

# Взаимосвязь экспрессии GITR, Lag-3 и PD-1 с основными показателями системного и локального иммунитета у больных раком молочной железы

Д.В. Табаков<sup>✉1</sup>, Т.Н. Заботина<sup>1</sup>, Н.В. Чантурия<sup>2</sup>, Е.Н. Захарова<sup>1</sup>, И.К. Воротников<sup>1</sup>, В.Ю. Сельчук<sup>2</sup>, В.В. Соколовский<sup>3</sup>, А.В. Петровский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

## Аннотация

**Обоснование.** Для усиления противоопухолевого иммунного ответа разрабатываются новые перспективные методы иммунотерапии, заключающиеся в блокаде и активации контрольных точек иммунитета, в частности блокада молекулы Lag-3 (lymphocyte-activation gene 3) и активация рецептора GITR (Glucocorticoid induced TNF receptor). При исследовании комбинированного применения с блокаторами молекулы PD-1 получены обнадеживающие результаты, что делает оценку экспрессии Lag-3 и GITR на иммунокомпетентных клетках периферической крови (ПК) и опухолевой ткани необходимой для персонализации такого лечения и понимания механизмов противоопухолевого иммунного ответа.

**Материалы и методы.** В исследование включены образцы периферической крови и операционный материал 39 больных раком молочной железы, находящихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Оценку субпопуляционного состава и экспрессии молекул PD-1, Lag-3 и GITR проводили с помощью метода проточной цитометрии.

**Результаты.** Анализ основных популяций лимфоцитов ПК показал, что у больных РМЖ повышено содержание NKT-лимфоцитов, увеличена доля лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD11b и CD25, по сравнению с донорской группой. Выявлено, что в опухолевой ткани преобладают Т-клетки, увеличение доли которых происходит за счет уменьшенного содержания NK- и В-лимфоцитов. В структуре лимфоцитов, инфильтрующих опухоль, преобладают субпопуляции с иммуносупрессорной активностью, на что указывает снижение содержания CD11b+, CD25+ и перфоринпозитивных клеток, повышенная экспрессия Lag-3 и PD-1. Для ПК и опухолевой ткани показана средняя степень зависимости экспрессии Lag-3 от содержания PD-1+ лимфоцитов, а также увеличение содержания иммуносупрессорных субпопуляций при высоких показателях PD-1. Установлена прямая зависимость количества перфоринсодержащих лимфоцитов и экспрессии CD11b от содержания GITR в ПК, что не характерно для опухолевой ткани рака молочной железы.

**Заключение.** Поскольку блокада молекулы Lag-3 моноклональными антителами может усилить эффект анти-PD-1-терапии онкологически больных, необходима оценка экспрессии и коэкспрессии этих двух маркеров. Высокое содержание в опухолевой ткани GITR-позитивных лимфоцитов, с одной стороны, и снижение доли эффекторных субпопуляций лимфоцитов, с другой, указывают на влияние микроокружения опухоли на функционирование GITR-опосредованной активации иммунного ответа. Для понимания природы такого противоречия требуется дальнейшее исследование экспрессии и функциональной активности GITR.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, контрольные точки иммунитета, иммунотерапия, периферическая кровь, лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, рак молочной железы

**Для цитирования:** Табаков Д.В., Заботина Т.Н., Чантурия Н.В., Захарова Е.Н., Воротников И.К., Сельчук В.Ю., Соколовский В.В., Петровский А.В. Взаимосвязь экспрессии GITR, Lag-3 и PD-1 с основными показателями системного и локального иммунитета у больных раком молочной железы. Современная Онкология. 2021; 23 (3): 457–465. DOI: 10.26442/18151434.2021.3.200809

## Информация об авторах / Information about the authors

✉ Табаков Дмитрий Вячеславович – канд. мед. наук, науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: dtabakov91@mail.ru; ORCID: 0000-0002-1509-2206; SPIN-код: 1233-6671

Заботина Татьяна Николаевна – д-р биол. наук, зав. отд. клинико-лабораторной диагностики НИИ КО им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: tatzabotina@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-7631-5699; SPIN-код: 8628-9705

Чантурия Наиля Валерьевна – аспирант каф. онкологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». E-mail: naily.chanturia@gmail.com; ORCID: 0000-0001-7903-6417

Захарова Елена Николаевна – канд. мед. наук, науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: zakharovaen@yandex.ru; ORCID: 0000-0003-2790-6673; SPIN-код: 9334-0459

Воротников Игорь Константинович – д-р мед. наук, проф., вед. науч. сотр. хирургического отделения №15 (комбинированного лечения опухолей молочной железы) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: i.vorotnikov@mail.ru

Сельчук Владимир Юрьевич – д-р мед. наук, проф., зав. каф. онкологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». E-mail: selvu@gmail.com; SPIN-код: 6180-5569

✉ Dmitrii V. Tabakov – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: dtabakov91@mail.ru; ORCID: 0000-0002-1509-2206; SPIN code: 1233-6671

Tatiana N. Zabolina – D. Sci. (Biol.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: tatzabotina@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-7631-5699; SPIN code: 8628-9705

Naily V. Chanturia – Graduate Student, Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry. E-mail: naily.chanturia@gmail.com; ORCID: 0000-0001-7903-6417

Elena N. Zakharova – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: zakharovaen@yandex.ru; ORCID: 0000-0003-2790-6673; SPIN code: 9334-0459

Igor K. Vorotnikov – D. Sci. (Med.), Prof., Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: i.vorotnikov@mail.ru

Vladimir Yu. Selchuk – D. Sci. (Med.), Prof., Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry. E-mail: selvu@gmail.com; SPIN code: 6180-5569

# The relationship of GITR, Lag-3 and PD-1 expression with the main indicators of systemic and local immunity in patients with breast cancer

Dmitrii V. Tabakov<sup>✉1</sup>, Tatiana N. Zabolina<sup>1</sup>, Naili V. Chanturia<sup>2</sup>, Elena N. Zakharova<sup>1</sup>, Igor K. Vorotnikov<sup>1</sup>, Vladimir Yu. Selchuk<sup>2</sup>, Victor V. Sokolovskiy<sup>3</sup>, Alexander V. Petrovsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

## Abstract

**Background.** To enhance the antitumor immune response, new promising methods of immunotherapy are being developed. They consist in the blockade and activation of immune check-point molecules, in particular, the blockade of the Lag-3 molecule (lymphocyte-activation gene 3) and the activation of the GITR receptor (Glucocorticoid induced TNF receptor). In the studies of combined use with PD-1 blockers, encouraging results were obtained, which makes the assessment of the expression of Lag-3 and GITR on immunocompetent cells of peripheral blood (PB) and tumor tissue necessary for the personalization of such treatment and understanding of the mechanisms of the antitumor immune response.

**Materials and methods.** The study included peripheral blood samples and surgical material from 39 breast cancer patients being treated at the Blokhin National Medical Research Center of Oncology. The subpopulation composition and expression of PD-1, Lag-3, and GITR molecules were evaluated by flow cytometry.

**Results.** The analysis of the main populations of PB lymphocytes showed that in patients with breast cancer, the content of NKT-lymphocytes was increased, and the proportions of lymphocytes expressing CD11b and CD25 markers were increased compared to the donor group. It was revealed that the tumor tissue is dominated by T-cells, an increase in the proportion of which occurs due to a reduced content of NK-lymphocytes and B-lymphocytes. The structure of Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) is dominated by subpopulations with immunosuppressive activity, which is indicated by a decrease in the content of CD11b+, CD25+ and perforin-positive cells, increased expression of Lag-3 and PD-1. For PB and tumor tissue, the average degree of dependence of Lag-3 expression on the content of PD-1+ lymphocytes was shown. There is an increase in the content of immunosuppressive subpopulations with high PD-1 values in PB and TILs. The direct dependence of the number of perforin-containing lymphocytes and CD11b expression on the GITR content in the PB was established, but it is not typical for breast cancer tissue.

**Conclusion.** Since the blockade of the Lag-3 molecule by monoclonal antibodies can enhance the effect of anti-PD-1 therapy in cancer patients, it is necessary to evaluate the expression and co-expression of these two markers. A high content of GITR-positive lymphocytes in the tumor tissue, on the one hand, and a decrease in the proportion of effector subpopulations of lymphocytes, on the other, indicates the influence of the tumor microenvironment on the functioning of GITR-mediated activation of the immune response. Further investigation of GITR expression and functional activity is required to understand the nature of this contradiction.

**Keywords:** flow cytometry, immune check-points, immunotherapy, peripheral blood, tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer

**For citation:** Tabakov DV, Zabolina TN, Chanturia NV, Zakharova EN, Vorotnikov IK, Selchuk VYu, Sokolovskiy VV, Petrovsky AV. The relationship of GITR, Lag-3 and PD-1 expression with the main indicators of systemic and local immunity in patients with breast cancer. *Journal of Modern Oncology*. 2021; 23 (3): 457–465. DOI: 10.26442/18151434.2021.3.200809

## Введение

В последние годы иммунотерапия, преимущественно основанная на блокаде белков PD-1/PDL-1 [cell death protein 1 (anti-PD-1)/programmed death-ligand 1] и CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) моноклональными антителами (МКА), в корне изменила представление о лечении больных со злокачественными новообразованиями. Однако существует определенная когорта пациентов, резистентных к данному виду терапии. Несмотря на постепенное совершенствование подходов к лечению онкологических больных блокаторами контрольных точек иммунитета (чек-поинтов), для достижения наилучшей эффективности терапии и увеличения выживаемости крайне необходимы изучение иммунного ландшафта микроокружения опухоли и поиск альтернативных способов модуляции иммунной функции [1].

Для усиления противоопухолевого иммунного ответа разрабатываются новые перспективные методы лечения, за-

ключающиеся в блокаде коингибирующих и активации ко-стимулирующих молекул, в частности блокада молекулы Lag-3 (lymphocyte-activation gene 3) и активация рецептора GITR (Glucocorticoid induced TNF receptor) [2]. Комбинированная терапия, направленная на 2 или более контрольные точки иммунитета, находится на разных стадиях фундаментальных и клинических исследований. Совместное воздействие на множественные иммунные чек-поинты потенциально может повысить эффективность иммунотерапии, что и продемонстрировано у больных диссеминированной меланомой и почечно-клеточным раком [3].

Lag-3 структурно подобна молекуле CD4 и также преимущественно связывается с главным комплексом гистосовместимости 2-го типа. Установлено, что молекула Lag-3 экспрессируется на поверхности активированных CD4+ и CD8+ эффекторных клеток, но также представлена на Т-регуляторных клетках, NK-лимфоцитах и дендритных клетках.

## Информация об авторах / Information about the authors

Сokolovskiy Виктор Владимирович – студент ФGAOU BO «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет). E-mail: sokol.2012.vitya@mail.ru; ORCID: 0000-0003-0704-2265

Петровский Александр Валерьевич – канд. мед. наук, зам. дир. по образовательной деятельности, зав. хирургическим отд-нием №15 (комбинированного лечения опухолей молочной железы) ФGBU «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: alexpetrovsky@hotmail.com; ORCID: 0000-0002-7514-280X; SPIN-код: 5441-2747

Victor V. Sokolovskiy – Student, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). E-mail: sokol.2012.vitya@mail.ru; ORCID: 0000-0003-0704-2265

Alexander V. Petrovsky – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: alexpetrovsky@hotmail.com; ORCID: 0000-0002-7514-280X; SPIN code: 5441-2747

Таблица 1. Содержание основных популяций лимфоцитов в ПК и ЛИО Table 1. The content of the main lymphocyte populations of in peripheral blood (PB) and I tumor-infiltrating lymphocytes (TIL)			
Фенотип	Содержание в ПК	Содержание в ЛИО	p
CD3+ Т-лимфоцит	68,9 (61,0; 76,3)	92,7 (85,7; 95,3)	0,0000
CD3+CD4+ Т-хелперы	38,4 (30,0; 44,5)	48,4 (39,7; 54,0)	0,0006
CD8+ клетки	38,5 (32,1; 45,4)	43,2 (35,6; 55,0)	0,0121
CD3+CD8+ ЦТЛ	27,9 (18,5; 35,5)	42,6 (34,2; 53,3)	0,0000
CD3-CD16+CD56+ NK-клетки	17,5 (12,3; 27,8)	2,9 (1,9; 6,1)	0,0000
CD3+CD16+CD56+ NKT-клетки	15,1 (7,5; 19,1)	6,0 (4,5; 9,7)	0,0000
CD3-CD19+ В-лимфоцит	8,9 (6,2; 11,1)	2,3 (1,1; 3,9)	0,0000

**Примечание.** Здесь и далее в табл. 1–4: данные представлены в виде медианы и квартилей; p – уровень статистической значимости.

Показана способность Lag-3 ослаблять иммунный ответ, как напрямую подавляя активацию Т-клеток, так и опосредуя иммуносупрессивные функции регуляторных клеток. Предполагается, что Lag-3 играет решающую роль в индукции и подавлении активности регуляторных Т-клеток, а ингибирование или нокаут Lag-3 приводит к увеличению пролиферации как CD4+, так и CD8+ Т-клеток [4]. Существуют данные, что степень экспрессии Lag-3 на иммунокомпетентных и стромальных клетках является независимым прогностическим фактором при онкологических заболеваниях [5].

GITR (TNFRSF18/CD357/AITR) – трансмембранный белок, относящийся к суперсемейству TNFR, включающему также молекулы OX40, CD27, CD40 и 4-1BB. С высокой степенью экспрессии GITR представлен на CD4+CD25+FoxP3+ Т-регуляторных клетках и с низкой степенью – на наивных и Т-клетках памяти. В процессе активации CD8+ и CD4+ эффекторных клеток степень экспрессии GITR быстро увеличивается, достигая наивысших значений на активированных Т-регуляторных клетках, что, в свою очередь, сопровождается уменьшением уровня FoxP3 и супрессорной активности [6]. Также молекула GITR представлена на мембране NK-клеток и в меньшей степени В-лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток [7].

Лиганд GITR (GITRL) преимущественно экспрессируется на активированных антигенпрезентирующих клетках, включая макрофаги, В-лимфоциты, дендритные и эндотелиальные клетки. Активация GITR приводит к уменьшению Т-клеточного апоптоза и повышает длительность жизни Т-лимфоцитов. Взаимодействие GITR с его лигандом усиливает активацию Т-лимфоцитов путем увеличенной секреции интерлейкина-2 и интерферона  $\gamma$ , экспрессии CD25 и стимулирует клеточную пролиферацию. Стимуляция GITR усиливает цитотоксические функции CD8+ Т-клеток и обеспечивает выживаемость CD8+ Т-клеток памяти [8]. Одним из наиболее интересных результатов исследований является то, что агонисты GITR подавляют рост опухоли и увеличивают выживаемость не только в иммуногенных моделях опухолей (толстая кишка, мочевого пузыря, легкие, меланома), но и в низкоиммуногенных опухолях (молочная железа, мышьяная модель меланомы B16, яичники). Данное наблюдение позволяет считать активаторы GITR уникальными и перспективными терапевтическими средствами по сравнению с другими ингибиторами чек-пойнтов, для которых текущее состояние иммунной системы определяет эффективность иммунотерапии [9].

Клинические исследования препаратов, использующих данные молекулы как мишени, показали лишь частичную эффективность при монотерапии. Вместе с тем при исследовании комбинированного применения с блокаторами молекулы PD-1 получены обнадеживающие результаты, что делает оценку экспрессии Lag-3 и GITR на иммунокомпетентных клетках периферической крови (ПК) и опухолевой ткани необходимой для персонализации такого лечения и понимания механизмов противоопухолевого иммунного ответа [10].

## Материалы и методы

В исследование включены образцы ПК и операционный материал 39 больных раком молочной железы (РМЖ), находящихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», из них: стадия T1N0M0 – 18 человек, T1N1M0 – 1, T2N0M0 – 15, T2N1M0 – 3, T2N2M0 – 1, T3N1M0 – 1. У 35 (89,7%) больных установлен гистологический диагноз – инфильтративный протоковый рак, у 3 (7,7%) – инфильтративный дольковый и у 1 пациента (2,6%) – инфильтративный протоковый и дольковый. У 26 (66,7%) пациентов обнаружен люминальный В (Her2/neu-отрицательный) подтип РМЖ, у 5 (12,8%) – люминальный А, у стольких же – трижды негативный подтип, у 2 (5,1%) – люминальный В (Her2/neu-положительный) и у 1 пациента – Her2/neu-положительный.

Медиана возраста составила 50 лет (от 29 до 79 лет). Все пациентки получали хирургическое лечение.

Для выделения внутриопухолевых лимфоцитов материал, полученный путем кор-биопсии, или операционный материал подвергали умеренной гомогенизации с помощью модуля BD Medimachine Module (BD Bioscience, США) при комнатной температуре с последующей фильтрацией через фильтр Filcon 50 мкм (BD Bioscience, США).

Для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов ПК и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (ЛИО), применяли 6-цветное окрашивание клеток с использованием панели МКА к поверхностным маркерам Т- и В-лимфоцитов, NK- и NKT-клеток, активированных лимфоцитов, регуляторных Т-клеток (CD3, CD4, CD8, CD28, CD11b, CD25, CD16, CD56, CD19, CD127, CD279, Lag-3, GITR) и к внутриклеточному перфорину – Perforin (BD Bioscience, Beckman Coulter и e-Bioscience, США). Для изучения внутриклеточных белков (перфорин) проводили реакцию пермеабиллизации с помощью коммерческого набора Intra-prep (Beckman Coulter, США), который позволяет изменять проницаемость мембраны клеток.

Выделение гейта лимфоцитов проводили по экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 в координатах SSCvsCD45.

Исследование регуляторных (CD4+CD127-/lowCD25+/CD8+CD11b-CD28-), наивных (CD8+CD11b-CD28+) и эффекторных (CD8+CD11b+CD28-) Т-клеток осуществляли с использованием последовательного гейтирования. На первом этапе выделяли гейт лимфоцитов (R1) в координатах SSCvsCD45, затем из гейта лимфоцитов (R1) выделяли гейты CD8/CD4+ лимфоцитов (R2/R3 соответственно).

Цитотоксический потенциал CD16+ и CD8+ лимфоцитов оценивали как процент перфоринпозитивных клеток в составе соответствующей популяции.

Для оценки экспрессии поверхностных и внутриклеточных маркеров использовали проточный цитометр FACSCanto II (BD Bioscience, США) с программным пакетом FACSDiva 7.0. В каждом образце анализировали 5 тыс. событий в гейте CD45+ лимфоцитов.

Материалы исследования подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и

**Таблица 2. Оценка маркеров активации и содержания эффекторных и регуляторных субпопуляций лимфоцитов в ПК и ЛИО**  
**Table 2. The assessment of the activation markers and effector and regulatory lymphocyte subpopulations in the PB and TIL**

Фенотип	Содержание в ПК	Содержание в ЛИО	p
CD25+	27,8 (24,8; 39,1)	16,2 (12,0; 20,3)	0,0000
CD4+CD25+	18,0 (15,1; 24,8)	12,6 (9,2; 15,5)	0,0003
CD4+CD127-/lowCD25+Treg	9,0 (6,8; 11,9)	12,0 (5,3; 17,2)	0,2202
CD28+	50,1 (41,8; 56,5)	57,5 (53,5; 65,3)	0,0191
CD8+CD28+	13,2 (8,8; 17,7)	17,3 (13,1; 19,4)	0,0154
CD11b+	50,7 (41,9; 58,6)	26,2 (22,9; 30,5)	0,0000
CD8+CD11b+	25,7 (20,4; 31,7)	9,6 (6,5; 14,2)	0,0000
CD8+CD11b+CD28-	58,4 (47,0; 68,6)	13,8 (10,7; 17,1)	0,0000
CD8+CD11b+CD28+	8,7 (6,3; 10,3)	15,4 (10,8; 17,6)	0,0007
CD8+CD11b-CD28-	5,3 (2,7; 7,3)	34,7 (30,8; 43,1)	0,0000
CD8+CD11b-CD28+	26,8 (17,3; 36,7)	30,2 (21,1; 40,4)	0,3315
CD279+	17,5 (14,6; 22,5)	44,8 (40,3; 48,7)	0,0000
CD4+CD279+	9,8 (8,0; 11,7)	25,8 (19,8; 28,6)	0,0000
CD8+CD279+	7,0 (5,6; 10,0)	20,9 (12,0; 24,95)	0,0000
Lag-3+	0,5 (0,3; 1,5)	1,8 (1,1; 2,55)	0,0018
CD4+Lag-3+	0,2 (0,1; 0,8)	1,0 (0,6; 1,6)	0,0001
CD8+Lag-3+	0,3 (0,1; 0,7)	1,0 (0,3; 2,4)	0,0014
CD16+Lag-3+	0,1 (0; 0,1)	0,2 (0; 0,8)	0,5613
GITR+	7,6 (5,3; 11,3)	13,7 (10,3; 18,2)	0,0004
CD4+GITR+	4,1 (3,0; 6,0)	9,3 (8,2; 13,0)	0,0000
CD8+GITR+	2,6 (1,3; 4,9)	3,0 (1,84; 4,2)	0,8248
CD16+GITR+	2,3 (0,1; 4,3)	1,2 (1,0; 1,3)	0,5485
Perforin+	27,2 (21,2; 39,6)	5,3 (1,4; 7,4)	0,0000
CD8+Perf+	14,5 (10,7; 22,8)	3,3 (0,6; 5,0)	0,0000
actCD8	45,9 (31,1; 56,1)	9,9 (1,5; 10,6)	0,0000
CD16+Perf+	15,3 (9,1; 20,9)	1,2 (0,7; 3,0)	0,0000
actCD16	78,2 (66,8; 88,1)	32,9 (7,9; 60,2)	0,0006

непараметрического анализа. Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 13.3 (разработчик – StatSoft.Inc, США). Характер распределения показателей определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка (при  $p < 0,05$ ). Статистическую значимость различий между сравниваемыми группами оценивали по непараметрическому двустороннему U-критерию Манна–Уитни (U). Уровень статистической значимости принят равным 0,05. Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей (25 и 75-й процентиля). Определение взаимосвязи между показателями проводили с помощью корреляционного анализа Спирмена (коэффициент корреляции r).

## Результаты

Определено содержание основных популяций лимфоцитов в ПК и опухолевой ткани больных РМЖ (табл. 1).

В ПК содержание CD3+ T-лимфоцитов составило 68,9%, что достоверно ниже, чем в опухолевой ткани. За исключением НКТ-клеток доля всех субпопуляций T-лимфоцитов (CD3+CD4+ T-хелперов, CD3+CD8+ цитотоксических T-лимфоцитов – ЦТЛ) в ПК ниже, чем в опухолевой ткани. Следует отметить, что НК-клетки и В-клетки опухолевой ткани составляют всего 2,9 и 2,3% соответственно, в то время как в ПК эти показатели значительно выше и соответствуют нормальным значениям (17,5 и 8,9% соответственно).

Содержание CD8+-клеток в опухолевой ткани достоверно выше, но поскольку эта популяция клеток обладает ши-

рокой фенотипической и функциональной гетерогенностью, необходимо прицельное исследование ее субпопуляционной структуры.

В рамках данной работы проведена оценка популяций CD8-клеток с фенотипами CD8+CD11b+CD28- (эффektorные ЦТЛ), CD8+CD11b+CD28+ (активированные CD8+), CD8+CD11b-CD28+ (наивные CD8+-лимфоциты), CD8+CD11b-CD28- (регуляторные CD8+-лимфоциты) в ПК и опухолевой ткани.

Выявлены достоверные различия в содержании эффекторных ЦТЛ, активированных CD8+-клеток и регуляторных CD8+-лимфоцитов в ПК и опухолевой ткани (табл. 2).

Для CD8+-лимфоцитов ПК характерно преобладание субпопуляции эффекторных ЦТЛ (58,4%), доля этих клеток в ПК существенно выше таковой в опухолевой ткани (13,8%). В опухолевой ткани повышено содержание регуляторных и активированных CD8+-лимфоцитов. Количество наивных CD8+-клеток в ПК и опухолевой ткани сопоставимо (26,8 и 30,2% соответственно).

Показано, что в опухолевой ткани содержание как общего CD25+, так и CD4+CD25+ достоверно выше в ПК, чем в ЛИО. При этом количество CD4+CD127-/lowCD25+ T-регуляторных клеток в ПК и опухолевом образце сопоставимо и не имеет статистических различий (см. табл. 2).

Проведенное нами исследование цитотоксического потенциала эффекторных популяций показало, что в ПК значительно выше как содержание перфорина, так и процент CD8+ и CD16+ перфоринсодержащих клеток.

При анализе экспрессии молекул PD-1 и Lag-3 показано, что ЛИО (как CD4+, так и CD8+) содержат больше CD279 и

**Таблица 3. Сравнение субпопуляционного баланса ПК с низким (группа 1) и высоким (группа 2) содержанием PD-1**  
**Table 3. The comparison between the subpopulation balance in PB expressing low (group 1) and high (group 2) levels of PD-1**

Фенотип	Группа 1 PD-1 < 17,5% (n=20)	Группа 2 PD-1 > 17,5% (n=19)	P
CD3+	<b>60,7 (57,65; 65,8)</b>	<b>72,8 (64,3; 77,4)</b>	0,0136
CD3+CD4+	38,1 (29,2; 44,45)	37,6 (29,2; 41,35)	0,7063
CD8+	<b>35,3 (30,6; 41,25)</b>	<b>44,9 (38,65; 50,25)</b>	0,0098
CD3+CD8+	<b>20,2 (16,3; 27,65)</b>	<b>33,7 (29,1; 37)</b>	0,0010
CD3-CD16+CD56+	26,5 (15,35; 28,8)	14,9 (12,65; 23,75)	0,0734
CD3+CD16+CD56+	<b>7,8 (5; 16,45)</b>	<b>18,3 (14,8; 25,35)</b>	0,0047
CD3-CD19+	8,5 (6,05; 12)	7,6 (6,2; 9,4)	0,4737
CD25+	27,8 (22,55; 31,45)	26,1 (24,25; 33,3)	0,7344
CD4+CD25+	15,9 (12,45; 21,65)	18,1 (15,55; 23,65)	0,2277
CD4+CD127-/lowCD25+	<b>7,3 (6,2; 9,55)</b>	<b>10,5 (6,9; 12,5)</b>	0,0213
CD28+	49,9 (43,35; 55,35)	44,0 (39,05; 53,3)	0,5976
CD8+CD28+	9,6 (7,3; 13,65)	13,7 (10,55; 17,4)	0,0522
CD11b+	50,7 (44,2; 57,95)	55,8 (47,2; 61,2)	0,4287
CD8+CD11b+	25,6 (19,6; 30,3)	31,4 (25,55; 36,05)	0,0796
CD8+CD11b+CD28-	62,7 (52,75; 72,1)	61,6 (47,55; 69)	0,5847
CD8+CD11b+CD28+	7,2 (4,75; 9,15)	9,2 (6,8; 10,1)	0,1266
CD8+CD11b-CD28-	3,3 (2,15; 6,45)	6,4 (3,75; 7,85)	0,0828
CD8+CD11b-CD28+	24,2 (17,05; 32,15)	22,9 (16,75; 34,8)	0,9100
CD279+	<b>14,6 (12,5; 16,3)</b>	<b>22,5 (18,85; 29,55)</b>	0,0000
CD4+CD279+	<b>8,6 (6,6; 10,7)</b>	<b>10,5 (9,35; 13,2)</b>	0,0135
CD8+CD279+	<b>5,6 (4,75; 6,8)</b>	<b>10,0 (7; 13,4)</b>	0,0001
Perforin+	32,8 (24,2; 43,25)	27,5 (19,4; 40,95)	0,5718
CD8+Perf+	15,5 (11,9; 23,3)	14,0 (11,5; 22,7)	0,7063
actCD8	48,2 (35; 62,3)	34,7 (25,9; 47,4)	0,0648
CD16+Perf+	<b>20,7 (13,85; 26,7)</b>	<b>13,9 (8,05; 17,45)</b>	0,0150
actCD16	85,1 (72,2; 91,4)	69,1 (57,5; 83,9)	0,0500
Lag-3+	<b>0,4 (0,2; 1,05)</b>	<b>1,5 (0,4; 2,5)</b>	0,0413
CD4+Lag-3+	0,2 (0,1; 0,3)	0,8 (0,1; 1,3)	0,1000
CD8+Lag-3+	0,1 (0,1; 0,4)	0,5 (0,3; 1)	0,1333
CD16+Lag-3+	0 (0; 0,1)	0,1 (0,1; 0,1)	0,1138
GITR+	9,7 (5,4; 12,05)	7,9 (4,9; 10,8)	0,4641
CD4+GITR+	5,2 (3; 7,1)	4,8 (3,5; 7,2)	0,8558
CD8+GITR+	3,2 (1,8; 6,3)	3,2 (1,9; 5)	0,9379
CD16+GITR+	3,6 (1,4; 7,15)	1,8 (0; 2,3)	0,2118
Возраст, лет	51,5 (40,5; 60,5)	51,0 (47; 61)	0,7365

Lag-3-позитивных клеток, чем лимфоциты ПК (см. табл. 2). Содержание общего пула GITR-позитивных лимфоцитов и популяции CD4+GITR+ также было выше в ЛИО, однако значения популяции CD8+GITR+ не имели достоверных различий между ЛИО и ПК.

Медиана количества PD-1-положительных клеток в ПК пациентов составила 17,5%.

В группе с высоким содержанием PD-1 (>17,5%) повышены значения CD3+ Т-лимфоцитов, CD3+CD8+ клеток и CD3+CD16+CD56+ NKT-лимфоцитов (табл. 3). Также показано, что в этой группе более высокое количество Treg и Lag-3-позитивных клеток по сравнению с группой с низким содержанием PD-1 (<17,5%).

По такому же принципу проведен анализ экспрессии маркера PD-1 на лимфоцитах опухолевой ткани. Медиана количества PD-1-положительных ЛИО составила 44,8%.

Для группы с высоким содержанием PD-1 (>44,8%) характерны более высокие значения Т-лимфоцитов, в част-

ности CD3+CD8+ клеток, что ранее отмечено и для лимфоцитов ПК.

Интересно отметить, что медиана содержания NKT-лимфоцитов в группе с низким значением PD-1 (<44,8%) практически в 2 раза ниже по сравнению с таковой для группы с высоким содержанием PD-1, однако это различие не подтверждено статистически (табл. 4).

Установлено, что в группе 2 содержание CD8+CD11b-CD28- клеток выше по сравнению с группой 1, различий в содержании Treg не выявлено.

Для оценки взаимосвязи экспрессии молекул Lag-3, GITR и PD-1 в ПК и ЛИО проведен корреляционный анализ по Спирмену. Выявлена средняя степень зависимости маркеров Lag-3 и PD-1 ( $r=0,42$  для ПК и  $r=0,51$  для ЛИО). Зависимость экспрессии молекулы GITR от PD-1 и Lag-3 не обнаружена (табл. 5).

Для оценки влияния экспрессии молекулы GITR на лимфоцитах ПК мы также разделили больных на 2 группы в

**Таблица 4. Сравнение субпопуляционного баланса ЛИО с низким (группа 1) и высоким (группа 2) содержанием PD-1**  
**Table 4. The comparison between the subpopulation balance of TIL expressing low (group 1) and high (group 2) levels of PD-1**

Фенотип	Группа 1 PD-1<44,8% (n=15)	Группа 2 PD-1>44,8% (n=15)	p
CD3+	<b>83,0 (81,5; 92,5)</b>	<b>94,5 (92,5; 95,4)</b>	<b>0,0184</b>
CD3+CD4+	49,8 (41,15; 52,9)	42,4 (37,2; 49)	0,3865
CD8+	<b>36,4 (31,7; 47)</b>	<b>52,0 (43,1; 53,4)</b>	<b>0,0433</b>
CD3+CD8+	<b>35,7 (31; 45,75)</b>	<b>50,8 (42,1; 52,7)</b>	<b>0,0433</b>
CD3-CD16+CD56+	2,6 (2,1; 6,3)	3,2 (2,2; 5)	0,9233
CD3+CD16+CD56+	3,7 (2,6; 7,2)	6,0 (4,9; 7,7)	0,2110
CD3-CD19+	4,9 (1; 15,55)	1,6 (1,1; 2,5)	0,5637
CD25+	13,6 (11,8; 18,45)	14,4 (10,9; 19,8)	0,8336
CD4+CD25+	11,2 (8,75; 14,35)	10,8 (7,75; 15,6)	0,7929
CD4+CD127-/lowCD25+	14,1 (9,2; 19,1)	12,0 (7,6; 13,7)	0,3173
CD28+	62,4 (57; 65,3)	55,2 (42,5; 57,5)	0,1495
CD8+CD28+	17,5 (16,9; 18,2)	16,8 (12,9; 17,4)	0,4233
CD11b+	27,0 (22,9; 32,8)	24,3 (18; 26,8)	0,5218
CD8+CD11b+	6,0 (4,4; 8,5)	10,8 (7,2; 12,7)	0,2002
CD8+CD11b+CD28-	14,5 (13,8; 15)	15,5 (13,8; 19,5)	0,8727
CD8+CD11b+CD28+	16,8 (11,9; 21,9)	12,0 (8,3; 17)	0,1496
CD8+CD11b-CD28-	<b>31,5 (20,9; 34,7)</b>	<b>43,9 (38,3; 54,7)</b>	<b>0,0250</b>
CD8+CD11b-CD28+	35,3 (30,2; 40,9)	22,4 (17,3; 26,7)	0,0782
CD279+	<b>38,2 (30,55; 42,05)</b>	<b>48,7 (45,5; 50,3)</b>	<b>0,0005</b>
CD4+CD279+	<b>22,7 (16,8; 27,3)</b>	<b>27,6 (25,65; 29,3)</b>	<b>0,0491</b>
CD8+CD279+	<b>12,0 (8,9; 21,05)</b>	<b>25,0 (20,75; 30,75)</b>	<b>0,0136</b>
Perforin+	6,2 (1,1; 8,2)	3,0 (1,5; 4,9)	0,6242
CD8+Perf+	4,4 (0,6; 5)	2,7 (0,7; 5,1)	0,7133
actCD8	9,9 (2,4; 10,1)	5,9 (1,1; 13,3)	0,8065
CD16+Perf+	3,6 (0,8; 6,8)	0,9 (0,65; 1,25)	0,3865
actCD16	62,9 (33,6; 86,9)	10,7 (5,9; 19,1)	0,1489
Lag-3+	1,3 (0,55; 1,85)	1,9 (1,4; 2,1)	0,1489
CD4+Lag-3+	1,1 (0,35; 1,35)	1,0 (0,8; 1,3)	0,8852
CD8+Lag-3+	0,5 (0,25; 1,2)	1,1 (0,4; 1,7)	0,1489
GITR+	11,6 (8,7; 16,2)	13,1 (10,9; 17,1)	0,5966
CD4+GITR+	8,9 (8,2; 13)	9,7 (8,1; 12,4)	0,7494
CD8+GITR+	2 (1,15; 3,6)	2,6 (2,1; 3,1)	0,3359
CD16+GITR+	2,3 (1,3; 3,2)	0,7 (0,4; 1)	0,1213
% TIL	0,7 (0,45; 1,9)	0,6 (0,4; 1,3)	0,56354

**Таблица 5. Корреляция между экспрессией молекул PD-1 (CD279), Lag-3 и GITR в ПК и ЛИО**  
**Table 5. The correlation between the expression of PD-1 (CD279), Lag-3 and GITR in PB and TIL**

Маркер	CD279, кровь	CD279, ЛИО	Lag-3, кровь	Lag-3, ЛИО	GITR, кровь	GITR, ЛИО
CD279, кровь		-0,0118	0,4257	-0,1668	-0,0531	-0,3008
CD279, ЛИО	-0,0118		0,2115	0,5107	0,0357	0,1575
Lag-3, кровь	0,4257	0,2115		-0,3154	0,1161	0,1164
Lag-3, ЛИО	-0,1668	0,5107	-0,3154		-0,3430	0,3204
GITR, кровь	-0,0531	0,0357	0,11641	-0,3430		-0,0731
GITR, ЛИО	-0,3008	0,1575	0,1164	0,3204	-0,0731	

зависимости от содержания данного маркера. За пороговое значение приняли 7,6% (медиана содержания GITR на лимфоцитах ПК). В группе с высоким содержанием GITR (группа 2) по сравнению с группой 1 снижено количество CD3+ T-лимфоцитов, повышены содержание маркера адгезии CD11b и экспрессия перфорина (табл. 6). Отмечена тенденция к повышению количества NK-клеток в группе 2. Для ЛИО подобных закономерностей не выявлено. Корреляционный анализ показал наличие средней степени зависимости между экспрессией GITR и CD3 ( $r=-0,4067$ ), GITR и CD11b ( $r=0,3420$ ) на лимфоцитах ПК. Данные представлены в табл. 7.

## Обсуждение

Анализ основных популяций лимфоцитов ПК показал, что у больных РМЖ повышено содержание NKT-лимфоцитов по сравнению с донорской группой из более раннего исследования лаборатории [11]. Мировые исследования отмечают двойственную роль экспансии NKT-лимфоцитов. Существуют данные о неблагоприятном прогнозе заболевания при низком количестве NKT-клеток. Другие авторы, напротив, связывают рост содержания NKT-лимфоцитов с прогрессированием заболевания и развитием иммуносупрессии [12].

В ПК пациентов отмечено повышение доли лимфоцитов, экспрессирующих маркер адгезии CD11b, по сравнению с донорской группой из предыдущих исследований лаборатории (50,7 и 28,3% соответственно) [11]. Известно, что экспрессия CD11b на эффекторных лимфоцитах (NK-клетках и CD8+CD28-CD11b+) свидетельствует о высокой цитолитической активности [13]. Это наблюдение позволяет предположить положительную роль повышения экспрессии этого маркера у больных РМЖ.

Также в ПК выявлено повышение экспрессии молекулы CD25 (27,8%) и количества CD4+ клеток, несущих этот рецептор (18%), по сравнению с донорами (14,5 и 9,2% соответственно) [11]. Высокая экспрессия CD25 на активированных циркулирующих иммунных клетках и Tregs является фактором, который уже используется в иммунотерапии с применением интлейкина-2 для лечения опухолей и аутоиммунных заболеваний [14]. Так как в настоящем исследовании количество Treg сопоставимо с показателями у здоровых лиц, можно утверждать, что повышение количества CD4+CD25+ субпопуляции свидетельствует об активационном процессе на системном уровне иммунитета.

При сравнении субпопуляционного баланса лимфоцитов ПК и ЛИО выявлено, что в ткани преобладают T-клетки (92,7%), увеличение доли которых происходит за счет уменьшения содержания NK- и В-лимфоцитов (2,9 и 2,25%). Иммунорегуляторный индекс в опухоли составляет 1,1 vs 1,4 в ПК, так как популяции CD3+CD4+ и CD3+CD8+ представлены в ЛИО практически в равных долях (48,4 и 42,6%); см. табл. 1. Данная закономерность ранее продемонстрирована нами и у больных с другими нозологическими формами онкологических заболеваний [15].

Отмечено, что в структуре ЛИО повышено содержание субпопуляций, обладающих иммуносупрессорной активностью, на что указывает снижение количества CD11b+, CD25+ и перфоринпозитивных клеток, повышенная экспрессия Lag-3 и PD-1 (см. табл. 2). Установленный нами факт соответствует мировым данным [16].

Количество активированных CD8+ лимфоцитов (CD8+CD11b+CD28-) в опухолевой ткани существенно ниже, чем в ПК (13,8 и 58,4% соответственно). В то же время 30,2% CD8+ ЛИО имеют фенотип CD8+CD11b-CD28-, т.е. в структуре CD8+ лимфоцитов преобладают клетки с регуляторной активностью [17]. Представленные данные позволяют сделать вывод о подавлении противоопухолевого иммунного ответа на локальном уровне за счет повышения количества супрессорных популяций и активации их функций. При этом содержание активационного рецептора GITR в ткани выше, чем в ПК, что отмечается и зарубежными авторами

[18]. В мировой литературе такое наблюдение объясняют ростом содержания Treg в ЛИО, однако в текущем исследовании количество Treg в опухолевой ткани по сравнению с ПК повышено незначительно и не имеет корреляции с GITR. Нами показано, что увеличение GITR в T-клеточном звене иммунитета связано именно с популяцией CD4+ лимфоцитов (содержание CD4+GITR+ в ПК – 4,1%, в ЛИО – 9,3%), а не с содержанием CD8+GITR+ (в ПК – 2,6%, в ЛИО – 2,9%).

Установлено, что в ПК в группе с высоким содержанием PD-1 (группа 2) увеличено количество CD8+ лимфоцитов за счет роста количества NKT-клеток (группа 1 – 7,7%, группа 2 – 18,3%), причем значения CD8+ и NKT-клеток выше таковых у доноров.

Данная тенденция сохраняется и для ЛИО, однако различия в количестве NKT-лимфоцитов в группах с низким и высоким содержанием PD-1 недостоверны (см. табл. 4). Сниженное количество перфоринпозитивных CD16+ лимфоцитов в группе с высокой долей PD-1 указывает на супрессорную функцию NKT-лимфоцитов.

Для ПК в группе с повышенным содержанием PD-1 характерно увеличение доли Lag-3-позитивных клеток и Treg, что указывает на активность супрессорных механизмов. В опухолевой ткани повышение доли PD-1-положительных клеток сопровождается увеличением количества Lag-3+ лимфоцитов, CD8+CD11b-CD28- T-регуляторных клеток и CD8+CD11b-CD28+ наивных лимфоцитов. Взаимосвязь экспрессии PD-1 и Lag-3 на лимфоцитах ПК и опухолевой ткани, установленная в данном исследовании, отмечена и зарубежными авторами [19]. Существуют данные о пространственной кооперации данных молекул и образовании временного комплекса при проведении сигнала в лимфоцит. При этом наблюдается лишь частичная кооперация PD-1 и Lag-3 в комплекс, что в нашем исследовании подтверждается средней степенью корреляции этих параметров [20].

Для ПК в группе с высоким содержанием GITR (>7,6%) отмечено уменьшение доли CD3+ клеток за счет тенденции к увеличению количества NK-лимфоцитов. Этот процесс также определяется повышением содержания CD11b (группа 1 – 44,1%, группа 2 – 54,2%) и перфоринсодержащих клеток (группа 1 – 23,0%, группа 2 – 31,3%), что подтверждает активационную роль GITR в механизмах регуляции иммунного ответа в ПК у онкологических больных. Анализ корреляции GITR с вышеперечисленными показателями в ЛИО не установил зависимости от содержания данного маркера, что, возможно, обусловлено повышением количества регуляторных популяций и более мощной активацией иммуносупрессорных механизмов в микроокружении опухоли. Таким образом, можно предположить, что наличие и эффективность противоопухолевого иммунного ответа, индуцированного активацией молекулы GITR, определяются соотношением эффекторных и регуляторных субпопуляций на системном и локальном уровнях.

## Заключение

Проанализированы показатели системного и локального иммунитета 39 больных первично-операбельным РМЖ.

Анализ основных популяций лимфоцитов ПК показал, что у больных РМЖ повышено содержание NKT-лимфоцитов, увеличена доля лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD11b и CD25, по сравнению с донорской группой.

Выявлено, что в опухолевой ткани преобладают T-клетки, увеличение доли которых происходит за счет уменьшенного содержания NK- и В-лимфоцитов. В структуре ЛИО преобладают субпопуляции с иммуносупрессорной активностью, на что указывают снижение содержания CD11b+, CD25+ и перфоринпозитивных клеток, повышенная экспрессия Lag-3 и PD-1.

Для ПК и опухолевой ткани показана средняя степень зависимости экспрессии Lag-3 от содержания PD-1+ лимфоцитов, а также увеличение содержания иммуносупрессорных субпопуляций при высоких показателях PD-1. Поскольку блокада молекулы Lag-3 МКА может усиливать эффект

**Таблица 6. Сравнение субпопуляционного баланса ПК с низким (группа 1) и высоким (группа 2) содержанием GITR**  
**Table 6. The comparison between the subpopulation balance in PB expressing low (group 1) and high (group 2) levels of GITR**

Фенотип	Группа 1 GITR<7,6% (n=17)	Группа 2 GITR>7,6% (n=22)	p
CD3+	<b>74,1 (64,4; 78,9)</b>	<b>64,7 (59,5; 71,5)</b>	<b>0,0348</b>
CD3+CD4+	44,5 (30; 48,2)	37,3 (32,3; 40,5)	0,0559
CD8+	38,2 (29,7; 44,8)	40,4 (32,2; 45,4)	0,4967
CD3+CD8+	27,4 (20,6; 35,2)	29,3 (18,5; 35,8)	0,7232
CD3-CD16+CD56+	14,0 (6,3; 23,5)	21,4 (13,3; 28,6)	0,0866
CD3+CD16+CD56+	14,0 (7,5; 17,8)	17,0 (7,7; 23,6)	0,4789
CD3-CD19+	7,8 (6,2; 10,5)	9,2 (7,3; 11,1)	0,5145
CD25+	27,2 (24,8; 39,1)	28,5 (23,7; 38,9)	0,9887
CD4+CD25+	19,2 (16,2; 24,8)	17,3 (14,7; 24)	0,3799
CD4+CD127-/lowCD25+	9,6 (8,6; 11,9)	7,4 (6,8; 11,2)	0,3720
CD28+	53,4 (43,7; 60)	48,6 (41,8; 56,3)	0,2341
CD8+CD28+	11,8 (10; 19,1)	13,6 (8,8; 16,8)	0,9887
CD11b+	<b>44,1 (37,3; 53,4)</b>	<b>54,2 (49,2; 58,6)</b>	<b>0,0253</b>
CD8+CD11b+	24,3 (18,8; 31,4)	26,4 (22,84; 31,7)	0,4444
CD8+CD11b+CD28-	51,5 (43; 65,4)	60,0 (53,8; 69,5)	0,1447
CD8+CD11b+CD28+	6,8 (4,6; 10,8)	9,2 (7,1; 10,1)	0,1369
CD8+CD11b-CD28-	6,7 (4,3; 8,9)	3,8 (2,5; 6,3)	0,0615
CD8+CD11b-CD28+	30,6 (21,4; 40,2)	23,9 (16,8; 32,8)	0,1408
CD279+	17,9 (15,75; 22,5)	17,1 (13; 21,85)	0,4595
CD4+CD279+	9,3 (8,4; 11,6)	10,0 (7,65; 11,7)	0,7114
CD8+CD279+	6,65 (6,05; 9,75)	7,0 (5,4; 10)	0,6684
Perforin+	<b>23,0 (16,9; 32,7)</b>	<b>31,3 (25,1; 40,9)</b>	<b>0,0474</b>
CD8+Perf+	14,5 (9,5; 21,6)	16,2 (12,6; 22,8)	0,3410
actCD8	41,6 (30,6; 50,5)	47,3 (34,2; 60,6)	0,4967
CD16+Perf+	14,9 (8,2; 18,6)	15,6 (10,2; 23,9)	0,2398
actCD16	76,9 (68,2; 85,8)	82,9 (66,8; 88,5)	0,7770
Lag-3+	0,4 (0,25; 1,05)	1,1 (0,3; 1,7)	0,4161
CD4+Lag-3+	0,2 (0,1; 0,25)	0,6 (0,1; 1,05)	0,3239
CD8+Lag-3+	0,2 (0,05; 0,65)	0,3 (0,1; 0,7)	0,3388
CD16+Lag-3+	0,1 (0,05; 0,1)	0,1 (0; 0,1)	0,4945
GITR+	<b>5,3 (4,4; 5,8)</b>	<b>11,3 (9,6; 14,5)</b>	<b>0,0000</b>
CD4+GITR+	<b>3,3 (2; 4)</b>	<b>6,0 (4,65; 7,45)</b>	<b>0,0002</b>
CD8+GITR+	<b>1,4 (0,8; 2,5)</b>	<b>5,0 (3; 7,2)</b>	<b>0,0002</b>
CD16+GITR+	<b>0,1 (0; 0,95)</b>	<b>4,3 (2,8; 5,6)</b>	<b>0,0139</b>
Возраст, лет	53,0 (40; 61)	49,0 (47; 58)	0,8832

**Таблица 7. Корреляция между экспрессией молекул GITR, CD3, CD11b и перфорина**  
**Table 7. The correlation between the expression of GITR, CD3, CD11b and perforin**

Маркер	CD3, ПК	CD11b, ПК	Perforin, ПК	GITR, ПК
CD3, ПК		-0,5156	-0,4541	-0,4067
CD11b, ПК	-0,5156		0,6189	0,3420
Perforin, ПК	-0,4541	0,6189		0,2557
GITR, ПК	-0,4067	0,3420	0,2557	
CD3, ЛИО	0,1589	0,0919	0,1235	0,2176
CD11b, ЛИО	-0,1632	0,0049	0,0442	-0,0177
Perforin, ЛИО	-0,4283	-0,3000	0,0727	-0,0818
GITR, ЛИО	-0,1868	0,1197	0,3655	-0,0731



анти-PD-1-терапии онкологических больных, необходима оценка экспрессии и коэкспрессии этих двух маркеров.

Установлена прямая зависимость количества перфоринсодержащих лимфоцитов и экспрессии CD11b от содержания GITR в ПК, что не характерно для опухолевой ткани РМЖ. Высокое содержание в опухолевой ткани GITR-позитивных лимфоцитов, с одной стороны, и снижение доли эффекторных субпопуляций лимфоцитов, с другой, указывают на влияние микроокружения опухоли на функционирование GITR-опосредованной активации иммунного ответа. Для понимания природы такого противоречия требуется дальнейшее исследование экспрессии и функциональной активности GITR.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

#### Источник финансирования

Исследование проведено в рамках НИР «Оптимизация панели молекулярных маркеров иммунокомпетентных клеток (ИКК) системного и локального иммунитета как средства выявления надежных прогностических и предиктивных факторов эффективности противоопухолевой терапии для персонализации лечения онкологических больных» Минздрава России, номер АААА-А19-119022090028-6.

#### Source of financing

The study was conducted within the framework of the scientific research "The optimization of the panel of molecular markers of immunocompetent cells (ICC) of local and systemic immunity as a measure of identifying reliable prognostic and predictive factors of the efficacy of antitumor therapy for personalized treatment of cancer patients" of the Ministry of Health of Russia, number АААА-А19-119022090028-6.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(3):197-218. DOI:10.1038/s41573-018-0007-y
- Zhao X, Subramanian S. Intrinsic resistance of solid tumours to immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Res.* 2017;77:817-22. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-2379
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2019;381:1535-46. DOI:10.1056/NEJMoa1910836
- El Halabi L, Adam J, Gravelle P, et al. Expression of the Immune Checkpoint Regulators LAG-3 and TIM-3 in Classical Hodgkin Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2020;S2152-2650(20):30633-9. DOI:10.1016/j.clml.2020.11.009
- Shapiro M, Herishan Y, Katz BZ, et al. Lymphocyte activation gene 3: a novel therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2017;102(5):874-82. DOI:10.3324/haematol.2016.148965
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002;3(2):135-42. DOI:10.1038/ni759
- Clouthier DL, Watts TH. Cell-specific and context-dependent effects of GITR in cancer, autoimmunity, and infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(2):91-106. DOI:10.1016/j.cytogfr.2013.12.003
- Snell LM, Lin GHY, Watts TH, et al. IL-15-dependent upregulation of GITR on CD8 memory phenotype T cells in the bone marrow relative to spleen and lymph node suggests the bone marrow as a site of superior bioavailability of IL-15. *J Immunol.* 2012;188:5915-23. DOI:10.4049/jimmunol.1103270
- Brunn ND, Mauze S, Gu D, et al. The role of anti-Drug antibodies in the pharmacokinetics, disposition, target engagement, and efficacy of a GITR agonist monoclonal antibody in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;356(3):574-86. DOI:10.1124/jpet.115.229864
- Buzzatti G, Dellepiane C, Del Mastro L. New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of GITR. *ESMO Open.* 2020;4(Suppl. 3):e000738. DOI:10.1136/esmoopen-2020-000738
- Заботина Т.Н., Черткова А.И., Циклаури В.Т., и др. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и инфильтрирующих опухоль у больных плоскоклеточным раком головы и шеи. *Иммунология.* 2019;40(3):10-9 [Zabotina TN, Chertkova AI, Tsiklauri VT, et al. Osobennosti subpopulatsionnogo sostava limfotsitov perifericheskoi krov i infil'triruiushchikh opukhol' u bol'nykh ploskokletochnym rakom golovy i shei. *Immunologiya.* 2019;40(3):10-9 (in Russian)]. DOI:10.24411/0206-4952-2019-13002
- Krijgsman D, Hokland M, Kuppen PJK. The Role of Natural Killer T Cells in Cancer-A Phenotypical and Functional Approach. *Front Immunol.* 2018;9:367. DOI:10.3389/fimmu.2018.00367
- Jin J, Fu B, Mei X, et al. CD11b(-)CD27(-) NK cells are associated with the progression of lung carcinoma. *PLoS One.* 2013;8(4):e61024. DOI:10.1371/journal.pone.0061024
- Flynn MJ, Hartley JA. The emerging role of anti-CD25 directed therapies as both immune modulators and targeted agents in cancer. *Br J Haematol.* 2017;179(1):20-35. DOI:10.1111/bjh.14770
- Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А., и др. Многопараметровое исследование иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у онкологических больных. *Российский онкологический журнал.* 2016;21(1-2):51-4 [Zabotina TN, Korotkova OV, Borunova AA, et al. Mnogoparametrovye issledovanie immunofenotipa limfotsitov, infil'triruiushchikh opukhol', u onkologicheskikh bol'nykh. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal.* 2016;21(1-2):51-4 (in Russian)]. DOI:10.18821/1028-9984-2015-21-1-51-54
- Tassi E, Grazia G, Vegetti C, et al. Early Effector, Lymphocytes coexpress multiple inhibitory receptors in primary non-Small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;77(4):851-61. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-1387
- Freedman MS, Ruijs TC, Blain M, Antel JP. Phenotypic and functional characteristics of activated CD8+ cells: a CD11b-CD28- subset mediates noncytolytic functional suppression. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991;60(2):254-67. DOI:10.1016/0090-1229(91)90068-I
- Krausz LT, Fischer-Fodor E, Major ZZ, Fetica B. GITR-expressing regulatory T-cell subsets are increased in tumor-positive lymph nodes from advanced breast cancer patients as compared to tumor-negative lymph nodes. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012;1:59-66. DOI:10.1177/03946320120250010
- He Y, Yu H, Rozeboom L, et al. LAG-3 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Relationship with PD-1/PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *J Thorac Oncol.* 2017;12(5):814-23. DOI:10.1016/j.jtho.2017.01.019
- Huang RY, Eppolito C, Lele S, et al. LAG3 and PD1 co-inhibitory molecules collaborate to limit CD8+ T cell signaling and dampen antitumor immunity in a murine ovarian cancer model. *Oncotarget.* 2015;6(29):27359-77. DOI:10.18632/oncotarget.4751

Статья поступила в редакцию / The article received: 15.02.2021

Статья принята к печати / The article approved for publication: 08.10.2021



OMNIDOCTOR.RU