

ЭКСПРЕССИЯ PD-1 В ИММУННЫХ КЛЕТКАХ МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ И МЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

А. Ю. Калинин, Е. А. Царенкова, Д. М. Лоос, А. А. Мох, Е. О. Родионов, С. В. Миллер, Е. С. Григорьева , Л. А. Таширева

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

Клиническое значение экспрессии белка PD-1 в микроокружении опухоли рака легких, особенно в контексте иммунотерапии, остается плохо изученным. Целью исследования было оценить экспрессию PD-1 в инфильтрирующих опухоль иммунных клетках и ее связь с клиническими исходами у пациентов с раком легких. У 20 пациентов (17 мужчин и три женщины, средний возраст составил $56 \pm 6,9$ лет) с раком легкого с помощью мультиплексной иммунофлуоресценции *in situ* был проведен анализ четырех ключевых популяций иммунных клеток, вовлеченных в ответ на иммунотерапию, с фокусом внимания на паттернах экспрессии PD-1 и их корреляции с выживаемостью без прогрессирования (progression-free survival, PFS). Экспрессию PD-1 преимущественно наблюдали на CD8⁺-лимфоцитах, хотя и на низком уровне (~5%), что предполагает состояние истощения Т-клеток. Иммунные клетки, экспрессирующие PD-1, встречались редко в микроокружении как немелкоклеточного, так и мелкоклеточного рака легких, возможно в связи с тем, что большинство иммунных клеток остаются функционально активными. Дефицитом клеток PD-1⁺ можно объяснить ограниченную терапевтическую эффективность антител против PD-1. Выявлено, что инфильтрация CD20⁺ В-клетками является независимым предиктором низкой PFS (HR = 0,17; 95% CI: 0,02–0,65; $p = 0,0454$), и это подчеркивает ранее недооцененную роль В-клеток в прогрессировании рака легких. Показано также, что наличие отдаленных метастазов (стадия M1), высокая доля макрофагов PD-1⁺CD163⁺ и низкая доля лимфоцитов PD-1⁺FoxP3⁺ связаны с более короткой PFS, что подчеркивает сложное взаимодействие между популяциями клеток в опухолевом микроокружении. Эти результаты свидетельствуют о том, что иммунные субпопуляции, экспрессирующие PD-1, в частности цитотоксические лимфоциты и регуляторные Т-клетки, могут служить прогностическими маркерами и потенциальными терапевтическими мишенями.

Ключевые слова: экспрессия PD-1, микроокружение опухоли, иммунные контрольные точки, рак легкого

Финансирование: исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 20-75-10033-П).

Вклад авторов: А. Ю. Калинин — поиск литературы, получение и статистическая обработка результатов, написание статьи; Е. А. Царенкова, Д. М. Лоос — получение и анализ данных; А. А. Мох, Е. О. Родионов — курация пациентов; С. В. Миллер — сбор данных; Е. С. Григорьева — редактирование статьи; Л. А. Таширева — планирование и руководство исследованием, анализ и интерпретация результатов, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Томского национального исследовательского медицинского центра НИИ онкологии (протокол № 7 от 25 августа 2020 г. и протокол № 18 от 25 августа 2023 г.), проведено в соответствии с федеральными законами Российской Федерации и Хельсинкской декларацией 1964 г. со всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими проведение научных исследований биоматериала, полученного от человека. Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

 **Для корреспонденции:** Евгения Сергеевна Григорьева, пер. Кооперативный, д. 5, г. Томск, 634009, Россия; grigoryeva.es@gmail.com

Статья получена: 04.03.2025 **Статья принята к печати:** 17.03.2025 **Опубликована онлайн:** 24.03.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.014

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

PD1 EXPRESSION IN IMMUNE CELLS WITHIN THE TUMOR MICROENVIRONMENT OF PATIENTS WITH NON-SMALL CELL AND SMALL CELL LUNG CANCER

Kalinchuk AYu, Tsarenkova EA, Loos DM, Mokh AA, Rodionov EO, Miller SV, Grigoryeva ES , Tashireva LA

The Laboratory of Molecular Therapy of Cancer, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

The clinical significance of programmed cell death protein 1 (PD-1) expression in the tumor microenvironment (TME) of lung cancer, particularly in the context of immunotherapy, remains poorly understood. This study aimed to evaluate PD-1 expression in tumor-infiltrating immune cells and its association with clinical outcomes in lung cancer patients. In a study of 20 patients (17 men and three women, average age 56 ± 6.9 years) with lung cancer, four key immune cell populations involved in the immunotherapy response were analyzed using multiplexed *in situ* immunofluorescence. The focus was on PD-1 expression patterns and their correlation with progression-free survival (PFS). Our findings revealed that PD-1 expression was predominantly observed on CD8⁺ lymphocytes, albeit at low levels (~5%), suggesting a state of T-cell exhaustion. Notably, PD-1-expressing immune cells were rare in both non-small-cell and small-cell lung cancer microenvironments, indicating that most immune cells remain functionally active. This deficit of PD-1⁺ cells may explain the limited therapeutic efficacy of anti-PD-1 antibodies. Furthermore, we identified CD20⁺ B-cell infiltration as an independent predictor of poorer PFS (HR = 0.17, 95% CI: 0.02–0.65, $p = 0.0454$), highlighting a previously underappreciated role of B cells in lung cancer progression. Additionally, the presence of distant metastases (stage M1), a high proportion of PD-1⁺CD163⁺ macrophages, and a low proportion of PD-1⁺FoxP3⁺ lymphocytes were associated with shorter PFS, underscoring the complex interplay between immunosuppressive and immunostimulatory cell populations in the TME. These findings suggest that PD-1-expressing immune subsets, particularly cytotoxic lymphocytes and regulatory T cells, may serve as prognostic markers and potential therapeutic targets.

Keywords: PD1 expression, tumor microenvironment, immune checkpoint, lung cancer

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (grant № 20-75-10033-П).

Author contribution: Kalinchuk AYu — literature search, obtaining and statistically processing the results, writing the article; Tsarenkova EA — obtaining and analyzing data; Loos DM — obtaining and analyzing data; Mokh AA — patients' curation; Rodionov EO — patients' curation; Miller SV — data collection; ES Grigoryeva — editing the article; Tashireva LA — study planning and supervision, analysis, and interpretation of results, writing the article.

Compliance with ethical standards: The study was approved by the Ethics Committee of the Tomsk National Research Medical Center Oncology Research Institute (protocol № 7, 25 August 2020; protocol № 18, 25 August 2023), conducted in accordance with federal laws of the Russian Federation and the 1964 Helsinki Declaration with all subsequent additions and amendments regulating scientific research on biomaterial obtained from humans. All participants signed informed voluntary consent to participate in the study.

 **Correspondence should be addressed:** Evgenia S. Grigoryeva pereulok Kooperativny, 5, Tomsk, Russia; 634009; grigoryeva.es@gmail.com

Received: 04.03.2025 **Accepted:** 17.03.2025 **Published online:** 24.03.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.014

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Иммунное микроокружение в опухолях активно участвует в процессах развития и прогрессирования рака. Эту роль подчеркивает быстрое развитие терапевтических подходов, направленных на модуляцию иммунного микроокружения, в том числе при раке легких. В серии фундаментальных исследований на модельных системах выявлены патогенетические механизмы прогрессирования и факторы микроокружения, связанные с резистентностью к иммунотерапии при раке легких [1]. Например, высокий процент лимфоцитов CD8⁺, экспрессирующих PD-1, коррелировал с ограниченным ответом на блокаду PD-1 при поликлональной стимуляции Т-клеток [2]. В ходе изучения взаимосвязи иммунологических параметров и клинического течения заболевания у пациентов были выявлены закономерности, указывающие на значимость иммунного микроокружения [3]. Таким образом, классификация опухолевого иммунного микроокружения (tumor immune microenvironment, TИMТ) на основе лимфоцитов PD-1/PD-L1 и CD8⁺, инфильтрирующих опухоль (tumor-infiltrating lymphocytes, TИL), эффективно стратифицирует пациентов с аденокарциномой легких на группы с различными показателями выживаемости. Примечательно, что группа с низким количеством лимфоцитов CD8⁺ и высокой экспрессией PD-1/PD-L1 демонстрирует самые плохие результаты [4]. Микроокружение имеет не меньшую важность в исследованиях по изучению его связи с ответами на иммунотерапию. Например, показатель отношения иммунных генов, генов цитокератинов и контрольных иммунных точек (IKCscore, от англ. immune-keratin-immune checkpoint score), который выводят из коэффициентов экспрессии различных генов, кодирующих иммунные маркеры и цитокератины, является многообещающим индикатором для прогнозирования эффективности иммунотерапии и комбинированной терапии на основе иммунотерапии при немелкоклеточном раке легких (НМРЛ). Кроме того, уровни инфильтрации лимфоцитами CD8⁺, покоящимися Т-клетками памяти CD4⁺ и покоящимися дендритными клетками значительно выше в группе с высоким IKCscore по сравнению с группой с низким IKCscore [5]. Экспрессия лиганда программируемой смерти 1 (PD-L1) на опухолевых клетках и мутационная нагрузка опухоли (tumor mutational burden, TMB) были идентифицированы как предикторы ответа на иммунотерапию. Однако реальная клиническая практика показывает, что одних этих биомаркеров недостаточно для эффективного отбора пациентов для такого типа терапии. Интересно, что, несмотря на обширные исследования характеристик микроокружения опухоли при раке легких, некоторые аспекты, имеющие отношение к иммунотерапии, остаются неизученными.

Один из классов иммунотерапевтических агентов включает антитела к PD-1, которые нацелены на рецептор, а не на лиганд. Тем не менее, экспрессия PD-1 в микроокружении рака легких плохо изучена. В связи с широкой доступностью терапевтических вариантов, включающих ингибиторы иммунных контрольных точек, понимание особенностей микроокружения опухоли становится решающим, и может способствовать выявлению новых ассоциаций с эффективностью иммунотерапии. Цель данного исследования — оценить экспрессию PD-1 в инфильтрирующих опухоль иммунных клетках и ее связь с клиническими исходами у пациентов с раком легких.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследовании приняли участие 20 пациентов (17 мужчин и три женщины). Критерии включения: морфологически верифицированный диагноз рака легкого. У 12 из 20 пациентов был поставлен диагноз «немелкоклеточного рака легкого», у восьми — «мелкоклеточного рака легкого». Все пациенты имели III–IV стадии заболевания (у 10 пациентов III стадия, у 10 — IV стадия), средний возраст составил 56 ± 6,9 лет. Критерии исключения: наличие рака легкого I–II стадии; наличие сопутствующих аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Пациенты прошли полный курс лечения в соответствии с клиническими рекомендациями (комбинированную терапию, включающую химиотерапию первой и последующих линий по схемам карбоплатин/паклитаксел, пеметрексед/карбоплатин, карбоплатин/этопозид, монокимиотерапию таксанами, деносумаб, химиоиммунотерапию, при наличии показаний пациентам выполняли дистанционную лучевую терапию). Медиана наблюдения составила 12 месяцев.

Имунофенотипирование опухолевого микроокружения

Образцы опухолевой ткани были собраны до начала лечения, зафиксированы в формалине и залиты в парафин с использованием стандартных методов. Затем проводили многоцветное иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание ткани рака легкого с усилением сигнала тирамидом (TSA). Использовали следующие первичные антитела: человеческие анти-CD8 (Ventana, Швейцария; клон SP57, разведение 1 : 10), анти-PD-1 (ABclonal, Китай; клон AMC0439, разведение 1 : 500), анти-CD20 (Leica Biosystems, Германия; клон L26, разведение 1 : 600), анти-CD163 (Diagnostic Biosystems, США; клон 10D6, разведение 1 : 150) и моноклональные антитела анти-FoxP3 (Invitrogen, США; клон 236A/E7, разведение 1 : 800). Для визуализации использовали систему EnVision FLEX/HRP (Dako, Дания) и набор Opal 7-color Fluorophore Kit (Akoya Biosciences, США), включающий тирамид, конъюгированный с флуорофорами. Процедуру окрашивания проводили на автоматическом иммуногистохимическом оборудовании BOND RXm (Leica, Германия). Протокол включал демаскировку антигена с использованием буфера Epitope Retrieval Solution 2 (Leica Biosystems, Германия) при 98,5 °C в течение 20 мин, за которым следовали пять последовательных циклов окрашивания. Каждый цикл состоял из следующих этапов: 10-минутная инкубация с реагентом EnVision FLEX Peroxidase-blocking (Dako, Дания), 10-минутная инкубация с Novocastra Protein Block (Leica Biosystems, Германия), 30-минутная инкубация с первичным антителом, 30-минутная инкубация с EnVision FLEX/HRP и 20-минутная инкубация с красителем Opal. После каждого цикла проводили отмывку первичных и вторичных антител с использованием буфера Epitope Retrieval Solution 2. Ядра клеток контрастировали вручную с использованием Fluoroshield™ с DAPI (Sigma-Aldrich, США). Визуализацию и получение изображений (рис. 1) проводили с использованием системы Vectra® 3.0 (Akoya Biosciences, США), а количественный анализ клеток — с использованием программного обеспечения inForm® (Akoya Biosciences, США) на основе данных, собранных из семи репрезентативных участков тканей.

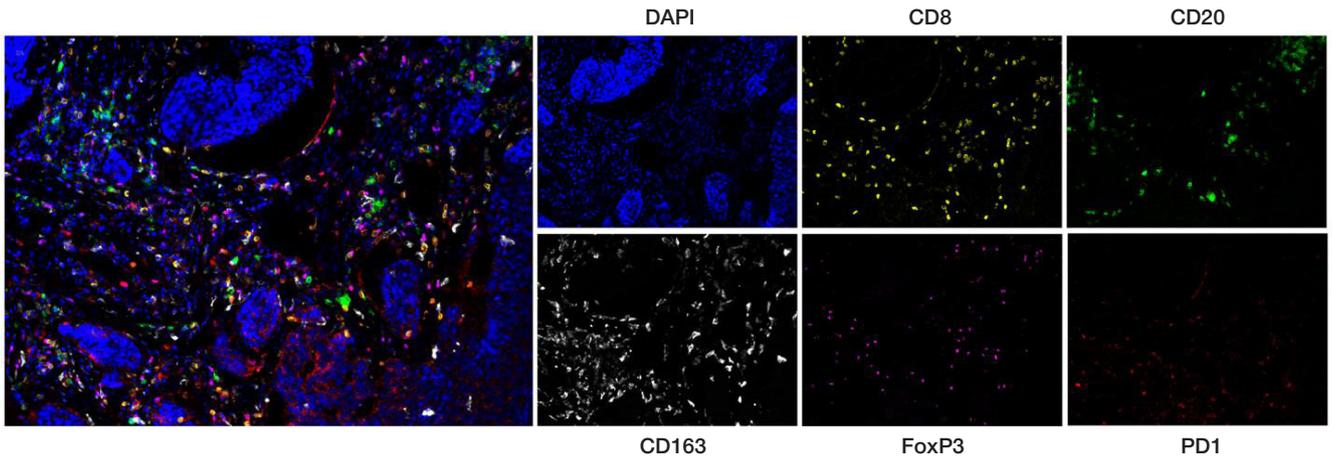


Рис. 1. Микроокружение опухоли при раке легкого. Мультиплексное изображение, увеличение 400×

Плотность инфильтрации цитотоксическими лимфоцитами CD8⁺, В-лимфоцитами CD20⁺, макрофагами CD163⁺, ассоциированными с опухолью и регуляторными Т-лимфоцитами FoxP3⁺ была количественно определена в опухолевой ткани пациентов с раком легких (рис. 1). Результаты были представлены в виде процента каждого типа клеток от общего количества клеток в строме опухоли. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Prism 10 (GraphPad, США). Для выявления различий количества иммунных клеток в микроокружении опухоли использовали критерий Фридмана, для сравнения независимых групп — непараметрический критерий Манна–Уитни. Однофакторный и многофакторный Соx-регрессионный анализ использовали для выявления ассоциации основных клинико-патологических параметров и параметров микроокружения опухоли с выживаемостью без прогрессии пациентов. Все критерии были двухсторонние, различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В микроокружении опухоли НМРЛ медиана доли PD-1-позитивных клеток составила 1,04% (0,17–1,70%), при мелкоклеточном раке легкого (МРЛ) — 0,27% (0,03–2,93%). Частота встречаемости PD-1-позитивных цитотоксических лимфоцитов CD8⁺ составила 83,3% (10/12) у пациентов с

НМРЛ и 37,5% (3/8) у пациентов с МРЛ. В то время как частота PD-1-позитивных В-лимфоцитов CD20⁺ составляла 8,3% (1/12) и 12,5% (1/8), PD-1-позитивных Т-регуляторных лимфоцитов FoxP3⁺ составляла 25% (3/12) и 12,5% (1/8), а PD-1-позитивных макрофагов CD163⁺ — 25% (3/12) и 20% (2/8) соответственно. Мы изучили долю PD-1-позитивных цитотоксических лимфоцитов В-лимфоцитов CD8⁺, CD20⁺, Т-регуляторных лимфоцитов FoxP3⁺ и макрофагов CD163⁺, а также долю других PD-1-позитивных клеток (без определения иммунофенотипа) в опухолевом микроокружении пациентов с немелкоклеточным и мелкоклеточным раком легкого (рис. 2).

При оценке клеточной фракции среди всех клеток в иммунном инфильтрате НМРЛ среди лимфоцитов преобладали PD-1-позитивные CD8⁺-цитотоксические лимфоциты и другие PD-1-позитивные иммунные клетки, составляя 0,24% (диапазон: 0,08–0,46%) и 0,39% (диапазон: 0,00–1,05%) соответственно. В микроокружении МКРЛ не наблюдалось существенных различий в количестве иммунных клеток, экспрессирующих PD-1. Также были определены доли клеток, экспрессирующих PD-1, среди всех изученных иммунофенотипов как для НМРЛ, так и для МКРЛ (табл. 1).

При сравнении доли клеток, экспрессирующих PD-1, между пациентами с НМРЛ и МРЛ существенных различий не выявлено (рис. 3).

При анализе параметров иммунного микроокружения с учетом клинических и патологических параметров

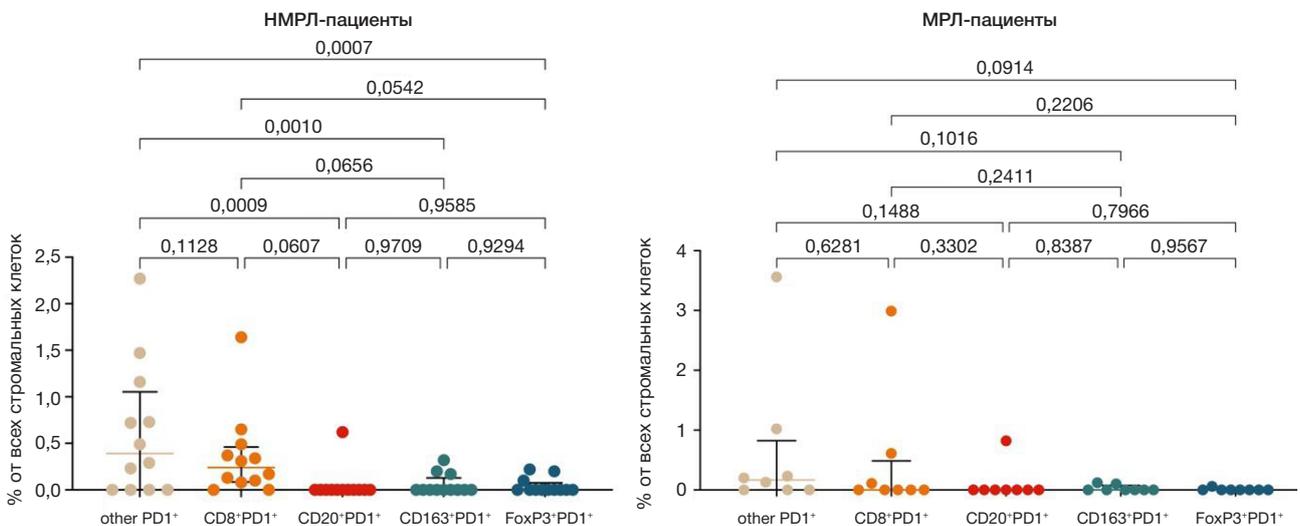


Рис. 2. Доля PD-1-позитивных цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов, CD20⁺-В-лимфоцитов, FoxP3⁺-Т-регуляторных лимфоцитов и CD163⁺-макрофагов, а также других PD-1-позитивных клеток (без определения иммунофенотипа) в микроокружении опухоли у пациентов с НМРЛ и МРЛ

Таблица 1. Доля клеток, экспрессирующих PD-1, среди всех клеток исследуемого иммунофенотипа у пациентов с раком легких, медиана (Q₁-Q₃)

| Параметр | НМРЛ | | МРЛ | |
|--|---|--|---|--|
| | Медиана (Q ₁ -Q ₃) | p-значения | Медиана (Q ₁ -Q ₃) | p-значения |
| 1. CD8 ⁺ PD1 ⁺ | 5,20 (1,15-35,33) | $p_{1-2} = 0,0005$ $p_{1-3} = 0,0006$ $p_{1-4} = 0,0010$ | 0,00 (0,00-12,02) | $p_{1-2} = 0,0527$ $p_{1-3} = 0,0547$ $p_{1-4} = 0,0381$ |
| 2. CD20 ⁺ PD1 ⁺ | 0,00 (0,00-0,00) | $p_{2-3} = 0,9465$ $p_{2-4} = 0,8265$ | 0,00 (0,00-0,00) | $p_{2-3} = 0,9864$ $p_{2-4} = 0,8784$ |
| 3. CD163 ⁺ PD1 ⁺ | 0,00 (0,00-1,05) | $p_{3-4} = 0,8791$ | 0,00 (0,00-0,87) | $p_{3-4} = 0,8650$ |
| 4. FoxP3 ⁺ PD1 ⁺ | 0,00 (0,00-1,07) | | 0,00 (0,00-0,00) | |

рака легких не выявлено значимых корреляций между исследуемыми популяциями клеток и возрастом пациента, статусом курения или наличием отдаленных метастазов (стадия M1). Однако статистически значимая связь наблюдалась между стадией заболевания и долей CD8⁺-лимфоцитов у пациентов с МРЛ. В частности, у пациентов с III-IV стадией заболевания обнаружено снижение доли CD8⁺-лимфоцитов в микроокружении опухоли по сравнению с пациентами со II стадией (3,49% [диапазон: 3,07-1,19%] против 4,82% [диапазон: 3,76-9,88%], $p = 0,0286$). Кроме того, оценена связь между характеристиками микроокружения опухоли и отдаленными результатами лечения с помощью регрессионного анализа Кокса (табл. 2).

Повышенная доля CD20⁺-лимфоцитов в микроокружении опухоли была выявлена как более значимый независимый фактор, связанный с плохой выживаемостью без прогрессирования у пациентов с раком легких (HR = 0,17 [0,02-0,65], $p = 0,0454$), по сравнению с такими факторами, как стадия, гистологический тип, статус курения, наличие метастазов в региональных лимфатических узлах и отдаленных метастазов (стадия M1). Кроме того, анализ прогностической ценности популяций иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, с учетом клинико-патологических параметров показал, что независимые предикторы более короткой выживаемости без прогрессирования при раке легких включают наличие отдаленных метастазов (стадия M1), высокую долю CD163⁺-макрофагов, экспрессирующих PD-1, и низкую долю FoxP3⁺-лимфоцитов, экспрессирующих PD-1 (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клиническое значение экспрессии PD-1, особенно в контексте иммунотерапии, остается плохо изученным. В литературе доступны ограниченные и противоречивые данные о прогностической ценности определения

экспрессии PD-1. Так, описано, что пациенты с ранней стадией НМРЛ, у которых экспрессия PD-1 составляла $\geq 10\%$ на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, имели неблагоприятные показатели 10-летней выживаемости [6]. По другим данным, положительная экспрессия PD-1 в сочетании с высоким количеством лимфоцитов (CD3, CD4, CD8 и FOXP3) была связана со значительно лучшими показателями выживаемости по сравнению с отрицательной экспрессией PD-1 в сочетании с более низким количеством лимфоцитов [7]. В нашем исследовании мы оценили экспрессию PD-1, учитывая иммунофенотип клеток. Мы сосредоточились на четырех наиболее значимых популяциях, для которых есть доказательства, предполагающие связь с ответом на иммунотерапию, поскольку пациенты, включенные в наше исследование, являются потенциальными кандидатами на анти-PD-1-терапию в последующих линиях терапии. Говоря о значимости экспрессии PD-1 для прогноза уже на фоне иммунотерапии, следует упомянуть работу, в которой показано, что низкая частота экспрессии PD-1 среди CD8⁺-лимфоцитов была отличительной чертой пациентов, прошедших лечение ниволумабом, и это также было связано с клиническими преимуществами и более продолжительной выживаемостью без прогрессирования (HR = 4,51; 95% ДИ: 1,45-13,94) [8]. В нашем исследовании экспрессия PD-1 была обнаружена преимущественно на CD8⁺-лимфоцитах, хотя доля PD-1⁺-клеток в популяции CD8⁺-лимфоцитов составляла около 5% и не была связана с выживаемостью без прогрессии. Известно, что эффекторная функция постепенно утрачивается при прогрессирующем истощении Т-клеток. В недавно опубликованном исследовании была отмечена обратная корреляция между функцией Т-клеток и уровнем экспрессии PD-1 [9]. Таким образом, экспрессия PD-1 на цитотоксических лимфоцитах указывает на состояние истощения. Важно отметить, по полученным

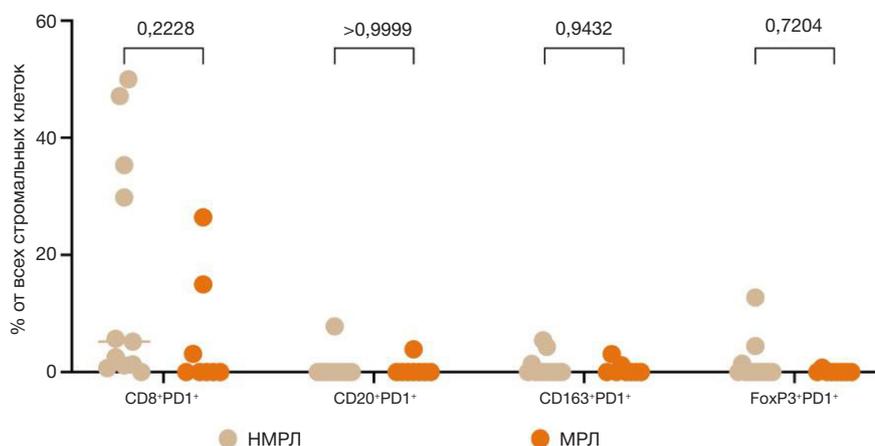


Рис. 3. Сравнение доли клеток, экспрессирующих PD-1, между пациентами с НМРЛ и МРЛ

Таблица 2. Однофакторный и многофакторный регрессионный анализ значимости клинико-патологических параметров и популяций иммунных клеток в продолжительности выживаемости без прогрессирования у пациентов с раком легкого

| Параметр | Однофакторный | | | Многофакторный | | |
|-----------|---------------|-----------|---------|----------------|------------|---------|
| | HR | 95% CI | P value | HR | 95% CI | P value |
| Курение | 1,23 | 0,37–4,75 | 0,7366 | 0,4716 | 0,07–3,12 | 0,4167 |
| Гистотип | 0,83 | 0,24–2,93 | 0,7659 | 1,236 | 0,15–9,33 | 0,8365 |
| Стадия | 1,4 | 0,69–3,16 | 0,367 | 0,6977 | 0,11–4,17 | 0,6798 |
| Стадия T | 1,29 | 0,71–2,44 | 0,4074 | 1,54 | 0,69–4,14 | 0,3158 |
| Стадия M1 | 0,79 | 0,23–3,11 | 0,7177 | 0,07 | 0,001–1,13 | 0,1158 |
| CD8 | 1,01 | 0,86–1,17 | 0,8213 | 1,58 | 0,91–4,00 | 0,237 |
| CD20 | 0,42 | 0,09–0,88 | 0,1532 | 0,17 | 0,02–0,65 | 0,0454 |
| CD163 | 1 | 0,84–1,16 | 0,9954 | 1 | 0,78–1,29 | 0,9392 |
| FoxP3 | 0,89 | 0,69–1,11 | 0,3567 | 0,6 | 0,20–1,25 | 0,2925 |

нами данным, иммунные клетки, экспрессирующие PD-1, чрезвычайно редки в микроокружении как НМРЛ, так и МРЛ. Это указывает на то, что большинство иммунных клеток в строме опухоли находится преимущественно в активном функциональном состоянии. Наши результаты показывают, что клетки, на которые нацелены анти-PD-1 терапевтические антитела, немногочисленны в микроокружении опухоли и в основном состоят из цитотоксических лимфоцитов, экспрессирующих PD-1. Блокирование контрольной точки в этих немногих клетках может потенциально восстановить их истощенную функцию. В то же время небольшое количество этих клеток может объяснить ограниченные терапевтические эффекты, наблюдаемые при использовании анти-PD-1-терапии.

В настоящее время мы не можем оценить корреляцию между конкретными характеристиками клеточного состава микроокружения опухоли и результатами лечения у этих пациентов, поскольку их терапия все еще продолжается. Тем не менее, это исследование позволило нам оценить связь между различными параметрами микроокружения опухоли и выживаемостью без прогрессирования (PFS). Наши результаты подчеркивают решающую важность состава иммунных клеток в микроокружении опухоли для определения PFS у пациентов с раком легких. В частности, повышенная доля CD20⁺-лимфоцитов была идентифицирована как значимый независимый предиктор более плохой PFS, показывающий отношение рисков (HR) 0,17 (95% ДИ: 0,02–0,65, $p = 0,0454$). Эта связь представляется более существенной, чем обычные прогностические факторы, включая стадию опухоли,

гистологический подтип, статус курения и наличие региональных или отдаленных метастазов (стадия M1). Результаты показывают, что инфильтрация В-клеток может играть ранее недооцененную роль в прогрессировании рака легких, возможно, из-за ее влияния на подавление или модуляцию иммунитета в опухолевом микроокружении. Необходимы дальнейшие исследования для изучения функционального воздействия CD20⁺-лимфоцитов на рак легких с целью выяснения их роли в биологии опухоли и устойчивости к эффективному лечению.

Более того, проведенный нами анализ, касающийся популяций иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, обнаружил новые данные о связях между экспрессией иммунных контрольных точек и клиническими результатами. Так, наличие отдаленных метастазов (стадия M1), высокая доля CD163⁺-макрофагов, положительных по PD-1, и низкая доля FoxP3⁺-лимфоцитов, положительных по PD-1, были идентифицированы как предикторы более короткой выживаемости без прогрессии. Эти наблюдения подчеркивают сложность иммунной регуляции в опухолевом микроокружении, где тонкий баланс между популяциями иммуносупрессивных и иммуностимулирующих клеток критически влияет на прогрессирование заболевания. Связь PD-1⁺CD163⁺-макрофагов с плохими результатами лечения преимущественно наблюдалась в моделях на животных [10]. Напротив, противоопухолевый эффект, наблюдаемый в PD-1⁺FoxP3⁺-лимфоцитах, предполагает потенциальную регуляторную функцию, хотя наличие Treg-лимфоцитов, как правило, связано с плохими результатами [11]. Эти результаты имеют существенное значение для разработки прогностических биомаркеров

Таблица 3. Однофакторный и многофакторный регрессионный анализ влияния клинико-патологических параметров и популяций иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, на продолжительность выживаемости без прогрессирования у пациентов с раком легких

| Параметр | Однофакторный | | | Многофакторный | | |
|--------------------------------------|---------------|-----------|---------|----------------|-------------|---------|
| | HR | 95% CI | P value | HR | 95% CI | P value |
| Курение | 1,23 | 0,37–4,75 | 0,7366 | 3,85 | 0,33–125,70 | 0,3402 |
| Гистотип | 0,83 | 0,24–2,93 | 0,7659 | 4 | 0,06–186,10 | 0,481 |
| Стадия | 1,4 | 0,69–3,16 | 0,367 | 2,32 | 0,30–71,80 | 0,549 |
| Стадия T | 1,29 | 0,71–2,44 | 0,4074 | 0,8 | 0,17–2,81 | 0,7545 |
| Стадия M1 | 0,79 | 0,23–3,11 | 0,7177 | 0,004 | 0,0003–0,26 | 0,0349 |
| %CD8 ⁺ PD1 ⁺ | 1,011 | 0,97–1,04 | 0,5361 | 1,019 | 0,93–1,11 | 0,6532 |
| %CD20 ⁺ PD1 ⁺ | 0,001 | – | >0,9999 | 0,001 | – | >0,9999 |
| %CD163 ⁺ PD1 ⁺ | 1,39 | 0,95–1,97 | 0,0619 | 4,78 | 1,35–33,64 | 0,041 |
| %FoxP3 ⁺ PD1 ⁺ | 1,06 | 0,85–1,22 | 0,4517 | 0,44 | 0,16–0,89 | 0,0484 |

и формулирования иммунотерапевтических стратегий при лечении рака легких. Идентификация субпопуляций иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, в качестве прогностических маркеров подчеркивает необходимость более глубокого понимания функционирования опухолевого микроокружения. Нацеливание на обнаруженные популяции, либо посредством прямой модуляции, либо в сочетании с существующими ингибиторами иммунных контрольных точек, может проложить путь к улучшению терапевтических результатов. Тем не менее, функциональная гетерогенность в этих популяциях клеток требует более подробных механистических исследований для выяснения их роли в иммунитете опухоли и определения оптимальных терапевтических целей.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование предоставляет убедительные доказательства того, что иммунный ландшафт опухолевого микроокружения, в частности состав иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, в значительной степени связан с результатами лечения рака легких. Эти результаты подчеркивают критическую важность иммунного контекста в определении прогноза клинического течения и разработке терапевтических стратегий. Будущие исследования должны быть сосредоточены на подтверждении этих результатов на более крупных независимых когортах пациентов и дальнейшем изучении их прогностического потенциала в отношении иммунотерапии при раке легких.

Литература

- Hynds RE, Frese KK, Pearce DR, Grönroos E, Dive C, Swanton C. Progress towards non-small-cell lung cancer models that represent clinical evolutionary trajectories. *Open Biol.* 2021; 11 (1): 200247. DOI: 10.1098/rsob.200247.
- Thommen DS, Schreiner J, Müller P, Herzig P, Roller A, Belousov A, et al. Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer immunology research.* 2015; 3: 1344–55. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0097.
- Enfield KSS, Collier E, Lee C, Magness A, Moore DA, Sivakumar M, et al. Spatial Architecture of Myeloid and T Cells Orchestrates Immune Evasion and Clinical Outcome in Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2024; 14 (6): 1018–47. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-23-1380.
- Lin Z, Gu J, Cui X, Huang L, Li S, Feng J et al. Deciphering Microenvironment of NSCLC based on CD8⁺ TIL Density and PD-1/PD-L1 Expression. *J Cancer.* 2019; 10 (1): 211–22. DOI:10.7150/jca.26444.
- Wu J, Wang Y, Huang Z, Wu J, Sun H, Zhou R, et al. Tumor microenvironment assessment-based signatures for predicting response to immunotherapy in non-small cell lung cancer. *iScience.* 2024; 27 (12): 111340. DOI: 10.1016/j.isci.2024.111340.
- Dan A, Aricak O, Rounis K, Montero-Fernandez MA, Guijarro R, Ekman S. et al. PD-1 expression in tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer.

- Front Oncol. 2024; 14: 1414900. DOI: 10.3389/fonc.2024.1414900.
- Sun C, Zhang L, Zhang W, Liu Y, Chen B, Zhao S, et al. Expression of PD-1 and PD-L1 on Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predicts Prognosis in Patients with Small-Cell Lung Cancer. *OncoTargets and Therapy.* 2020; 13: 6475–83. Available from: <https://doi.org/10.2147/OTT.S252031>.
- Mazzaschi G, Madeddu D, Falco A, Bocchialini G, Goldoni M, Sogni F et al. Low PD-1 Expression in Cytotoxic CD8⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Confers an Immune-Privileged Tissue Microenvironment in NSCLC with a Prognostic and Predictive Value. *Clin Cancer Res.* 2018; 24 (2): 407–19. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2156.
- Kansy BA, Concha-Benavente F, Srivastava RM, Jie HB, Shayan G, Lei Y, et al. PD-1 Status in CD8(+) T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 2017; 77: 6353–64. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3167.
- Chen L, Cao MF, Xiao JF, Ma QH, Zhang H, Cai RL, et al. Stromal PD-1+ tumor-associated macrophages predict poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2020; 97: 68–79. DOI: 10.1016/j.humpath.2019.12.007.
- Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer.* 2012; 75 (1): 95–101. DOI: 10.1016/j.lungcan.2011.06.002.

References

- Hynds RE, Frese KK, Pearce DR, Grönroos E, Dive C, Swanton C. Progress towards non-small-cell lung cancer models that represent clinical evolutionary trajectories. *Open Biol.* 2021; 11 (1): 200247. DOI: 10.1098/rsob.200247.
- Thommen DS, Schreiner J, Müller P, Herzig P, Roller A, Belousov A, et al. Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer immunology research.* 2015; 3: 1344–55. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0097.
- Enfield KSS, Collier E, Lee C, Magness A, Moore DA, Sivakumar M, et al. Spatial Architecture of Myeloid and T Cells Orchestrates Immune Evasion and Clinical Outcome in Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2024; 14 (6): 1018–47. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-23-1380.
- Lin Z, Gu J, Cui X, Huang L, Li S, Feng J et al. Deciphering Microenvironment of NSCLC based on CD8⁺ TIL Density and PD-1/PD-L1 Expression. *J Cancer.* 2019; 10 (1): 211–22. DOI:10.7150/jca.26444.
- Wu J, Wang Y, Huang Z, Wu J, Sun H, Zhou R, et al. Tumor microenvironment assessment-based signatures for predicting response to immunotherapy in non-small cell lung cancer. *iScience.* 2024; 27 (12): 111340. DOI: 10.1016/j.isci.2024.111340.
- Dan A, Aricak O, Rounis K, Montero-Fernandez MA, Guijarro R, Ekman S. et al. PD-1 expression in tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer.

- Front Oncol. 2024; 14: 1414900. DOI: 10.3389/fonc.2024.1414900.
- Sun C, Zhang L, Zhang W, Liu Y, Chen B, Zhao S, et al. Expression of PD-1 and PD-L1 on Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predicts Prognosis in Patients with Small-Cell Lung Cancer. *OncoTargets and Therapy.* 2020; 13: 6475–83. Available from: <https://doi.org/10.2147/OTT.S252031>.
- Mazzaschi G, Madeddu D, Falco A, Bocchialini G, Goldoni M, Sogni F et al. Low PD-1 Expression in Cytotoxic CD8⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Confers an Immune-Privileged Tissue Microenvironment in NSCLC with a Prognostic and Predictive Value. *Clin Cancer Res.* 2018; 24 (2): 407–19. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2156.
- Kansy BA, Concha-Benavente F, Srivastava RM, Jie HB, Shayan G, Lei Y, et al. PD-1 Status in CD8(+) T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 2017; 77: 6353–64. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3167.
- Chen L, Cao MF, Xiao JF, Ma QH, Zhang H, Cai RL, et al. Stromal PD-1+ tumor-associated macrophages predict poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2020; 97: 68–79. DOI: 10.1016/j.humpath.2019.12.007.
- Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer.* 2012; 75 (1): 95–101. DOI: 10.1016/j.lungcan.2011.06.002.