 (8,29%), G2 - 129 (66,84%), G3 - 47 (24,35%) і G4 - 1 (0,52%) випадків. Молекулярні підтипи включали люмінальний А - 79 (40,93%), люмінальний В - 43 (22,28%), нелюмінальний HER2-neu позитивний - 39 (20,21%) і потрійний негативний рак грудної залози (TNBC) - 32 (16,58%) випадків.

Визначено особливості лімфоїдного мікрооточення та відмінності в лімфоцитарному інфільтраті між відповідними молекулярними підтипами раку грудної залози. Досліджено пухлини люмінального та нелюмінального фенотипів відповідно з рекомендаціями St Gallen 2015, зайняті інфільтратом з Т-клітин, В-клітин та NK-клітин.

Щільність Т-клітин, В-клітин та NK-клітин з урахуванням молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози та статусу HER2-neu представлено у **таблиці 1**. Значення вимірювали як відсоток позитивно забарвлених імунних клітин до загальної кількості клітин в полі зору.

Таблиця 1 – Морфометричні параметри Т-клітин, В-клітин та НК-клітин з урахуванням молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози; значення вимірювали як відсоток позитивно забарвлених імунних клітини до загальної кількості клітин в полі зору

Молекулярний підтип	Т-лімфоцити (CD3)		В-лімфоцити (CD20)		NK (CD56)	
	внутрішньо-пухлинні (%)	інвазивний край (%)	внутрішньо-пухлинні (%)	інвазивний край (%)	внутрішньо-пухлинні (%)	інвазивний край (%)
Люмінальний А підтип	7,15±0,13	18,75±0,64	3,21±0,12	6,66±0,15	1,02±0,03	4,39±0,12
Люмінальний В підтип/ HER2 +	14,85±0,21	39,98±3,24	5,44±0,16	17,88±0,75	1,24±0,07	5,14±0,18
Люмінальний В підтип /Ki-67 ≥20%	9,75±0,25	27,83±2,17	3,54±0,11	12,57±0,43	1,12±0,04	4,73±0,16
HER2-neu +/- нелюмінальний	23,73±1,34	45,94±2,13	5,76±0,13	25,82±1,19	2,25±0,06	6,39±0,11
Потрійно-негативний (TNBC)	28,15±2,13	48,57±2,25	6,31±0,19	20,15±0,72	2,42±0,08	7,76±0,13

Щільність Т- і В-лімфоцитів була більшою внутрішньопухлинно і біля інвазивного краю в нелюмінальних фенотипах в порівнянні з люмінальними А і В фенотипами. Щільність внутрішньопухлинних Т-лімфоцитів була найвищою в потрійному негативному раку і значно достовірно переважала за щільність в люмінальному підтипі А ($p < 0,01$).

Аналогічним чином, люмінальний підтип А характеризувався нижчою щільністю Т-лімфоцитів біля інвазивного краю в порівнянні з потрійними

негативними пухлинами, HER2-neu позитивними і люмінальним підтипом В ($p < 0,01$) (рис. 1).

Для субпопуляції В-лімфоцитів щільність CD20 також збільшувалася від пухлин люмінального фенотипу до нелюмінальних потрійно негативних і HER2-neu позитивних пухлин. В-клітинний інфільтрат на інвазивному краї був більш виразний в пухлинах нелюмінального фенотипу. Але в порівнянні зі щільністю Т-лімфоцитів, В-клітинний інфільтрат був достовірно ($p < 0,01$) менш вираже-

Рис. 1 – Т-лімфоцити біля інвазивного краю протокового раку грудної залози. А – Люмінальний підтип А; В – люмінальний В підтип; С – Her2/neu+; D – потрійно-негативний молекулярний підтип. Імуногістохімічне дослідження (ІГХ) для CD3 (моноклональні кролячі антитіла, Clone SP7, Thermo scientific). ×200

ний в пухлинах як люмінального, так і нелюмінального фенотипів (рис. 2).

Що стосується NK-клітин, то щільність розподілу натуральних кілерів була найнижчою в порівнянні з субпопуляціями Т- і В-лімфоцитів, як інтра-туморально, так і на інвазивному краї пухлин люмі-

нального та нелюмінального фенотипів ($p < 0,001$) (рис. 3).

При дослідженні Т-лімфоцитарного інфільтрату в люмінальному фенотипі пухлин найбільша щільність CD3 виявлена на інвазивному краї люмінального B/ HER2 + в порівнянні з люмінальним A

Рис. 2 – В-лімфоцити біля інвазивного краю протокового раку грудної залози. А - Люмінальний А підтип; В – люмінальний В підтип /Ki-67 ≥ 20%; С – Her2/neu+; D – потрійно-негативний молекулярний підтип. Імуногістохімічне дослідження (ІГХ) для CD20 (моноклональні мишачі антитіла, Clone L26, Thermo scientific). ×200. Інтенсивність експресії В-лімфоцитів

Рис. 3 – NK-лімфоцити біля інвазивного краю протокового раку грудної залози. А - Люмінальний підтип А; В – люмінальний В підтип /Ki-67 ≥ 20%; С – Her2/neu+; D – потрійно-негативний молекулярний підтип. Імуногістохімічне дослідження (ІГХ) для CD56 (моноклональні мишачі антитіла, Clone 123C3, Thermo scientific). ×200. Інтенсивність експресії NK-лімфоцитів на рівні 1+

і люмінальним В /Ki-67 позитивним, відповідно до класифікації Санкт-Галлена 2015 і 2013 років (Ki-67 $\geq 20\%$ і $\geq 14\%$ відповідно), ($p < 0,05$).

Підвищена кількість Т- і В-лімфоцитів на краю інвазії також спостерігалася в пухлинах з надекспресією HER2-неу, як при оцінці у відсотках від загальної кількості клітин в тканині пухлини, так і відповідно до візуально-аналогової шкали.

Якісна й кількісна оцінка інтенсивності експресії Т- і В- та NK-клітин продемонструвала також різний ступінь експресії лімфоцитів в залежності від молекулярного підтипу і розташування інфільтрату. Люмінальний підтип А характеризувався достовірним переважанням помірної експресії (2+) CD3 як внутрішньопухлинно, так і на інвазивному краї пухлини ($p < 0,05$), в той час, як у люмінальному В та Her2+ фенотипах інтенсивність експресії CD3 переважала на рівні 1+. Потрійно негативні пухлини характеризувалися вираженою експресією

(3+) CD3 внутрішньопухлинно і на інвазивному краї пухлини у всіх досліджуваних випадках.

Інтенсивність експресії В-клітин (CD20) характеризувалася слабким ступенем на рівні 1+ у люмінальному А фенотипі, 2+ – у люмінальному В і Her2+ фенотипах, а в потрійно-негативному раку детекція відповідно до візуально-аналогової шкали демонструвала найвищу інтенсивність на рівні 3+. Щодо NK-клітин (CD56), то інтенсивність їх експресії була слабкою (1+) у всіх молекулярних підтипах.

Досліджено зв'язок між лімфоцитарним інфільтратом та ступенем диференціації (G) пухлини як прогностичним показником інвазивного протокового раку грудної залози. Для всіх проаналізованих популяцій імунних клітин відсоток лімфоцитів, що інфільтрували пухлину, значно відрізнявся між ураженнями відповідного гістологічного ступеня за модифікованою схемою P. Scarff, H. Bloom і W. Richardson [24] (табл. 2).

Таблиця 2 – Морфометричні параметри Т-клітин, В-клітин та NK-клітин в інвазивному протоковому раку грудної залози різного ступеня диференціації; значення вимірювали як відсоток позитивно забарвлених імунних клітин до загальної кількості пухлинних клітин в полі зору

Ступінь диференціації (G)	Т-лімфоцити (CD3)		В-лімфоцити (CD20)		NK (CD56)	
	внутрішньопухлинні, %, р	інвазивний край, %, р	внутрішньопухлинні, %, р	інвазивний край, %, р	внутрішньопухлинні, %, р	інвазивний край, %, р
G1	4,27 $\pm$ 0,12	17,38 $\pm$ 0,21	2,15 $\pm$ 0,13	11,57 $\pm$ 0,39	0,91 $\pm$ 0,05	4,93 $\pm$ 0,15
G2	6,35 $\pm$ 0,15	29,13 $\pm$ 2,53	3,17 $\pm$ 0,12	15,43 $\pm$ 0,21	1,16 $\pm$ 0,25	5,67 $\pm$ 0,13
G3	17,89 $\pm$ 0,37	46,35 $\pm$ 2,76	5,27 $\pm$ 0,34	21,17 $\pm$ 0,35	2,13 $\pm$ 0,24	7,23 $\pm$ 0,18

Відсоток інфільтратів Т- і В-клітин як всередині пухлинного вогнища, так і на інвазивному краї, а також NK-клітин на інвазивному краї був значно нижче при раку G1 і G2, ніж при раку G3 ($p < 0,01$). Що стосується внутрішньопухлинних NK-клітин, відмінності були виявлені тільки між ступенем диференціації G2 і G3, причому між G1 і G2 відмінності статистично не значущі ($p > 0,05$).

На сьогодні добре відомо, що визначення молекулярних підтипів є золотим стандартом для лікування раку грудної залози, водночас інформація про взаємозв'язок між молекулярним та імунним фенотипами пухлини є мізерною і, певною мірою, непереконливою, а подекуди і суперечною. Було висловлено припущення, що більш рясний інфільтрат лімфоцитів, що спостерігається деякими авторами в нелюмінальних пухлинах раку грудної залози, у порівнянні з люмінальними, пов'язаний з їх більш агресивним профілем, генетичною нестабільністю, експресією HLA-G і різним метаболізмом [25]. Більш того, інтенсивна імунна інфільтрація, а також більш високий рівень цитокінів були зареєстровані в пухлинах грудної залози високого ступеня злоякісності і негативних відносно рецепторів гормонів [26] і з надекспресією HER-2 [27].

В окремих дослідженнях було показано, що клініко-патологічне значення лімфоїдного мікросередовища при раку грудної залози залежить від фенотипу пухлини і варіює від їх протипухлинних до протуморогенних властивостей, оскільки більш виражений лімфоцитарний інфільтрат був пов'язаний або з більш сприятливим прогнозом при потрійно негативному раку, або з ER- / HER2+ раку, або з несприятливим результатом для пацієнтів з ER+ раком [25, 27]. Аналогічним чином Nagalla et al. спостерігали, що експресія імунного гена була або корисним показником віддаленої виживаності без метастазів при високому ступені проліферативної активності пухлини, або несприятливим чинником при низькопроліферативному раку [28]. Це також підтверджується іншими дослідженнями, в яких зазначено, що вплив імунного мутагену на прогноз залежить як від молекулярного підтипу, так і від статусу проліферації пухлини грудної залози [29]. Дослідження вітчизняних авторів показали, що рівень запальної інфільтрації при різних гістологічних типах раку грудної залози демонстрував зростання імунної відповіді зі зниженням диференціювання раку. Авторами було відзначено тенденцію до збільшення інфільтрації

при зростанні поліморфізму пухлинних клітин. За їхніми даними, це свідчило про більш виражену реакцію макроорганізму у випадку прогресування анаплазії клітини, але чіткого взаємозв'язку між ступенем злоякісності інвазивного раку грудної залози і типом запального інфільтрату ними не виявлено [30].

У даному дослідженні рясний інфільтрат Т-клітин був пов'язаний з більш агресивними молекулярними підтипами раку грудної залози, зокрема потрійно негативним, HER2+нелюмінальним і люмінальним В /HER2+. Більше того, відмінності між пухлинами люмінального А фенотипу і потрійно негативного стосувалися як внутрішньопухлинної інфільтрації, так і мікрооточення на інвазивному краї. Аналогічне спостереження було зроблено Cimino-Matthews et al., які описали більш високу інфільтрацію Т-клітин в потрійно негативному раку грудної залози в порівнянні з пухлинами люмінального фенотипу [31].

Деякі автори постулюють зв'язок між кількістю Т-клітин, інфільтруючих пухлину, і гормононегативністю [32], що узгоджується з даними результатами. Також відзначено, що серед пухлин люмінального фенотипу найвища щільність Т-клітин, розташованих на інвазивному краї, була в люмінальному В / HER2 + фенотипі. Таким чином, припускаємо, що надлишкова експресія HER2 впливає на відповідь Т-лімфоцитів в більшій мірі, ніж досягається за рахунок більш високої проліферації і зниження рівня рецепторів гормону, бо саме індекс проліферативної активності Ki-67 і Her2/neu розмежовують люмінальний А і В фенотипи. Спостереження про те, що Т-клітини більш численні в пухлинах грудної залози високого ступеня злоякісності, гормононегативних, ніж в більш диференційованих ураженнях, підтверджується також результатами інших дослідницьких груп [33].

Взаємозв'язок між Т-клітинами і раком грудної залози досить складний. Fu et al. запропонував гіпотезу про вплив Т-клітин на функцію фібробластів, що, в свою чергу, може сприяти прогресуванню пухлини [34]. З іншого боку, підвищений відсоток цитотоксичних Т-клітин у вогнищі первинної пухлини грудної залози може вказувати на сприятливий прогноз [35]. Дане дослідження показало, що великий відсоток Т-клітин був пов'язаний з несприятливими патологічними прогностичними факторами, такими як ступінь диференціації пухлини (G3) і надекспресія HER2.

На сьогоднішній день роль В-лімфоцитів в інвазивному протоковому раку є до кінця невідомою. Miligy I. зі співавт. [36] досліджено інфільтруючі пухлину В-лімфоцити і показано, що В-лімфоцити є важливою складовою імунної відповіді і мають прогностичне значення при раку

грудної залози. Авторами встановлено, що випадки інвазивного протокового раку грудної залози з В-лімфоцитами високої щільності, незалежно від їх розташування або топографічного розподілу, суттєво асоціювалися з несприятливим прогнозом, включаючи великі розміри, низький ступінь диференціації, лімфосудинну інвазію, метастази в лімфатичні вузли, ER/ PR-негативний і статус HER2+, що узгоджується з результатами даного дослідження. Крім того, аналіз результатів показав, що випадки, асоційовані з більшою кількістю В-лімфоцитів, мали менший інтервал безрецидивного перебігу пухлинного процесу ($P = 0,04$).

Результати даного дослідження також показали, що високий рівень інфільтрату В-клітин корелював з відсутністю експресії ER і PR і з базальним фенотипом як на інвазивному краї, так і внутрішньопухлинно. Відповідно, спостерігалось збільшення В-клітин в нелюмінальних HER2+ і потрійно негативних фенотипах інвазивного протокового раку грудної залози. Люмінальні А і В фенотипи були менш інфільтровані В-клітинами. Цікаво, що в даних дослідженнях спостерігалися значно більш високі кількості В-клітин в G3 ступені диференціації порівняно з G2 і G1, хоча деякі автори не спостерігали жодного зв'язку з диференціюванням раку [37]. Подібно до підгрупи Т-лімфоцитів, середня кількість В-лімфоцитів була вищою в люмінальному В / HER2 +, ніж в інших пухлинах люмінального фенотипу. Відомо, що пухлинні лімфоцити виявляють здатність експресувати металопротеїнази, які опосередковують рекрутування інших імунних клітин і, отже, сприяють прогресуванню раку.

Опублікована література про взаємозв'язок між кількістю NK-клітин і молекулярним підтипом інвазивного протокового раку грудної залози нечисленна. Є поодинокі роботи, в яких автори вважають, що підвищена кількість NK-клітин є одним з прогностичних факторів при люмінальному раку А [38]. Виявлено, що інфільтрат NK-клітин менше численний в люмінальних фенотипах в порівнянні з потрійно-негативними пухлинами і HER2 +. Більш висока внутрішньопухлинна інфільтрація NK-клітин, яка спостерігається при раку грудної залози, була пов'язана зі ступенем G3 і ураженням лімфатичних вузлів. Також високий гістологічний клас був пов'язаний з більш численними NK-клітинами на інвазивному краї. Крім того, деякі автори відзначили відсутність NK-клітин в інвазивних пухлинах грудної залози [39], що суперечить даним дослідженням.

Передбачається, що зміни в кількості відповідних популяцій імунних клітин можуть відображати збільшення загального числа пухлино-інфільтруючих лімфоцитів [12].

Висновки. Результати дослідження залежали від субпопуляцій імунних клітин і їх розташування в пухлинній тканині. Щільність Т- і В-лімфоцитів була більшою внутрішньопухлинно і біля інвазивного краю в нелюмінальних фенотипах в порівнянні з люмінальними А і В фенотипами. Щільність внутрішньопухлинних Т-лімфоцитів була найвищою в потрійному негативному раку і значно достовірно переважала за щільність в люмінальному підтипі А.

В-клітинний інфільтрат на інвазивному краї був більш виразний в пухлинах нелюмінального фенотипу. Але в порівнянні зі щільністю Т-лімфоцитів, В-клітинний інфільтрат був достовірно ($p < 0,01$) менш виражений в пухлинах як люмінального, так і нелюмінального фенотипів.

Найменша щільність NK-клітин серед пухлино-інфільтруючих лімфоцитів виявлялася внутрішньопухлинно при люмінальних підтипах. Беручи до уваги «природні» властивості лімфоцитів, функції Т-, В- або NK-клітин, мабуть, змінюються в мікрооточенні раку як внутрішньопухлинно, так і в стромі пухлини.

Отримані результати вказують на взаємозв'язок між лімфоїдним інфільтратом і ступенем диференціації при інвазивному протоковому раку грудної залози, особливо при його менш сприятливих молекулярних підтипах.

Відсоток інфільтратів Т- і В-клітин як всередині пухлинного вогнища, так і на інвазивному краї, а також NK-клітин на інвазивному краї був значно нижче при раку G1 і G2, ніж при раку G3 ($p < 0,01$). Що стосується внутрішньопухлинних NK-клітин, відмінності були виявлені тільки між ступенем диференціації G2 і G3, причому між G1 і G2 відмінності статистично не значущі ($p > 0,05$).

Якісна й кількісна оцінка інтенсивності експресії Т- і В- та NK-клітин продемонструвала також різний ступінь експресії лімфоцитів в залежності від молекулярного підтипу і розташування інфільтрату. Люмінальний підтип А характеризувався достовірним переважанням помірної експресії (2+) CD3 як внутрішньопухлинно, так і на інвазивному краї пухлини ($p < 0,05$), в той час, як у люмінальному В та Her2+ фенотипах інтенсивність експресії CD3 переважала на рівні 1+. Потрібно негативні пухлини характеризувалися вираженою експресією (3+) CD3 внутрішньопухлинно і на інвазивному краї пухлини у всіх досліджуваних випадках.

Перспективи подальших досліджень. На нашу думку, необхідні подальші дослідження пухлинного мікросередовища для з'ясування складних взаємин з молекулярними підтипами інвазивного протокового раку грудної залози.

References

1. WHO, 2021 Breast cancer now most common form of cancer: WHO taking action. Available from: <https://www.who.int/news/item/03-02-2021-breast-cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action>
2. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52. PMID: 10963602. doi: 10.1038/35021093
3. Sørlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer*. 2004;40:2667-2675. PMID: 15571950. doi: 10.1016/j.ejca.2004.08.021
4. Strehl JD, Wachter DL, Fasching PA, Beckmann MW, Hartmann A. Invasive breast cancer: recognition of molecular subtypes. *Breast Care*. 2011;6:258-64. PMID: 22135623. PMCID: PMC3225209. doi: 10.1159/000331339
5. Guarneri V, Conte PF. Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *Oncologist*. 2009;14:645-656. PMID: 19608638. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0078
6. Huang Y, Nayak S, Jankowitz R, Davidson NE, Oesterreich S. Epigenetics in breast cancer: what's new? *Breast Cancer Res*. 2011;13:225. PMID: 22078060. PMCID: PMC3326545. doi: 10.1186/bcr2925
7. Place AE, Huh SJ, Polyak K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res*. 2011;13:227. PMID: 22078026. PMCID: PMC3326543. doi: 10.1186/bcr2912
8. Tan J, Buache E, Chenard MP, Dali-Youcef, Rio MC. Adipocyte is a non-trivial, dynamic partner of breast cancer cells. *Int J Dev Biol*. 2011;55:851-859. PMID: 21948738. doi: 10.1387/ijdb.113365jt
9. Ahn S, Chung YR, Seo AN, Kim M, Woo JW, Park SY. Changes and prognostic values of tumor-infiltrating lymphocyte subsets after primary systemic therapy in breast cancer. *PLoS ONE*. 2020;15(5):e0233037. PMID: 32401825. PMCID: PMC7219779. doi: 10.1371/journal.pone.0233037
10. Luen SJ, Savas P, Fox SB, Salgado R, Loi S. Tumour-infiltrating lymphocytes and the emerging role of immunotherapy in breast cancer. *Pathol (Phila)*. 2017 Feb;49:141-155. PMID: 28049579. doi: 10.1016/j.pathol.2016.10.010
11. Fuchs TL, Pearson A, Pickett J, Diakos C, Dewar R, Chan D, et al. Why pathologists and oncologists should know about tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in triple-negative breast cancer: an Australian experience of 139 cases. *Pathology*. 2020;52(5):515-521. PMID: 32553444. doi: 10.1016/j.pathol.2020.04.004
12. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by

- an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015 Feb;26(2):259-71. PMID: 25214542. PMCID: PMC6267863. doi: 10.1093/annonc/mdl450
13. Matsumoto H, Koo SL, Dent R, Tan PH, Iqbal J. Role of inflammatory infiltrates in triple negative breast cancer. *J Clin Pathol*. 2015 Jul;68(7):506-10. PMID: 25750267. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202944
 14. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(2):545-53. PMID: 21671016. doi: 10.1007/s10549-011-1620-1
 15. Ascierto ML, Idowu MO, Zhao Y, Khalak H, Payne KK, Wang XY, et al. Molecular signatures mostly associated with NK cells are predictive of relapse free survival in breast cancer patients. *J Transl Med*. 2013 Jun 12;11:145. PMID: 23758773. PMCID: PMC3694475. doi: 10.1186/1479-5876-11-145
 16. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2016 Oct 18;4:59. PMID: 27777769. PMCID: PMC5067916. doi: 10.1186/s40425-016-0165-6.
 17. Mohammed ZM, Going JJ, Edwards J, Elsberger B, McMillan DC. The relationship between lymphocyte subsets and clinico-pathological determinants of survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*. 2013 Sep 17;109(6):1676-84. PMID: 23982600. PMCID: PMC3777002. doi: 10.1038/bjc.2013.493
 18. Denkert C, Wienert S, Poterie A, Loibl S, Budczies J, Badve S, et al. Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: results of the ring studies of the international immuno-oncology biomarker working group. *Mod Pathol*. 2016;29:1155-1164. PMID: 27363491. doi: 10.1038/modpathol.2016.109
 19. Solinas C, Carbognin L, De Silva P, Criscitiello C, Lambertini M. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer according to tumor subtype: Current state of the art. *The Breast*. 2017;35:142-150. PMID: 28735162. doi: 10.1016/j.breast.2017.07.005
 20. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al; Panel Members. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*. 2015 Aug;26(8):1533-46. PMID: 25939896. PMCID: PMC4511219. doi: 10.1093/annonc/mdl221
 21. WHO Classification of Tumors Editorial Board, ed. *WHO classification of tumors*. 5th edition. Breast tumors. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019. PMID: 32056259. doi: 10.1111/his.14091
 22. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19:403-10. PMID: 1757079. doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
 23. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013. PMID: 24101045. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984.
 24. Amat S, Penault-Llorca F, Cure H, Le Bouedec G, Achard JL, Van Praagh I, et al. Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *Int J Oncol*. 2002;4:791-796. PMID: 11894126. doi: 10.3892/ijo.20.4.791
 25. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2016 Oct 18; 4:59. PMID: 27777769. PMCID: PMC5067916. doi: 10.1186/s40425-016-0165-6.
 26. Kim JY, Heo SH, Choi SK, Song IH, Park IA, Kim YA, et al. Glutaminase expression is a poor prognostic factor in node-positive triple-negative breast cancer patients with a high level of tumor-infiltrating lymphocytes. *Virchows Arch*. 2017 Apr;470(4):381-389. PMID: 28185053. doi: 10.1007/s00428-017-2083-5
 27. Tsang JY, Hui SW, Ni YB, Chan SK. Lymphocytic infiltrate is associated with favorable biomarkers profile in HER2-overexpressing breast cancers and adverse biomarker profile in ER-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Jan;143(1):1-9. PMID: 24272079. doi: 10.1007/s10549-013-2781-x
 28. Nagalla S, Chou JW, Willingham MC, Ruiz J. Interactions between immunity, proliferation and molecular subtype in breast cancer prognosis. *Genome Biol*. 2013 Apr 29;14(4):R34. PMID: 23618380. PMCID: PMC3798758. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r34
 29. Ali HR, Chlon L, Pharoah PD, Markowitz F, Caldas C. Patterns of Immune Infiltration in Breast Cancer and Their Clinical Implications: A Gene-Expression-Based Retrospective Study. *PLoS Med*. 2016 Dec 13;13(12):e1002194. PMID: 27959923; PMCID: PMC5154505. doi: 10.1371/journal.pmed.1002194
 30. Lyndin MS, Romaniuk AM. Invazyvnyi rak nespetsyfichnoho typu molochnoi zalozy: histolohichni ta imunohistokhimichni osoblyvosti [Invasive cancer of non-specific type of breast: histological and immunohistochemical features]. *Challenges of medical science and education: an experience of EU countries and practical introduction in Ukraine: Collective monograph*. Riga: Izdevnieciba "Baltija Publishing"; 2020. 344 p. Chapt 8; p. 264-281. doi: 10.30525/978-9934-588-64-8-15

31. Cimino-Mathews A, Ye X, Meeker A, Argani P, Emens LA. Metastatic triple-negative breast cancers at first relapse have fewer tumor-infiltrating lymphocytes than their matched primary breast tumors: a pilot study. *Hum Pathol*. 2013 Oct;44(10):2055-63. PMID: 23701942. PMCID: PMC3758372. doi: 10.1016/j.humpath.2013.03.010
32. Gao Zh, Li CX, Liu M, Jiang JY. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020;20:1150. PMID: 33238978. PMCID: PMC7690150. doi: 10.1186/s12885-020-07654-y
33. Angelico G, Broggi G, Caltabiano R, Santoro A. Histopathological Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) as Predictive Biomarker for Hormone Receptors Status, Proliferative Activity and Clinical Outcome in Her-2 Positive Breast Cancer. *Appl Sci*. 2021;11:6788. doi: 10.3390/app11156788
34. Fu Z, Zuo Y, Li D, Xu W, Li D, Chen H, et al. The crosstalk: Tumor-infiltrating lymphocytes rich in regulatory T cells suppressed cancer-associated fibroblasts. *Acta Oncol*. 2013 Nov;52(8):1760-70. PMID: 23336253. PMCID: PMC3812699. doi: 10.3109/0284186X.2012.760847
35. Mohammed ZM, Going JJ, Edwards J, Elsberger B, McMillan DC. The relationship between lymphocyte subsets and clinico-pathological determinants of survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*. 2013 Sep 17;109(6):1676-84. PMID: 23982600. PMCID: PMC3777002. doi: 10.1038/bjc.2013.493
36. Miligy I, Mohan P, Gaber A, Aleskandarany MA, Nolan CC, Diez-Rodriguez M, et al. Prognostic significance of tumour infiltrating B lymphocytes in breast ductal carcinoma in situ. *Histopathology*. 2017 Aug;71(2):258-268. PMID: 28326600. doi: 10.1111/his.13217
37. Helal TE, Ibrahim EA, Alloub AI. Immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in breast carcinoma: relation to prognostic variables. *Indian J Pathol Microbiol*. 2013 Apr-Jun;56(2):89-93. PMID: 24056641. doi: 10.4103/0377-4929.118676
38. Engels CC, Fontein DB, Kuppen PJ, de Kruijf EM, Smit VT, Nortier JW, et al. Immunological subtypes in breast cancer are prognostic for invasive ductal but not for invasive lobular breast carcinoma. *Br J Cancer*. 2014 Jul 29;111(3):532-8. PMID: 24937677. PMCID: PMC4119991. doi: 10.1038/bjc.2014.338
39. Roncati L, Barbolini G, Piacentini F, Pisciolli F, Pusiol T, Maiorana A. Prognostic Factors for Breast Cancer: An Immunomorphological Update. *Pathol Oncol Res*. 2016 Jul;22(3):449-52. PMID: 26589512. doi: 10.1007/s12253-015-0024-7

УДК 618.193-006.04-018.98-076.5-036

ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОИДНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В ИНВАЗИВНОМ ПРОТОКОВОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Волос Л. И., Дудаш А. П.

Резюме. Целью данного исследования было оценить распределение опухоль-инфильтрирующих Т-, В-лимфоцитов и NK-клеток в различных молекулярных подтипах инвазивного протокового рака молочной железы и установить их связь со степенью дифференцировки опухоли.

Материал и методы. Основой научной работы явилось комплексное морфологическое, в том числе иммуногистохимическое исследование 193 случаев инвазивного протокового рака грудной железы. Общегистологическая обработка образцов выполнялась в соответствии со стандартной методикой. Иммуногистохимические исследования для CD3, CD20, CD56, ER, PR, c-erbB2, Ki-67 проводились в соответствии с протоколом производителя с необходимыми контролями. Степень злокачественности определялась по модифицированной схеме P. Scarff, H. Bloom и W. Richardson. Наличие, локализацию, интенсивность экспрессии диагностических, прогностических биомаркеров CD3, CD20 и CD56-положительных клеток (Т-, В- и NK клеток, соответственно) определяли с помощью открытой, мощной программной платформы QuPath для анализа биоизображений.

Результаты. Различия, полученные в данном исследовании, варьировали в зависимости от субпопуляций иммунных клеток и их расположения в опухолевой ткани. Плотность Т- и В-лимфоцитов была большей внутри опухоли и в инвазивном крае в нелюминальных фенотипах по сравнению с люминальными А и В фенотипами. По сравнению с плотностью Т-лимфоцитов, В-клеточный инфильтрат был достоверно ($p < 0,01$) менее выражен в опухолях как люминального, так и нелюминального фенотипов. Наименьшая плотность NK-клеток среди опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов выявлена внутри опухоли люминальных подтипов. Процент инфильтратов Т- и В-клеток как внутри опухолевого очага, так и в инвазивном крае, а также NK-клеток в инвазивном крае был значительно ниже при G1 и G2, чем при степени дифференциации G3 ($p < 0,01$). Что касается внутриопухолевых NK-клеток, различия были обнаружены только между степенью дифференциации G2 и G3, причем между G1 и G2 различия статистически не значимы ($p > 0,05$). Качественная и количественная оценка интенсивности экспрессии Т-, В- и NK-клеток продемонстрировала также разную степень экспрессии лимфоцитов в зависимости от молекулярного подтипа и расположения инфильтрата. Люминальный подтип А характеризовался

достоверным преобладанием умеренной экспрессии (2+) CD3 как внутри опухоли, так и в инвазивном крае опухоли ($p < 0,05$), в то время как в люминальном B и Her2+ фенотипах интенсивность экспрессии CD3 преобладала на уровне 1+. Тройные отрицательные опухоли характеризовались выраженной экспрессией (3+) CD3 внутри опухоли и в инвазивном крае опухоли во всех исследуемых случаях.

Выводы. Полученные результаты указывают на взаимосвязь между лимфоидным инфильтратом и степенью дифференциации в инвазивном протоковом раке молочной железы, особенно в менее благоприятных молекулярных подтипах. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты в разных молекулярных подтипах инвазивного протокового рака молочной железы можно считать прогностическим биомаркером.

Ключевые слова: инвазивный протоковый рак молочной железы, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты.

UDC 618.193-006.04-018.98-076.5-036

Features of the Lymphoid Microenvironment in Invasive Ductal Breast Cancer

Volos L. I., Dudash A. P.

Abstract. The purpose of the study was to assess the distribution of tumor-infiltrating T-, B-lymphocytes and natural killer cells in various molecular subtypes of invasive ductal breast cancer and to establish their relationship with the degree of tumor differentiation.

Materials and methods. The basis of the scientific work was a complex morphological, including immunohistochemical study of 193 cases of invasive ductal breast cancer. General histological processing of the samples was carried out in accordance with the standard technique. Immunohistochemical studies for CD3, CD20, CD56, ER, PR, c-erbB2, Ki-67 were performed according to the manufacturer's protocol with the control of samples. The grade of malignancy was determined according to the modified scheme of P. Scarff, H. Bloom and W. Richardson. The presence, localization, and expression intensity of diagnostic and prognostic biomarkers CD3, CD20, and CD56-positive cells (T-, B-, and natural killer cells, respectively) were determined using the new bioimage analysis software QuPath.

Results and discussion. The differences obtained in our study varied depending on the subpopulations of immune cells and their location in the tumor tissue. The density of T and B lymphocytes was higher within the tumor and in the invasive margin in the non-luminal phenotypes compared to the luminal A and B phenotypes. Compared to the density of T-lymphocytes, the B-cell infiltrate was significantly ($p < 0.01$) less pronounced in tumors of both luminal and non-luminal phenotypes. The lowest density of natural killer cells among tumor-infiltrating lymphocytes was found within the tumor of luminal subtypes. The percentage of infiltrates of T and B cells both within the tumor focus and in the invasive margin, as well as natural killer cells in the invasive margin, was significantly lower with G1 and G2 than with the degree of differentiation G3 ($p < 0.01$). As for intratumoral natural killer cells, differences were found only between the degree of differentiation of G2 and G3, and the differences between G1 and G2 were not statistically significant ($p > 0.05$). Qualitative and quantitative assessment of the intensity of expression of T-, B- and natural killer cells also demonstrated a different degree of expression of lymphocytes, depending on the molecular subtype and location of the infiltrate. The luminal subtype A was characterized by a significant predominance of mild expression (2+) CD3 both within the tumor and in the invasive margin of the tumor ($p < 0.05$), while in the luminal B and Her2 + phenotypes, the intensity of CD3 expression prevailed at the 1+ level. Triple negative tumors were characterized by strong expression of (3+) CD3 within the tumor and in the invasive margin of the tumor in all cases studied.

Conclusion. Thus, tumor-infiltrating lymphocytes in different molecular subtypes of invasive ductal breast cancer can be considered a prognostic biomarker. Our results indicate a relationship between lymphoid infiltrate and the degree of differentiation in invasive ductal breast cancer, especially in less favorable molecular subtypes.

Keywords: invasive ductal breast cancer, tumor-infiltrating lymphocytes.

ORCID and contributionship:

Liliya I. Volos : 0000-0002-1733-589X ^{A,E,F}

Andrii P. Dudash : 0000-0002-7934-8995 ^{B,C,D}

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR

Liliya I. Volos

Danylo Halytsky Lviv National Medical University
Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine
69, Pekarska Str., Lviv 79010, Ukraine
tel: +380507276193, e-mail: Liliya.volos@gmail.com

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 10.10.2021 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування