

Оценка
инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL)
при раке молочной железы
в ежедневной клинической практике.

Вишневская Я.В.

***ФГБУ НМИЦ онкологии имени
Н.Н. Блохина
Минздрава России
2019г.***



- **Зачем мы определяем TIL?**
- **Количественная оценка TIL**
- **Субпопуляционный состав TIL**
- **TIL в резидуальной опухоли**

- **Зачем мы определяем TIL?**
- Количественная оценка TIL
- Субпопуляционный состав TIL
- TIL в резидуальной опухоли

Зачем мы определяем TIL в РМЖ?

- Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL) отвечают за формирование адаптивного иммунного ответа на рост опухоли.
- TIL - важный прогностический фактор для **HER2-позитивного** и **трижды негативного** рака молочной железы. Роль при люминальном РМЖ остается неясной.
- Определение TIL при РМЖ становится все более актуальным вопросом в свете новых возможностей иммунотерапии на поздних стадиях РМЖ.

SABCS 2016, Сан-Антонио (Техас, США)

Уровень стромальных TIL \geq 60% коррелирует

- С ER- **негативными** опухолями.
- С хорошим **ответом на НА ХТ** и лучшим прогнозом.
- С увеличением частоты патологической полной ремиссии (**pCR**) при всех молекулярных подтипах РМЖ, независимо от других клинико-патологических прогностических показателей и режимов химиотерапии.
- С повышением **общей выживаемости** - только у больных диссеминированным HER2-положительным и трижды негативным местно-распространенным РМЖ.

*Luen S. et al. (Abstract S1-08)
Denkert C. et al. (Abstract S1-09)*

Результаты исследования WO20698/CLEOPATRA:

- Это первое исследование, в котором была оценена связь между уровнями стромальных TIL и выживаемостью при метастатическом HER2+ РМЖ в контексте двойной HER2-блокады трастузумабом и пертузумабом.
- Взяты 678 (84%) гистологических образцов опухолевой ткани: 519 (76,5%) архивных образцов, 155 (22,9%) текущих образцов. Медиана наблюдения - 50 месяцев, за время которой зарегистрировано 519 случаев рецидивов и 358 смертей. Средний уровень инфильтрации стромальных TIL был 10% (1-95%).

Результаты исследования WO20698/CLEOPATRA:

- Высокий уровень TIL наблюдали чаще при ER- ПМЖ в сравнении с ER+ ПМЖ (15% vs 10% соответственно, $p < 0,001$).
- 5-летняя общая выживаемость при **уровне стромальных TILs $\leq 10\%$ vs $> 10\%$ составила:**
 - в группе TD (трастузумаб+доцетаксел) **26%** (95% ДИ 19-37) vs **39%** (95% ДИ 32-48)
 - в группе PTD (трастузумаб+пертузумаб+доцетаксел) **42%** (95% ДИ 33-53) vs **56%** (95% ДИ 47-66) соответственно.
- **Каждое последующее увеличение количества стромальных TIL на 10% сопряжено с уменьшением риска смерти на 11%** (OR 0,89; 95% ДИ 0,83-0,96), $p = 0,001$.

Вторичный анализ исследования WO20698/CLEOPATRA:

- Не наблюдалось различий степени выраженности TIL в различных возрастных группах.
- Прогностическая ценность TIL имела «переменные пороги» в зависимости от возраста пациента, сопутствующего состояния, в первую очередь аутоиммунные расстройства и воздействие кортикостероидов.
- TIL не должны использоваться ни для того, чтобы прекратить или назначать терапию трастузумабом

Stephen J Luen, Published Online, 2016
[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30637-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30637-4).

Результаты исследования BIG 2–98 и восточной кооперативной онкологической группы США (ECOG) 2197 и 1199

- Трижды негативный -1300 случаев,
Люминальный – 3500 случаев.
TIL явился положительным прогностическим биомаркером в 297 TNBC.
- При TNBC - чем больше стромальных TIL у пациента при постановке диагноза, тем лучше их результат после адъювантной химиотерапии на основе антрациклина.
- TIL являются предикторами патологического ответа на HA XT на основе платины.

- Зачем мы определяем TIL?
- **Количественная оценка TIL**
- Субпопуляционный состав TIL
- TIL в резидуальной опухоли

Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL)

(International TILs-working group, 2014г.)

- Существует значительная гетерогенность плотности TIL между вариантами РМЖ.
- Следует различать стромальные и интрамуральные (внутриопухолевые) лимфоциты.

Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL)

- **Стромальные TIL** локализованы в строме между клетками рака и не контактируют непосредственно с клетками рака - %
- **Интрамуральные TIL** имеют межклеточный контакт без промежуточной стромы и непосредственно взаимодействуют с клетками рака - %.



Истинные TIL

Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL)

(International TILs-working group, 2014г.)

- У стромальных TIL предиктивная и прогностическая ценность лучше. Они более воспроизводимы между исследованиями.
- Интратуморальные TIL более трудны для оценки и не дают дополнительной прогностической информации по сравнению со стромальными TIL.

Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL)



Г-Э

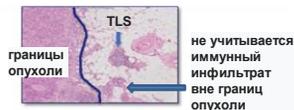
CD45

Технические вопросы для оценки TIL при РМЖ

- Увеличение микроскопа не имеет значения (рекомендуется увеличение сначала $\times 50$, затем $\times 200$ – 400).
- Срезы с парафиновых блоков 4–5 мкм с окраской гематоксилином&эозином (оценка TIL на замороженных срезах не рекомендуется).
- TIL могут быть оценены в биопсийном и операционном материале до и после НА ХТ.

Стандартизированный подход к оценке TILs при РМЖ

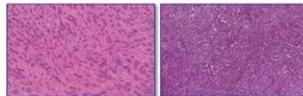
Шаг 1: Выберите область опухоли



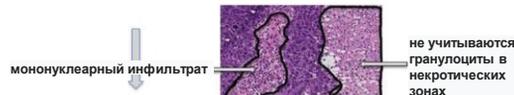
Шаг 2: Определите область стромы



Шаг 3: Оценка при малом увеличении



Шаг 4: Определите тип воспалительного инфильтрата

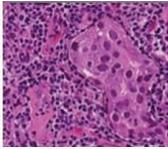
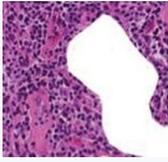


Шаг 5: Оцените процент стромальных TILs

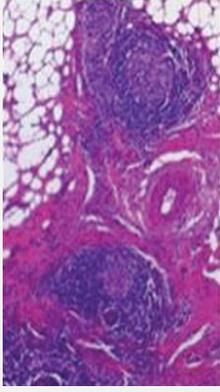


TILs Working Group, 2014

Биологическая и диагностическая значимость различных иммунных инфильтратов, обнаруженных морфологически при раке молочной железы

Морфология	Определение и биологическая значимость	Диагностическая значимость
Лимфоцит-преобладающий РМЖ (LPBC)		
	Рабочая категория для опухолей с преобладанием лимфоцитов над опухолевыми клетками	Пороговое значение стромальных TIL – 50-60%, TIL являются «непрерывным» параметром
Стромальные TIL		
	Показатель повышенного накопления иммунных клеток в опухолевой ткани	Стромальные TIL являются фактором прогноза для увеличения ответа на АХТ, а также улучшения результатов после АХТ – лучший параметр для характеристики TIL
Инtratуморальные TIL		
	Показатель прямого противоопухолевого лечебного эффекта на клеточном уровне	Внутриопухолевые TIL более трудны для оценки и не дают дополнительной прогностической информации по сравнению со стромальными TIL

Denkert et al., 2010 / TILs Working Group, 2014

Морфология	Определение и биологическая значимость	Диагностическая значимость
TIL на «инвазивной» границе		
Локализация TIL – важный аспект данного руководства	Нет отдельной оценки TIL на «инвазивной» границе. Оценка «инвазивного» края может быть затруднена в core-биопсии.	
Третичные лимфоидные структуры (TLS)		
	Локализованы перитуморально в нормальной ткани, непосредственно прилегающей к опухоли, состоит из T-клеток рядом с фолликулом из B-клеток, часто – с зародышевым центром	TLS имеют пространственную гетерогенность и локализуются в областях, окружающих опухоль. При отсутствии зародышевых центров их трудно дифференцировать с реактивными лимфоидными инфильтратами.

Denkert et al., 2010 / TILs Working Group, 2014

Рекомендации по оценке TIL при РМЖ

- TIL оценивается в стромальном компоненте опухоли (%): в строме учитывается % площади, занимаемой мононуклеарными воспалительными клетками от общей внутриопухолевой области стромы, а не количество стромальных клеток.
- В оценку включаются все мононуклеарные клетки (лимфоциты, плазматические клетки). Гранулоциты и другие полиморфно-ядерные лейкоциты в оценку не включаются. Не рекомендуется включать в оценку другие мононуклеарные клетки - дендритные клетки и макрофаги.

Рекомендации по оценке TIL при РМЖ

- TIL следует оценивать в пределах границ инвазивной опухоли, исключив TIL вне границы опухоли, а также вокруг DCIS и нормальных долек.
- Следует исключить TIL в опухолевых зонах с артефактами раздавливания, некрозом, регрессивной гиалинизацией, а также в участке после биопсии.
- Срезы «полной» опухоли предпочтительнее биопсированных.

Рекомендации по оценке TIL при РМЖ

- Следует оценивать среднее значение TIL в области опухоли, не сосредотачиваясь на горячих точках.
- Допустим шаг в 5%-10% (округление).
- Для оценки % TIL необходимо учитывать диссоциированную модель роста лимфоцитов. Лимфоциты обычно не образуют сплошных клеточных агрегатов, поэтому обозначение «100% стромальных TIL» все равно подразумевает наличие свободного пространства между отдельными лимфоцитами.
- Нет четких рекомендаций относительно клинически значимого порогового значения TIL.

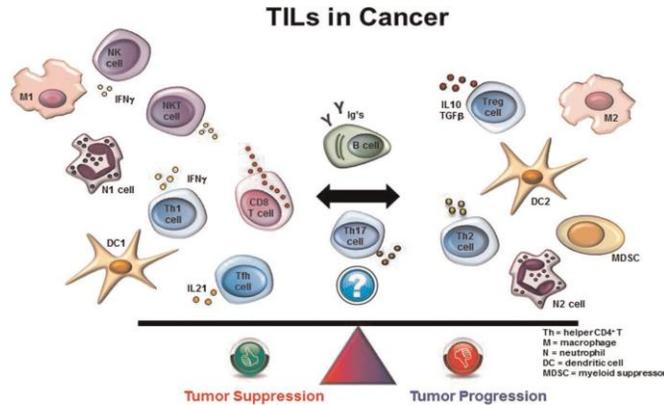
Оценка стромального TIL в баллах

Балл	0	1	2	3
TIL %	0	≤10%	10–50%	> 50%
Оценка	Отрицательная		Положительная	

Yuka Asano et al. BMC Cancer (2017)

- Зачем мы определяем TIL?
- Количественная оценка TIL
- **Субпопуляционный состав TIL**
- TIL в резидуальной опухоли

Субпопуляции TIL в РМЖ



В популяции лимфоцитов в основном входят CD8⁺ цитотоксические T-клетки и CD4⁺ хелперные T-клетки, за которыми следуют регуляторные T-клетки и различные популяции B-клеток.

TILs Working Group, 2014

Цитотоксические Т-лимфоциты

- В генерации иммунных реакций на тканевом уровне преобладают регуляторные механизмы иммунологического ответа с участием CD8⁺ T-клеток.
- Высокие уровни CD8⁺ и соотношения CD8⁺/FOXP3⁺ TIL в ER «-» РМЖ коррелируют с лучшими показателями БРВ.
- Повышение уровня CD8⁺ TIL с низкого на высокий также имело положительное прогностическое значение: 5-летняя БРВ составила 74% при значительном повышении уровня CD8⁺ TIL и всего 20 % при незначительном повышении этого показателя.
- Новые иммунотерапевтические препараты пембролизумаб, ниволумаб и др. могут эффективно усиливать противоопухолевое действие CD8⁺ TIL.

*Заботина Т.Н., 2017
Miyashita, 2015*

Субпопуляции Т-лимфоцитов

- Различные субпопуляции CD4+ Т-клеток присутствуют в микроокружении РМЖ и включают подгруппы Т-хелперов (Th), регуляторные Т-клетки (Tregs), фолликулярные Т-клетки.
- Присутствие Т-хелперов (Th) ассоциируется с хорошим прогнозом, хотя у них присутствуют как стимулирующие рост опухоли, так и противоопухолевые функции.
- Т-регуляторные клетки, включая CD4+CD25+FOXP3+ (Tregs-клетки), играют решающую роль в защите здоровых тканей от повреждения вследствие воспаления и предотвращения аутоиммунных реакций. В тоже время, наличие регуляторных Т-клеток (Tregs) отрицательно влияет на исход заболевания при РМЖ.
- Фолликулярные Т-клетки играют противоопухолевую роль и связаны с лучшим прогнозом при HER2+ РМЖ.

В-лимфоциты

- Опухолевые реактивные В-клетки могут продуцировать антитела, которые распознают эпитопы неоантигенов, усиливающие элиминацию (ликвидацию) опухоли Т-клетками и клетками врожденного иммунитета.
- Опухолевые регуляторные В-клетки (B-reg) секретируют иммуносупрессивные цитокины, которые ингибируют пролиферацию CD4+ Т-клеток.
- Экспрессия чекпоинт-белка PD-L1 на В-клетках ингибирует противоопухолевые ответы Т-клеток.

Опухоль-инфильтрирующие миелоидные клетки

- Инфильтрирующие опухоль макрофаги (TAM) способствуют метастазированию, ассоциируются с ER- опухолями, высоким Grade, плохим прогнозом.
- Нейтрофилы сокращают пролиферацию Т-клеток и, следовательно, подавляют их эффекторную функцию, играют роль в учащении метастазирования, индуцируют секретируемые NOS (эндогенные NO-синтазы).
- Миелоидные по происхождению супрессивные клетки (MDSCs) являются фактически незрелыми миелоидными клетками, которые также обладают иммуносупрессивной способностью, связаны с неблагоприятным прогнозом.
- MDSCs ингибируют эффекторные функции Т-клеток, клеток натуральных киллеров (NK) и дендритных клеток (DCs), одновременно стимулируя функции противоопухолевых Tregs. TAMs, Th2 через различные механизмы.

Субпопуляционные корреляции TIL в РМЖ

Высокий уровень субпопуляции TIL коррелирует с прогнозом:

- с хорошим прогнозом

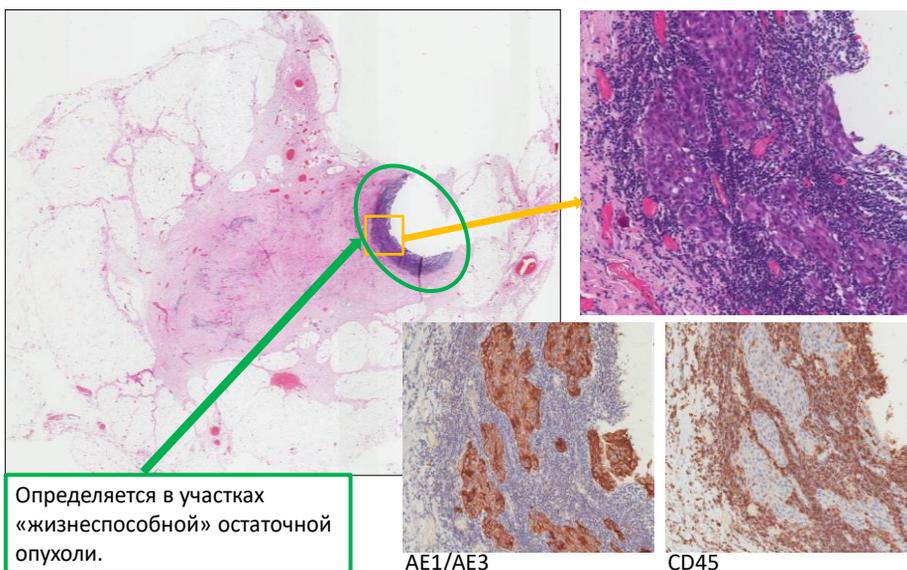
CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты, Th1 Th17 CD4+ Т-лимфоциты, натуральные киллеры, дендритные клетки.

- с плохим прогнозом

CD4+CD25+FOXP3+ регуляторные Т-клетки, Th2 CD4+ Т-клетки, миелоидные супрессорные клетки, M2 макрофаги и нейтрофилы.

- Зачем мы определяем TIL?
- Количественная оценка TIL
- Субпопуляционный состав TIL
- TIL в резидуальной опухоли

TIL в резидуальной опухоли



TIL в резидуальной опухоли

- Цитотоксическое лечение (ХТ, ЛТ) может приводить в действие противоопухолевый иммунный ответ, направленный на более широкий спектр антигенов РМЖ, и, соответственно, на контроль популяций гетерогенных злокачественных клеток, часто присутствующих в крупных первичных опухолях и возникающих метастазах.
- Степень TIL является прогностическим фактором лучшей местной реакции на неoadъювантное лечение и прогностическим фактором длительного контроля заболевания.
- Высокий уровень TIL или увеличение TIL в остаточной опухоли коррелирует с увеличением бессобытийной и общей выживаемости.

Denkert Cet al. TIL an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. J Clin Oncol 2010

RCB-TIL в резидуальной опухоли

RCB-TIL «+»	RCB-TIL «-»
RCB – I (pCR), TIL >50%	Остальные комбинации RCB –TIL

Asano et al. BMC Cancer , 2017

Корреляция между клинико-морфологическими особенностями и RCB-TIL железы

Parameters		RCB-TILs in all breast cancers (n = 177)		p value	
		Positive (n = 112)	Negative(n = 65)		
Age at operation	≤ 56	52 (46.4%)	35 (53.9%)	0.341	
	> 56	60 (53.6%)	30 (46.1%)		
Menopause	Pre-menopausal	44 (39.3%)	28 (43.1%)	0.621	
	Post-menopausal	68 (60.7%)	37 (56.9%)		
Tumor size	≤ 2 cm	19 (17.0%)	5 (7.7%)	0.082	
	> 2 cm	93 (83.0%)	60 (92.3%)		
Lymph node status	Negative	27 (24.1%)	14 (21.5%)	0.696	
	Positive	85 (75.9%)	51 (78.5%)		
Nuclear grade	1, 2	81 (72.3%)	56 (86.2%)	0.034	
	3	31 (27.7%)	9 (13.8%)		
Ki67	≤ 14%	36 (32.1%)	38 (58.5%)	0.001	
	> 14%	76 (67.9%)	27 (41.5%)		
Intrinsic subtype	TNBC	49 (43.8%)	12 (16.0%)	0.001	
	non-TNBC	63 (56.2%)	53 (84.0%)		
	HER2BC	26 (23.2%)	10 (15.4%)		0.212
	non- HER2BC	86 (76.8%)	55(84.6%)		
	HRBC	37 (33.0%)	43 (66.2%)		
non-HRBC	75 (67.0%)	22 (33.8%)			

RCB-TIL в резидуальной опухоли

- RCB-TIL «+» TNBC пациенты имели значительно выше показатель pCR ($p = 0.023$), по сравнению с пациентами с HER2+ RCB-TIL «+» ($p = 0,004$). У пациентов HR с RCB-TIL «+» выше значение pCR ($p = 0,007$) при Ki67>14% ($p = 0,024$).
- RCB-TIL является важным предиктором возникновения рецидива РМЖ после НА ХТ и может быть более чувствительным предсказателем, чем один TIL.

Asano et al. BMC Cancer, 2017

TIL+Ki67+RCB в резидуальной опухоли

- Низкий уровень Ki67 (< 20%) и повышение TIL на фоне проведения НА ХТ (с < 40% в первичной опухоли до ≥50% в резидуальной) достоверно коррелируют с лучшей БРВ.
- Объединение данных по уровню Ki67, динамике TIL и классам RCB позволило более четко разделить резидуальные опухоли хорошего и плохого прогноза.

TIL	RCB	Ki67	2х-летняя БРВ
Повышение >50%	RCB0+I	Ki67<20%	95,8%
	RCBII+III		88,9 %
	RCBII+III	Ki67≥20%	64,2%

- Возможен отказ от проведения адъювантной ХТ (капецитабином).

Asano et al. BMC Cancer , 2017

Фролова М.А., НМИЦ им. Блохина МЗ, 2019

Резюме

- Иммунологические параметры, в том числе стромальные TIL, связаны с более высокой частотой патологической полной ремиссии (pCR), независимо от других клинико-патологических прогностических показателей или режим химиотерапии.
- TIL не должны использоваться ни для того, чтобы прекратить или назначать терапию трастузумабом, но могут учитываться при назначении адъювантной ХТ (капецитабином).
- RCB-TIL является важным предиктором рака молочной железы рецидива после НА ХТ и может быть более чувствительным показателем, чем один TIL.
- Объединенные данных Ki67+TIL+RCB позволяют более четко разделить резидуальные опухоли хорошего и плохого прогноза.

*Спасибо за
внимание!*

