

Уровень опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и PD-статус как возможные прогностические маркеры выживаемости и эффективности терапии при трижды негативном раке молочной железы

А.Ф. Насретдинов¹, Н.И. Султанбаева¹, Ш.И. Мусин¹, А.В. Пушкарёв¹, К.В. Меньшиков^{1, 2},
В.А. Пушкарёв^{1, 2}, А.В. Султанбаев¹

¹ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Башкортостан;
Россия, Республика Башкортостан, 450054 Уфа, проспект Октября, 73/1;

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, Республика Башкортостан, 450008 Уфа, ул. Ленина, 3

Контакты: Александр Валерьевич Султанбаев rkodrb@yandex.ru

При раке молочной железы на основании генетического профиля и экспрессии иммуногистохимических маркеров определяются прогноз и выбор схемы лечения. При этом для трижды негативного рака молочной железы характерны отсутствие экспрессии рецепторов гормонов и отрицательного HER2-статуса, а также высокий индекс пролиферации. Данные особенностей опухолевой ткани ограничивают лечащего врача в выборе противоопухолевых препаратов. Развитие трижды негативного морфологического варианта опухолевой ткани характерно при наличии мутации в генах BRCA1/2. В свою очередь, определение мутаций BRCA1/2 является прогностическим биомаркером, а в трижды негативной опухолевой ткани важную роль для прогнозирования и выбора тактики лечения имеет наличие экспрессии белков контрольных иммунных точек, экспрессии мультипротеиновых рецепторов на поверхности иммунных клеток и опухолевой ткани. Кроме того, ряд исследований показывают, что существует множество прогностических маркеров, позволяющих выделить пациенток с трижды негативным раком молочной железы в подгруппы, способствующие определению прогноза и выбору лечебной тактики.

Ключевые слова: рак молочной железы, мутации BRCA, неоантигенная нагрузка, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, PD-статус опухоли, трижды негативный фенотип

Для цитирования: Насретдинов А.Ф., Султанбаева Н.И., Мусин Ш.И. и др. Уровень опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и PD-статус как возможные прогностические маркеры выживаемости и эффективности терапии при трижды негативном раке молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2020;16(1):65–70.

DOI: 10.17650/1994-4098-2020-16-1-65-70



Level of tumor-infiltrating lymphocytes and PD status as potential prognostic markers of survival and therapy effectiveness in triple-negative breast cancer

A.F. Nasretudinov¹, N.I. Sultanbaeva¹, Sh.I. Musin¹, A.V. Pushkarev¹, K.V. Menshikov^{1, 2}, V.A. Pushkarev^{1, 2}, A.V. Sultanbaev¹

¹Republican Clinical Oncological Dispensary, Ministry of Health of the Bashkortostan Republic;
73/1 Oktyabrya Av., Ufa 450054, Bashkortostan Republic, Russia;

²Bashkir State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Lenina St., Ufa 450008, Bashkortostan Republic, Russia

In breast cancer, genetic profile and expression of immunohistochemical markers determine prognosis and treatment scheme. Triple-negative breast cancer is characterized by absence of hormone receptor expression and negative HER2 status, as well as high proliferative index. These features of the tumor tissue limit doctors' selection of antitumor drugs. Development of triple-negative variant of tumor tissue is associated with a mutation in the BRCA1/2 gene. Consequently, determination of BRCA1/2 mutations is a prognostic biomarker, and in triple-negative cancer presence of expression of immune checkpoint proteins, multiprotein receptors on the surface of immune cells and tumor tissue play an important role in prognosis and selection of treatment strategy. Additionally, some studies demonstrate existence of multiple prognostic markers which allow to divide patients with triple-negative breast cancer into subgroups facilitating prognosis and selection of treatment strategy.

Key words: breast cancer, BRCA mutations, neoantigen load, tumor-infiltrating lymphocytes, tumor PD status, triple-negative phenotype

For citation: Nasretudinov A.F., Sultanbaeva N.I., Musin Sh.I. et al. Level of tumor-infiltrating lymphocytes and PD status as potential prognostic markers of survival and therapy effectiveness in triple-negative breast cancer. Opuholi zhenskoy reproduktivnoy systemy = Tumors of female reproductive system 2020;16(1):65–70. (In Russ.).

Начало эры иммуноонкологии охарактеризовалось всплеском исследований, направленных на изучение влияния различных компонентов иммунного ответа на рост и развитие злокачественных опухолей. В частности, ингибиторы контрольных точек иммунного ответа показали впечатляющие результаты в лечении меланомы, рака легкого, почки и злокачественных опухолей других локализаций. До недавнего времени основным предиктивным маркером эффективности такой терапии считалась экспрессия PD-1 и PD-L1 в тканях опухоли и опухолевого микроокружения, но последние исследования в области иммуноонкологии отметили новые характеристики опухоли, позволяющие определять чувствительность к иммунотерапии и клинические прогнозы. Важную роль в этой области играет изучение рака молочной железы (РМЖ).

Злокачественные новообразования молочной железы занимают лидирующую позицию в онкологической заболеваемости среди женского населения, а также являются ведущей причиной смерти от рака. РМЖ — сложное гетерогенное заболевание, определяемое наличием или отсутствием гиперэкспрессии рецепторов на поверхности опухолевых клеток. В зависимости от эстроген-прогестеронового статуса опухоли, наличия или отсутствия рецепторов HER2/neu, а также уровня пролиферативной активности выделяют 5 молекулярно-биологических подтипов РМЖ, различающихся в плане прогнозов, тактики лечения и ведения пациенток.

При этом трижды негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) занимает особую позицию ввиду частого развития в молодом возрасте, повышенного риска метастазирования, определения запущенных стадий при постановке диагноза, неблагоприятных прогнозов болезни и ограниченных лечебных опций [1].

При ТНРМЖ чаще обнаруживаются мутации в генах, отвечающих за иммунный ответ и приводящих к генетической нестабильности [2]. Подавление иммунного ответа влияет на прогнозы для таких пациентов. Так, например, в исследовании Т. Qin и соавт. [3] высокий уровень экспрессии PD-L1 ассоциировался с плохими исходами для 870 больных РМЖ и сопровождался большим размером опухоли, частым вовлечением лимфатических узлов и меньшей выживаемостью: общая выживаемость для PD-L1-положительных пациенток была хуже по сравнению с PD-L1-отрицательными (88,0 % против 91,5 %, $p < 0,001$), то же касается и других показателей выживаемости (рис. 1).

Пациентки с ТНРМЖ являются частыми носителями мутаций *BRCA1/2* [4], и, учитывая высокую частоту экспрессии PD-1 и PD-L1 в *BRCA1/2*-мутированных опухолях [5, 6], наличие информации о такой наследственной патологии имеет важное клиническое значение.

Анализ прогностических признаков и предиктивных маркеров чувствительности к лекарственной терапии в нескольких исследованиях также указывает на важную роль мутационной нагрузки и количества

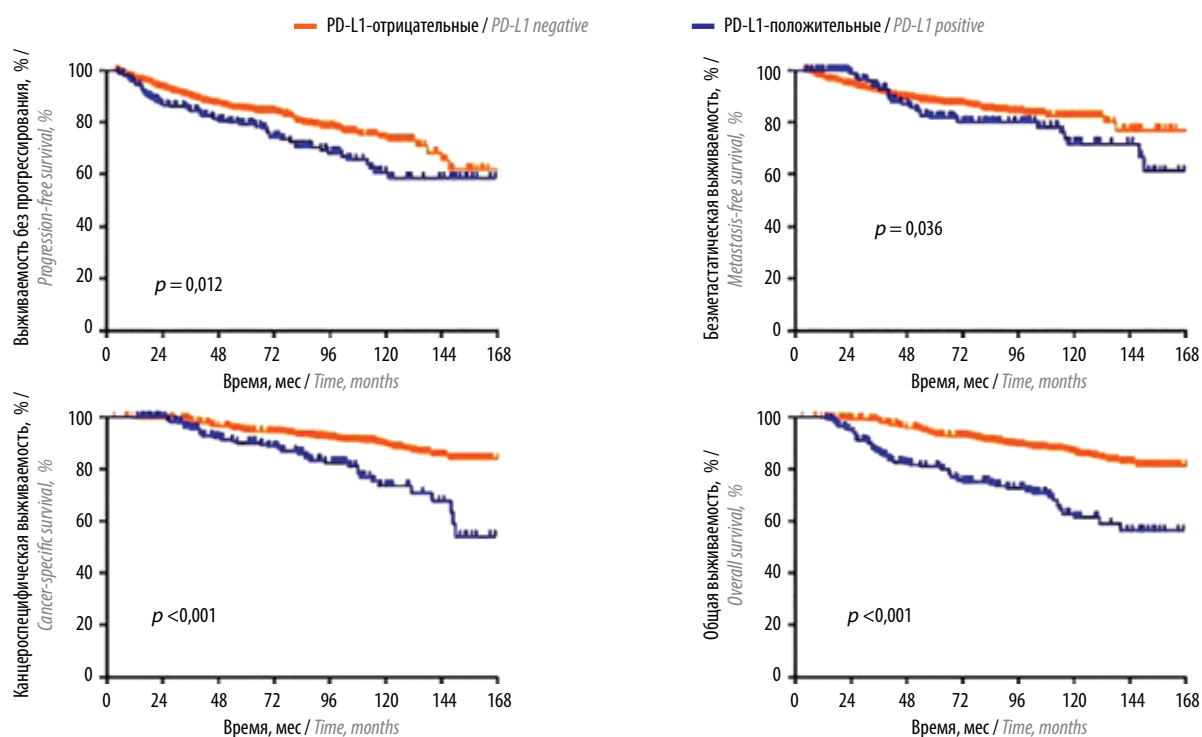


Рис. 1. Выживаемость больных раком молочной железы в зависимости от уровня экспрессии PD-L1 (адаптировано из [3] с разрешения авторов)
Fig. 1. Breast cancer survival according to PD-L1 expression level (adapted from [3] with permission of the authors)

опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в опухолях.

Заслуживающие внимания результаты получены в исследовании К.С. Strickland и соавт. [6], изучавших роль вышеперечисленных факторов на примере рака яичников. Было выяснено, что наличие мутаций *BRCA1/2* и мутаций, приводящих к нарушению гомологичной репарации (ГР), отмечается положительным прогнозом для пациенток. Это объясняется повышенным уровнем неоантигенов (рис. 2), появляющихся при нарушении процессов репарации ДНК и кодировке «неправильных» молекул, что, в свою очередь, активирует противоопухолевый иммунитет.

При изучении неоантигенной нагрузки статистического различия между пациентками с мутациями *BRCA1/2* и общей когортой, в которой отсутствовали мутации в гене *BRCA*, получено не было. Однако при дальнейшей стратификации на ГР-интактные и ГР-дефицитные подгруппы было выяснено, что все пациентки с нарушением ГР получили статистически достоверное улучшение выживаемости. Пациентки с мутациями *BRCA1/2* не имели преимуществ перед пациентками без мутаций *BRCA1/2* и с дефицитом ГР. Таким образом, независимо от наличия мутаций *BRCA1/2*, уровень

ГР стал определяющим фактором общей выживаемости пациенток (см. рис. 2д, е).

Наличие мутаций *BRCA1/2* по результатам исследования ассоциировалось с большим количеством $CD3^+$ и $CD8^+$ ОИЛ по сравнению с ГР-интактными опухолями.

Иммуногистохимический анализ в этих 2 группах показал, что *BRCA1/2*-мутированные опухоли содержат значительно большее число $CD3^+$ ОИЛ (42,9 против 20,7; $p = 0,001$) (рис. 3а, б) и $CD8^+$ ОИЛ (34,5 против 15,2; $p = 0,001$) (рис. 3а, д) по сравнению с опухолями без нарушений ГР. Анализ подгрупп $CD4^+$ и $CD20^+$ ОИЛ не выявил статистически значимой разницы между *BRCA1/2*-мутированными и ГР-интактными опухолями, однако соотношение $CD8^+/CD4^+$ определялось в пользу *BRCA1/2*-мутированных опухолей (3,3 против 1,2; $p = 0,003$). При сравнении содержания $CD3^+$ и $CD8^+$ ОИЛ между *BRCA1/2*-мутированными опухолями статистически значимой разницы получено не было ($p = 0,13$ и 0,63 соответственно).

Совместно *BRCA1/2*-мутированные группы опухолей и группы опухолей с высокими уровнями ОИЛ наглядно выигрывают в сравнительных категориях (рис. 4).

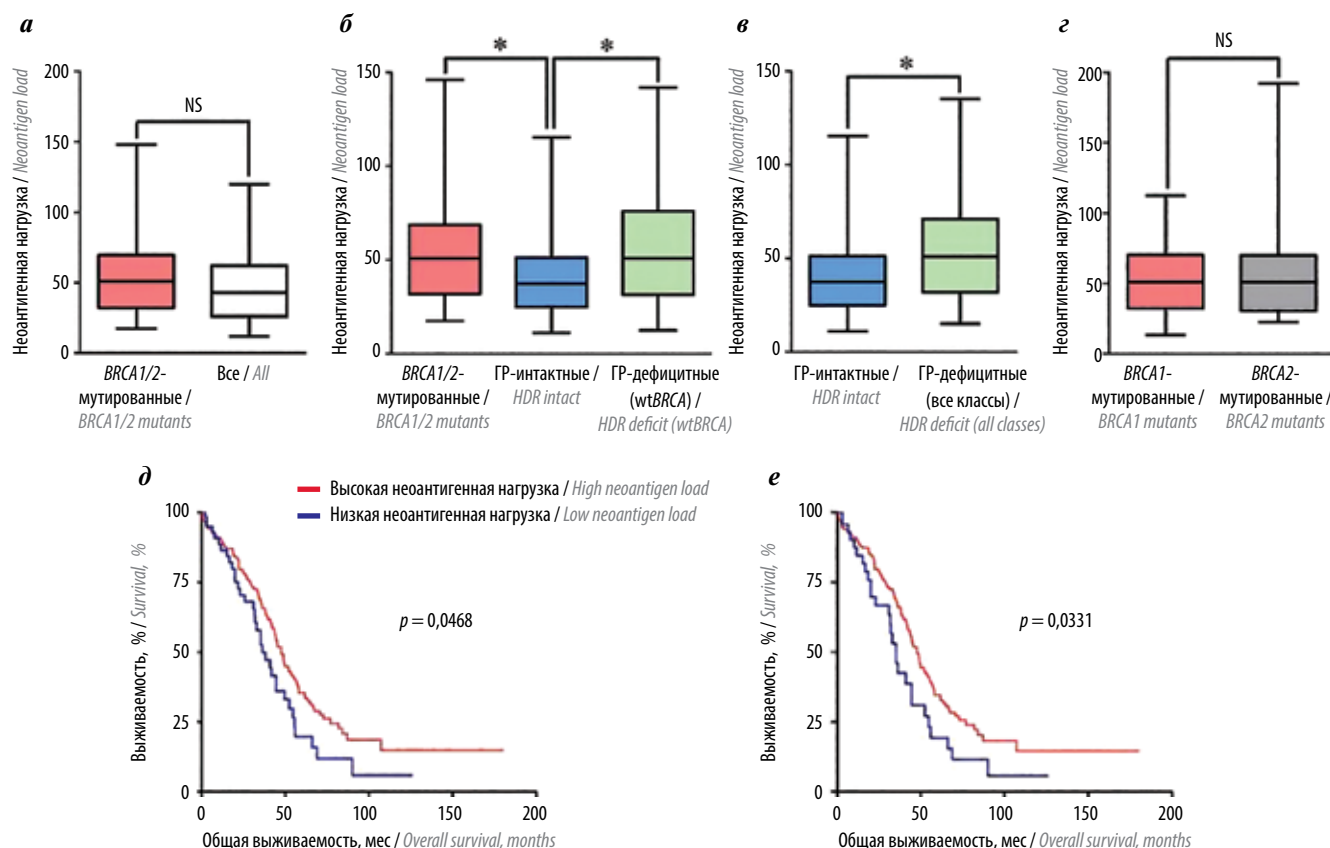


Рис. 2. Зависимость неоантигенной нагрузки от мутаций *BRCA1/2* и статуса гомологичной репарации (а–г); зависимость общей выживаемости от уровня неоантигенной нагрузки (д, е). ГР – гомологичная репарация (адаптировано из [6] с разрешения авторов)

Fig. 2. Dependence of neoantigen load on *BRCA1/2* mutations and homologous recombination status (а–г); dependence of overall survival on neoantigen load (д, е). HDR – homologous recombination (adapted from [6] with permission of the authors)

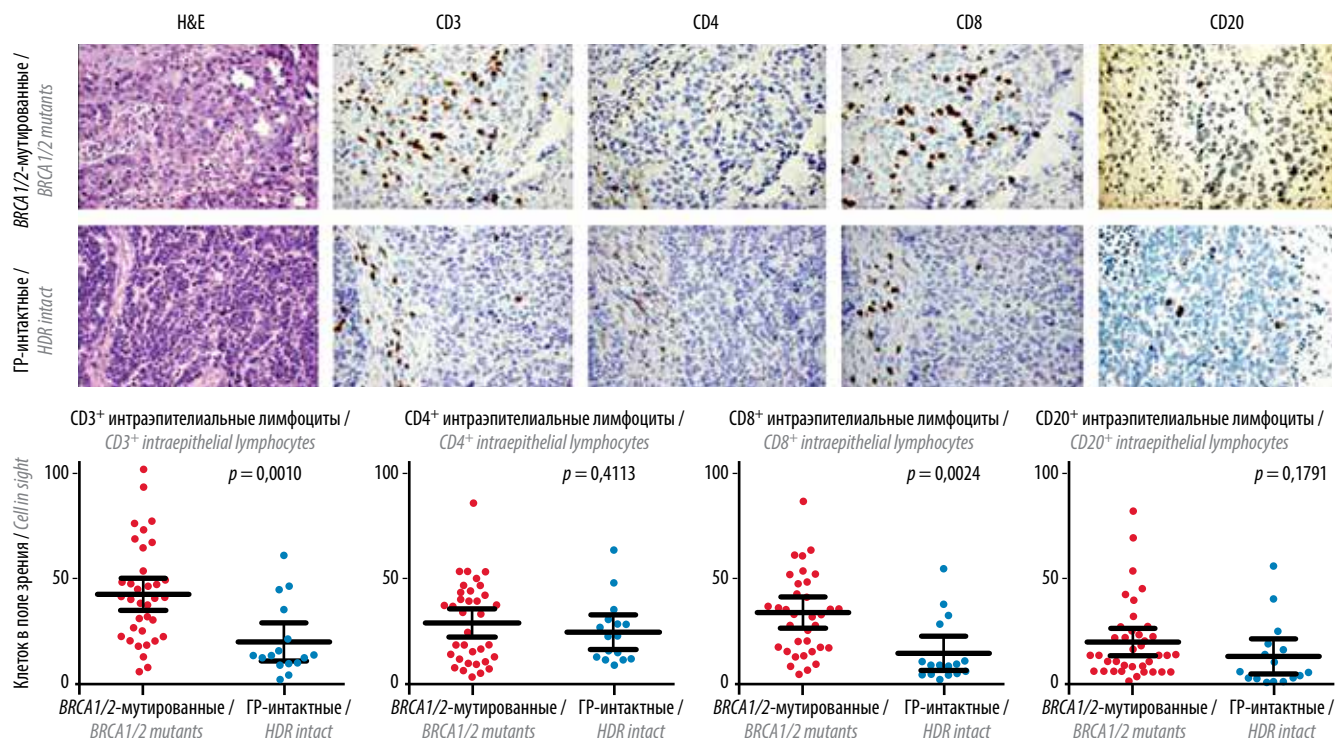


Рис. 3. Количество $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD20^+$ интраэпителиальных лимфоцитов в *BRCA1/2*-мутированных опухолях в сравнении с опухолями с достаточным уровнем гомологической репарации (ГР) (адаптировано из [6] с разрешения авторов)

Fig. 3. Count of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD20^+$ intraepithelial lymphocytes in tumors with mutant *BRCA1/2* compared with tumors with sufficient level of homology-directed repair (HDR) (adapted from [6] with permission of the authors)

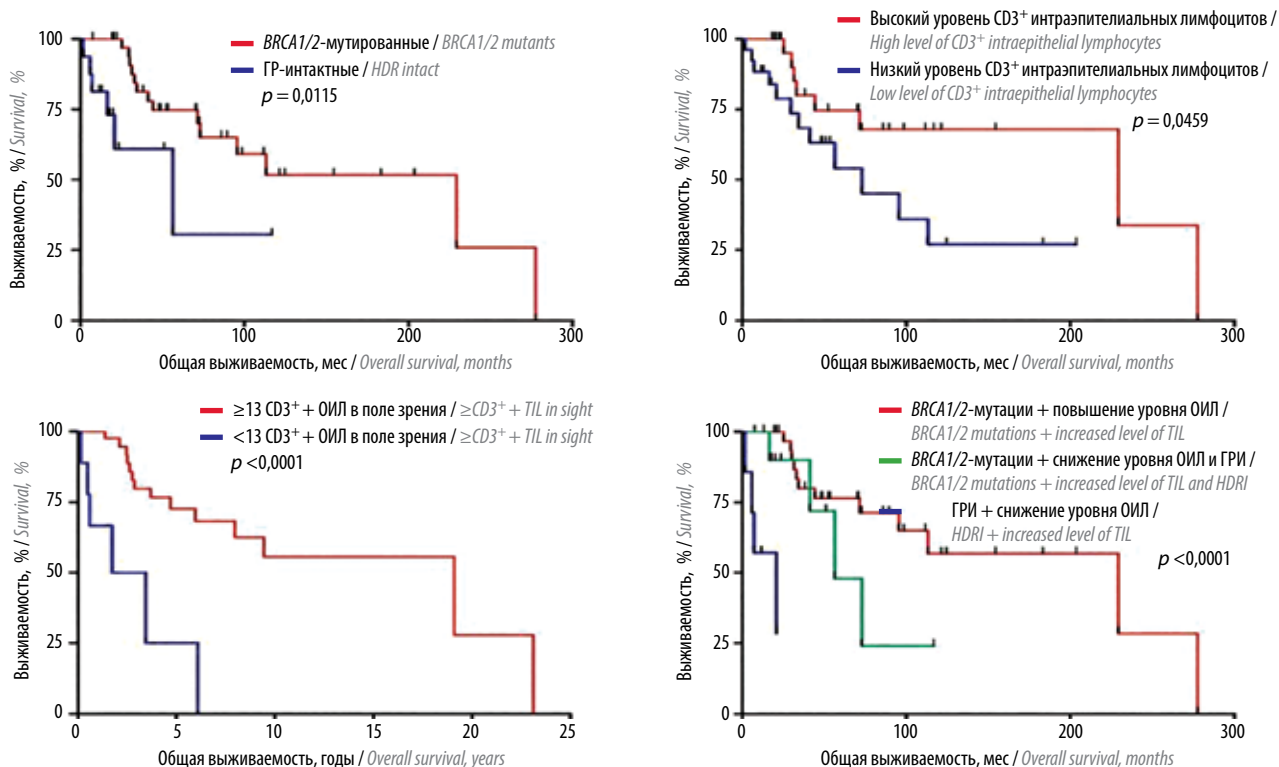


Рис. 4. Зависимость выживаемости пациенток исследуемых подгрупп от уровня $CD3^+$ ОИЛ и наличия мутаций *BRCA1/2*. ГР — гомологическая репарация, ГРИ — ГР-интактные, ОИЛ — опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (адаптировано из [6] с разрешения авторов)

Fig. 4. Dependence of patient survival in the studied subgroups on the level of $CD3^+$ TIL and presence of *BRCA1/2* mutations. HDR — homology-directed repair, HDR intact, TIL — tumor-infiltrating lymphocytes (adapted from [6] with permission of the authors)

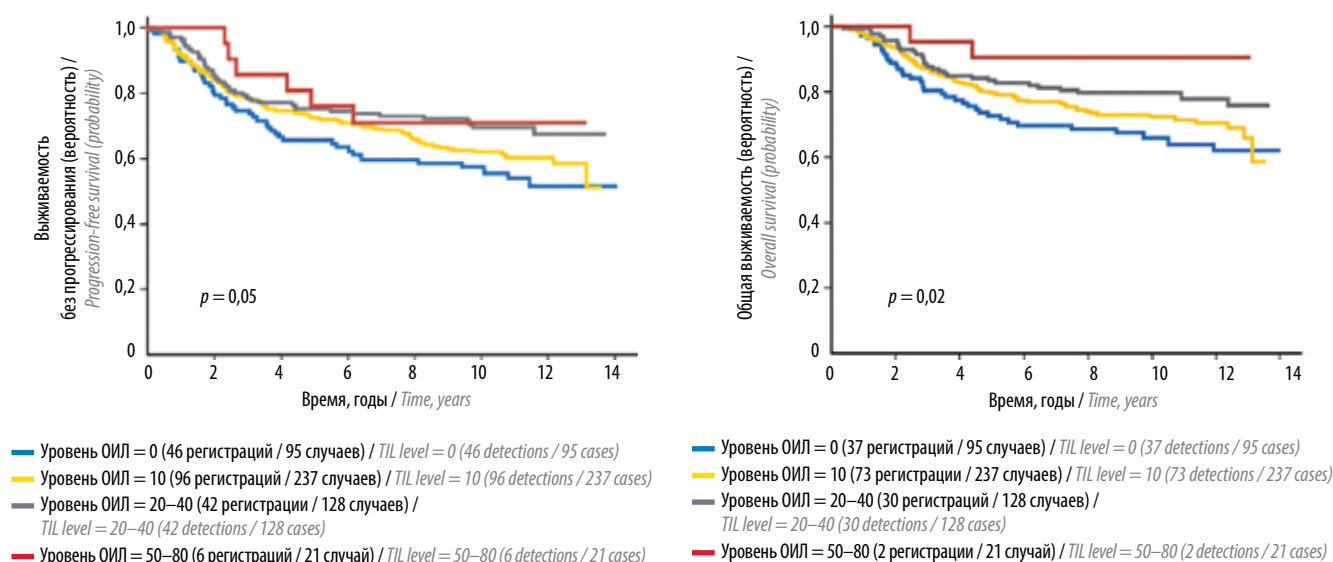


Рис. 5. Влияние уровня опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) на выживаемость пациенток (адаптировано из [7] с разрешения авторов)
Fig. 5. Effect of the level of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) on patient survival (adapted from [7] with permission of the authors)

Таким образом, *BRCA1/2*-мутированные опухоли и опухоли с повышенным содержанием ОИЛ сопровождалась лучшей выживаемостью по сравнению с ГР-профицитными опухолями яичников ($p = 0,012$) (см. рис. 4а). Это позволило разделить пациенток на 2 большие прогностические группы: хорошего прогноза (опухоли с мутациями *BRCA1/2* и высоким содержанием $CD3^+$ ОИЛ) и плохого прогноза (ГР-интактные опухоли с низким содержанием $CD3^+$ ОИЛ).

Экстраполируя полученные данные на РМЖ, можно спрогнозировать такую же зависимость. Действительно, было выяснено, что в трижды негативных опухолях молочной железы количество ОИЛ также ассоциируется с лучшей выживаемостью [7, 8] (рис. 5). В исследовании S. Adams и соавт. [7] 10 % увеличение содержания ОИЛ определяло улучшение выживаемости с отношением рисков 0,86 (95 % доверительный интервал (ДИ) 0,76–0,98; $p = 0,02$) для выживаемости без прогрессирования и 0,81 (95 % ДИ 0,69–0,95; $p = 0,01$) для общей выживаемости. В исследовании G. Pruneri и соавт. [8] 10 % увеличение содержания ОИЛ сопровождалось снижением рисков сокращения выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости на 17 % ($p < 0,001$) и 11 % ($p = 0,005$) соответственно.

Изучение *BRCA1/2*-, PD-1- и PD-L1-статуса опухоли также позволяет использовать новые лечебные опции при ТНРМЖ.

Наличие мутаций *BRCA1/2* делает опухоль чувствительной к PARP-ингибиторам; в доклинических исследованиях это связывалось с персистенцией поврежденных ДНК, которые в норме исправляются путем ГР [9]. В исследовании III фазы OLYMPIAD [10] проводилось сравнение между группами пациенток с мутациями

BRCA1/2, получающими олапариб и стандартную химиотерапию на усмотрение исследователя (капецитабин, винорелбин, эрибулин) после прогрессирования на фоне предыдущих линий терапии.

Медиана выживаемости без прогрессирования в группе олапариба составила 7 мес против 4,2 мес при стандартной химиотерапии (отношение рисков 0,58; 95 % ДИ 0,43–0,80; $p = 0,001$). Ответ опухоли составил 59 % в группе олапариба (95 % ДИ 52,0–67,4) и 28,8 % в группе стандартной химиотерапии (95 % ДИ 18,3–41,3). Общая выживаемость, однако, в этих группах статистически не различалась, но отмечалась лучшая переносимость препарата. Похожие результаты были получены в исследовании III фазы EMBRACA [11] и заключались в увеличении выживаемости без прогрессирования: 8,6 мес для группы талазопариба и 5,6 мес для группы стандартной химиотерапии ($p < 0,0001$).

Знание PD-1- и PD-L1-статуса опухоли может быть предиктором эффективности ингибиторов контрольных точек иммунного ответа; одним из первых исследований в этой области было небольшое исследование IV фазы KEYNOTE-012, в котором пембролизумаб использовался для лечения пациенток с метастатическим ТНРМЖ. Медиана общей выживаемости составила 10,2 мес, а годовая выживаемость — 41,1 %; были зарегистрированы 1 полный и 3 частичных ответа, 3 пациенткам пембролизумаб дал продолжительное преимущество. Исследования с авелумабом и атезолизумабом показали аналогичные результаты. В сравнительном исследовании KEYNOTE-086 между 2 когортами пациенток пембролизумаб показал одинаковую частоту объективного ответа между PD-L1-положительными и PD-L1-отрицательными опухолями у активно пролеченных

пациенток (4,8 % против 4,7 %). В другой когорте пациенток, не получавших химиотерапию, пембролизумаб был более эффективен и показал частоту объективного ответа, равную 23 % [12].

В настоящее время существуют теоретические предположения эффективности комбинации PARP-ингибиторов и ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, что объясняется усилением PD-L1-экспрессии на фоне приема PARP-ингибиторов [13].

Длительное время ТНПМЖ считался довольно однородной группой опухолей с плохим прогнозом, однако недавние исследования показали, что это не так. Вышеперечисленные исследования демонстрируют, что существует множество прогностических маркеров, позволяющих разделять больных ТНПМЖ на подгруппы. Эти маркеры имеют большое значение для лучшего понимания механизмов развития опухоли и ее взаимодействия с организмом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Неведова Н.А., Данилова Н.В. Клинико-морфологическая характеристика подтипов тройного негативного рака молочной железы. Фундаментальные исследования 2013;(9–5):881–5. [Nefedova N.A., Danilova N.V. Clinicopathologic characterization of the subtypes of triple negative breast cancer. Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research 2013;(9–5):881–5. (In Russ.)].
2. Lynce F., Xiu J., Obeid E. et al. Tumor mutational load in gynecological and breast cancer. J Clin Oncol 2017;35(Suppl 7S):abstr. 44.
3. Qin T., Zeng Y.D., Qin G. et al. High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer. Oncotarget 2015;6(32):33972–81. DOI: 10.18632/oncotarget.5583.
4. Peshkin B.N., Alabek M.L., Isaacs C. *BRCA1/2* mutations and triple negative breast cancers. Breast Dis 2010;32(1–2):25–33. DOI: 10.3233/BD-2010-0306.
5. Audeh M.W., Dadmanesh F., Yearley J. PD-L1 expression in primary breast cancers with germline mutations in *BRCA1* and 2. Cancer Res 2016;76(4 Suppl):abstr. P4-04-01.
6. Strickland K.C., Howitt B.E., Shukla S.A. et al. Association and prognostic significance of *BRCA1/2*-mutation status with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes and expression of PD-1/PD-L1 in high grade serous ovarian cancer. Oncotarget 2016;7(12):13587–98. DOI: 10.18632/oncotarget.7277.
7. Adams S., Gray R.J., Demaria S. et al. Bad prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. J Clin Oncol 2014;32(27):2959–66. DOI: 10.1200/JCO.2013.55.0491.
8. Pruner G., Gray K.P., Vingiani A. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are a powerful prognostic marker in patients with triple-negative breast cancer enrolled in the IBCSG phase III randomized clinical trial. Breast Cancer Res Treat 2016;158(2):323–31. DOI: 10.1007/s10549-016-3863-3.
9. Farmer H., McCabe N., Lord C.J. Targeting the DNA repair defect in *BRCA* mutant cells as a therapeutic strategy. Nature 2005;434(7035):917–21. DOI: 10.1038/nature03445.
10. Robson M., Im S.-A., Senkus E. et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline *BRCA* mutation. Engl J Med 2017;377:523–33. DOI: 10.1056/NEJMoa1706450.
11. Litton J., Rugo H.S., Ettl J. et al. EMBRACA: A phase 3 trial comparing talazoparib, an oral PARP inhibitor, to physician's choice of therapy in patients with advanced breast cancer and a germline *BRCA* mutation. Cancer Res 2018;78(4 Suppl):abstr. GS6-07.
12. Zishuo H.I., McArthur H.L. Immunotherapy in breast cancer: the new frontier. Curr Breast Cancer Rep 2018;10(2):35–40. DOI: 10.1007/s12609-018-0274-y.
13. Shiping J., Weiya X., Hirohito Y. et al. PARP inhibitor upregulates PD-L1 expression and enhances cancer-associated immunosuppression. Clin Cancer Res 2017;23(14):3711–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3215.

Вклад авторов

А.Ф. Насретдинов: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением интеллектуального содержания, написание статьи;
Н.И. Султанбаева: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением интеллектуального содержания;
Ш.И. Мусин: анализ научной работы, критический пересмотр;
А.В. Пушкарев: анализ научной работы;
К.В. Меньшиков: анализ научной работы, разработка концепции научной работы;
В.А. Пушкарев: анализ научной работы;
А.В. Султанбаев: разработка концепции работы с внесением интеллектуального содержания, дизайн и написание статьи.

Authors' contributions

A.F. Nesretdinov: article analysis, critical reevaluation with addition of intellectual content, article writing;
N.I. Sultanbaeva: article analysis, critical reevaluation with addition of intellectual content;
Sh.I. Musin: article analysis, critical reevaluation;
A.V. Pushkarev: article analysis;
K.V. Menshikov: article analysis, scientific study concept design;
V.A. Pushkarev: article analysis;
A.V. Sultanbaev: scientific study concept design with addition of intellectual content, article design and writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Ш.И. Мусин / Sh.I. Musin: <https://orcid.org/0000-0003-1185-977X>
А.В. Султанбаев / A.V. Sultanbaev: <https://orcid.org/0000-0003-0996-5995>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 13.04.2020. **Принята к публикации:** 18.05.2020.
Article submitted: 13.04.2020. Accepted for publication: 18.05.2020.