

Фенотипическое разнообразие M1 и M2 макрофагов микроокружения опухоли у пациенток с раком молочной железы: ассоциация с клинико-патологическими параметрами

А.Ю. Калининчук, Л.А. Таширева, В.М. Перельмутер

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

Резюме. *Введение.* Известно, что M1 и M2 макрофаги микроокружения при раке молочной железы (РМЖ) способны экспрессировать белок запрограммированной клеточной гибели 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) и лиганд запрограммированной клеточной гибели 1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1), что может определять исход заболевания, а также ответ опухоли на лечение, в частности иммунотерапию. Тем не менее макрофагальный состав микроокружения рака молочной железы и его взаимосвязь с различными клинико-патологическими характеристиками изучены фрагментарно. Цель исследования – выявить особенности экспрессии PD-1 и PD-L1 на M1 и M2 макрофагах у пациенток с РМЖ в зависимости от менструальной функции, размера опухоли, молекулярного подтипа, лимфогенного и гематогенного метастазирования.

Материалы и методы. В исследование были включены 19 пациенток с диагнозом «рак молочной железы». С помощью семицветной мультиплексной TSA (tyramide signal amplification)-модифицированной иммуногистохимии идентифицированы M1 макрофаги (CD68+CD163–CD3–СКАЕ1/3–) и M2 макрофаги (CD68+/-CD163+CD3–СКАЕ1/3–), а также оценена экспрессия на них PD-1 и PD-L1.

Результаты. Макрофагальный состав микроокружения РМЖ variabelен по экспрессии PD-1 и PD-L1, причем она более свойственна M1 макрофагам и не зависит от молекулярного подтипа опухоли и возникновения гематогенных метастазов. При этом у пациенток с опухолями, соответствующими по размеру T2, относительное количество макрофагов с фенотипами PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M2 было выше, чем при T1. Различия в макрофагальном составе обнаружены у пациенток в зависимости от вовлечения в процесс лимфатических узлов. В группе пациенток без лимфогенного метастазирования в опухолях практически отсутствовали M2 макрофаги с экспрессией PD-1 в отличие от группы с метастазами в лимфатических узлах.

Заключение. Для рака молочной железы показано фенотипическое разнообразие макрофагов в микроокружении опухоли, а также обнаружены межперсональные различия в макрофагальном составе новообразований. Исходно разный состав макрофагов характерен для пациенток с разным размером опухоли и разной вовлеченностью в процесс лимфатических узлов.

Ключевые слова: рак молочной железы, M1 макрофаги, M2 макрофаги, PD-L1, PD-1

Для корреспонденции: Анна Юрьевна Калининчук. E-mail: annakalinchuk2022@gmail.com

Для цитирования: Калининчук А.Ю., Таширева Л.А., Перельмутер В.М. Фенотипическое разнообразие M1 и M2 макрофагов микроокружения опухоли у пациенток с раком молочной железы: ассоциация с клинико-патологическими параметрами. Клини. экп. морфология. 2023;12(3):28–40. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.3.28-40.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 20-75-10033.

Статья поступила 15.09.2022. Получена после рецензирования 18.10.2022. Принята в печать 12.12.2022.

M1 and M2 macrophage phenotypic diversity in the tumor microenvironment in breast cancer patients: association with clinical and pathological parameters

A.Yu. Kalinchuk, L.A. Tashireva, V.M. Perelmuter

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Abstract. *Introduction.* M1 and M2 macrophages in the tumor microenvironment are known to express programmed cell death protein 1 (PD-1) and programmed cell death ligand 1 (PD-L1). It can determine disease outcomes and tumor response to treatment including immunotherapy. However, the macrophage composition

of the breast cancer microenvironment and its relation to various clinical and pathological features have been only partially studied. The aim of the study was to detect the PD-1 and PD-L1 expression features in M1 and M2 macrophages in breast cancer patients depending on menstruation, tumor size, molecular subtype, lymph node metastases, and hematogenous metastases.

Materials and methods. The study included 19 patients with breast cancer. Using seven-color multiplex TSA-modified immunohistochemistry, we identified M1 macrophages (CD68+CD163–CD3–CKAE1/3–), M2 macrophages (CD68+/-CD163+CD3–CKAE1/3–), and PD-1 and PD-L1 expression in the macrophages.

Results. The macrophage composition of the breast carcinoma microenvironment varies in PD-1 and PD-L1 expression. M1 macrophages are more characteristic to show their expression, and it does not depend on the molecular subtype and the presence of hematogenous metastases. Simultaneously, the relative number of macrophages with phenotypes PD1–PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M2 was higher in patients with tumor size corresponding to T2 compared to T1. Differences in macrophage composition were found in patients depending on the lymph node involvement. Patients without lymph node metastases had virtually no PD-1 expression in M2 macrophages in contrast to patients with them.

Conclusion. Breast cancer was shown to have phenotypic variety of macrophages in the tumor microenvironment. Moreover, macrophage composition was diverse in different individuals. Initially, a different composition of macrophages is characteristic of patients with different tumor sizes and different lymph node involvement.

Keywords: breast cancer, M1 macrophages, M2 macrophages, PD-L1, PD-1

Corresponding author: Anna Yu. Kalinchuk. E-mail: annakalinchuk2022@gmail.com

For citation: Kalinchuk A.Yu., Tashireva L.A., Perelmuter V.M. M1 and M2 macrophage phenotypic diversity in the tumor microenvironment in breast cancer patients: association with clinical and pathological parameters. *Clin. exp. morphology.* 2023;12(3):28–40 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.28-40.

Funding. This study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 20-75-10033.

Received 15.09.2022. **Received in revised form** 18.10.2022. **Accepted** 12.12.2022.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из самых распространенных злокачественных новообразований. По данным ВОЗ, в 2020 году РМЖ был диагностирован у 2,3 миллиона женщин во всем мире [1]. Терапию и прогноз РМЖ во многом определяют свойства опухоли, например молекулярный подтип, размер и степень злокачественности [2]. Тем не менее течение заболевания, в том числе вероятность прогрессии и метастазирования, будет зависеть также от клеточного состава микроокружения опухоли, который существенно влияет на поведение опухолевых клеток [3].

Микроокружение опухоли включает различные типы клеток: лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки и фибробласты [4]. Макрофаги обнаруживаются достаточно часто среди иммунных, инфильтрирующих опухоль. Макрофаги принято подразделять на две группы – классически активированные M1 и альтернативно активированные M2. M1 макрофаги секретируют провоспалительные цитокины, такие как IL-12, TNF- α , CXCL-10 и IFN- γ , а также продуцируют высокие уровни NOS, в то время как M2 макрофаги секретируют противовоспалительные цитокины – IL-10, IL-13 и IL-4 и экспрессируют аргиназу-1, маннозный рецептор (CD206) и scavenger-рецептор (CD163) [5]. CD68 считается общим макрофагальным маркером, поскольку экспрессируется и M1, и M2 макрофагами [6].

M1 макрофаги способны уничтожать опухолевые клетки посредством прямой и антителозависимой кле-

точно опосредованной цитотоксичности [7]. M2 макрофаги способствуют метастазированию опухоли, ангиогенезу и ингибируют опосредованный T-клетками противоопухолевый иммунный ответ, что приводит к прогрессированию заболевания [3]. Стоит отметить, что M1 и M2 макрофаги обладают выраженной пластичностью и могут переходить из одного состояния в другое в ответ на сигналы микроокружения или терапии [8].

Преобладание в строме опухоли M2 макрофагов считается прогностическим маркером опухолевой прогрессии. Метаанализ, объединивший 16 исследований и 4541 пациента с РМЖ, показал, что обильная инфильтрация опухоли M2 макрофагами связана с отрицательным статусом рецепторов эстрогена и прогестерона, высокой степенью злокачественности и большей вероятностью сосудистой инвазии опухоли [6].

Показано, что макрофаги микроокружения опухоли экспрессируют белок запрограммированной клеточной гибели 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) [9] и/или лиганд запрограммированной клеточной гибели 1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) [10]. Хорошо известен результат взаимодействия PD-1 T-клетки и PD-L1 опухолевой клетки. PD-1/PD-L1 представляет собой важную иммунную контрольную точку, приводящую к анергии T-клеток. Кроме того, PD-L1 может защищать опухолевые клетки от опосредованного цитотоксическими T-лимфоцитами цитолиза без передачи сигналов PD-1 в T-клетках [11]. При этом роль PD-1/PD-L1 в макрофагах имеет определенные

особенности. Например, предполагается взаимосвязь между PD-1/PD-L1 и поляризацией макрофагов, что приводит к изменению секреции цитокинов и экспрессии поверхностных маркеров в макрофагах [12]. Многие аспекты роли PD-1 и PD-L1, экспрессирующихся на макрофагах, также требуют уточнения для лучшего понимания механизмов действия и причин неэффективности иммунотерапии ингибиторами иммунных контрольных точек.

Таким образом, целью данного исследования стало изучение особенностей макрофагального состава микроокружения опухоли и определение его взаимосвязи с клинико-патологическими характеристиками пациенток с раком молочной железы.

Материалы и методы

В исследование были включены 19 пациенток с гистологически верифицированным диагнозом «инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа» (T1–3N0–1M0, возраст от 43 до 78 лет), проходивших лечение на базе НИИ онкологии Томского НИМЦ. Пациентки получали терапию в соответствии с клиническими рекомендациями.

Клинико-патологические характеристики пациенток представлены в таблице 1.

В работе использованы данные мультиплексной TSA (tyramide signal amplification)-модифицированной иммуногистохимии (ИГХ) срезов тканей (рис. 1). Срезы были получены из фиксированной формалином и залитой парафином ткани первичной опухоли молочной железы. Депарафинизацию, демаскировку и окрашивание ткани проводили автоматически с применением иммунопейнера BOND RXm (Leica Biosystems, Германия). TSA-модифицированная ИГХ в отличие от обычной дает возможность исследовать в ткани одновременно экспрессию нескольких белков. Для исследования была составлена панель маркеров: PD-1, CD68, PD-L1, CD3, CD163 и CKAЕ1/3. Окрашивание каждого среза включало шесть циклов. Каждый цикл состоял из следующих этапов: присоединение первичного антитела к эпитопу ткани, добавление вторичных антител с HRP (horseradish peroxidase) и флуоресцентной метки с тирамидом, активация тирамидов, конъюгация метки с тирозиновыми остатками вблизи эпитопа и удаление комплекса антител. Для окрашивания использовали набор Opal 7-color Automation IHC Kit (Akoya Bioscience, США).

Таблица 1 | Table 1

Клинико-патологические характеристики пациенток | Clinical and pathological characteristics of the patients

Параметры Parameters		Частота, n (%) Frequency, n (%)
Возраст, лет Age, years	<50	5/19 (26,3%)
	>50	14/19 (73,7%)
Менструальная функция Menstruation	менопауза menopause	14/19 (73,7%)
	сохранена yes	5/19 (26,3%)
Неoadъювантная химиотерапия Neoadjuvant chemotherapy	нет no	17/19 (89,5%)
	нет данных no data	2/19 (10,5%)
Молекулярный подтип Molecular subtype	люминальный А luminal A	6/19 (31,6%)
	люминальный В (HER2-) luminal B (HER2-)	9/19 (47,4%)
	трижды негативный triple-negative	4/19 (21,0%)
Категория Т (размер первичной опухоли) T category (primary tumor size)	1	8/19 (42,1%)
	2	9/19 (47,3%)
	3	1/19 (5,3%)
	нет данных no data	1/19 (5,3%)
Лимфогенные метастазы Lymph node metastases	нет no	12/19 (63,1%)
	есть yes	6/19 (31,6%)
	нет данных no data	1/19 (5,3%)
Гематогенные метастазы Hematogenous metastases	нет no	14/19 (73,7%)
	есть yes	4/19 (21,0%)
	нет данных no data	1/19 (5,3%)

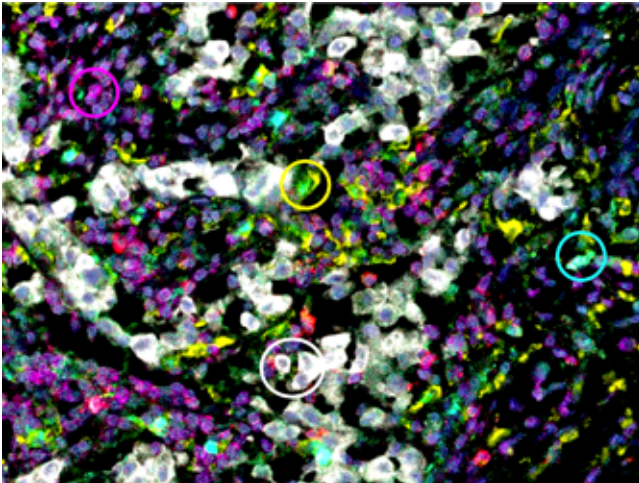


Рис. 1. M1 и M2 макрофаги, а также экспрессия ими PD-L1 и PD-1 в микроокружении опухоли молочной железы. TSA-модифицированная ИГХ, $\times 400$. PD-1 – красный, CD68 – голубой, PD-L1 – зеленый, CD3 – пурпурный, CD163 – желтый, СК AE1/AE3 – белый, DAPI – синий. Пурпурный круг – CD3+ лимфоциты, желтый круг – PD1-PDL1+ M2 макрофаг, белый круг – опухолевые клетки, голубой круг – PD1-PDL1- M1 макрофаг

Fig. 1. M1 and M2 macrophages expressing PD-L1 and PD-1 in the tumor microenvironment in breast carcinoma. TSA-modified IHC, $\times 400$. PD-1 – red, CD68 – cyan, PD-L1 – green, CD3 – purple, CD163 – yellow, СК AE1/AE3 – white, DAPI – blue. Purple circle: CD3+ lymphocytes, yellow circle: PD1-PDL1+ M2 macrophage, white circle: tumor cells, cyan circle: PD1-PDL1- M1 macrophage

Первичные антитела включали anti-PD-1 (Cell Marque, США, клон NAT105, 1:100), anti-CD68 (Agilent Dako, США, клон KP1, 1:5), anti-PD-L1 (Ventana, США, клон SP142, 1:50), anti-CD3 (Agilent Dako, США, поликлональные, 1:5), anti-CD163 (Diagnostic Biosystems, США, клон 10D6, 1:100), anti-CKAE1/3 (Agilent Dako, США, клон AE1/AE3, 1:20). Визуализация в ткани PD-1 осуществлялась с помощью Opal520 (1:150), CD68 – Opal540 (1:150), PD-L1 – Opal570 (1:150), CD3 – Opal620 (1:150), CD163 – Opal650 (1:150), CKAE1/3 – Opal690 (1:150). Для окрашивания ядер применяли ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., США). Окрашенные срезы сканировали и анализировали репрезентативные области, содержащие участки опухоли и стромы, с использованием системы мультиплексного анализа ткани Vectra 3.0.3 (PerkinElmer, США). Анализ полученных изображений проводили с использованием программы inForm 2.4.2. Для каждого комплекса маркер-Opal были созданы спектральные библиотеки, затем проведено исключение аутофлуоресценции изображений с помощью неокрашенной контрольной ткани опухоли молочной железы. Фенотип M1 макрофагов определялся как CD68+CD163-CD3-CKAE1/3-, M2 макрофагов – как CD68+/-CD163+CD3-CKAE1/3-, лимфоцитов – как CD68-CD163-CD3+CKAE1/3-, опухолевых

клеток – как CD68-CD163-CD3-CKAE1/3+. На макрофагах была оценена экспрессия PD-1 и PD-L1 и выделено восемь фенотипов: PD1-PDL1- M1, PD1+PDL1- M1, PD1-PDL1+ M1, PD1+PDL1+ M1, PD1-PDL1- M2, PD1+PDL1- M2, PD1-PDL1+ M2, PD1+PDL1+ M2.

В 4–5 полях зрения подсчитывали абсолютное количество макрофагов каждого из изучаемых фенотипов, а также лимфоцитов, располагающихся в строме и среди опухолевых клеток. Относительные количества макрофагов и лимфоцитов подсчитаны как проценты от суммы всех клеток стромы. Относительные количества M1 и M2 макрофагов приведены в виде процентов от суммы всех макрофагов стромы. Для оценки макрофагальной формулы микроокружения каждый из фенотипов макрофагов был представлен как процент от суммы M1 или M2 макрофагов.

Статистическая обработка проведена в программах Statistica 12 (StatSoft, США) и Prism 8.0.1. (GraphPad, США). Все количественные данные были представлены в виде Me (Q₁; Q₃), поскольку не подчинялись нормальному закону распределения. Для сравнения двух или трех независимых групп применялись непараметрические критерии Манна-Уитни или Краскела-Уоллиса, соответственно. При сравнении двух зависимых групп использовался непараметрический критерий Уилкоксона. Сравнение двух или трех групп по качественному признаку было проведено с помощью критерия хи-квадрат. Результаты представлены в виде n/N (%). При проведении корреляционного анализа применен непараметрический критерий Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Исследование одобрено комиссией по биоэтике НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук (протокол № 7 от 25.08.2020). Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты

Как M1, так и M2 макрофаги были обнаружены в карциномах 100% включенных в исследование пациенток (19/19). Относительное количество макрофагов в микроокружении опухоли от общего количества неопухолевых элементов составило 12,1% (8,5; 15,7). Более половины макрофагов имело фенотип M2 – 66,6% (63,4; 86,5), а доля M1 составила 33,4% (13,5; 36,6) ($p < 0,0001$).

PD1-PDL1- M1 и M2 макрофаги присутствовали в микроокружении опухоли у 100% пациенток. PD1+PDL1- M1 макрофаги обнаруживались чаще, чем PD1+PDL1- M2 макрофаги. PD1-PDL1+ M1 и M2, а также PD1+PDL1+ M1 и M2 фенотипы присутствовали у большинства пациенток, причем их частота встречаемости не различалась (табл. 2).

Большинство M2 макрофагов микроокружения при РМЖ не имеет экспрессии PD-1 и PD-L1 в отличие от M1. Согласно составленной макрофагальной

Таблица 2 | Table 2

Макрофагальная формула микроокружения при РМЖ [N=19, частоты встречаемости представлены в n/N (%)] |
 Macrophage formula of the microenvironment in breast cancer [N=19, frequencies, n/N (%)]

	PD1-PDL1-	PD1+PDL1-	PD1-PDL1+	PD1+PDL1+
M1	19/19 (100%)	16/19 (84,2%)	17/19 (89,5%)	15/19 (78,9%)
M2	19/19 (100%)	5/19 (26,3%)	19/19 (100%)	10/19 (52,6%)
p	1,000	0,001	0,487	0,170

Таблица 3 | Table 3

Макрофагальная формула микроокружения при РМЖ (N=19, доли представлены в % от M1, % от M2) |
 Macrophage formula of the microenvironment in breast cancer (N=19, proportions, % of M1, % of M2)

	PD1-PDL1-	PD1+PDL1-	PD1-PDL1+	PD1+PDL1+
M1	51,9 (36,6; 66,4)	4,8 (1,4; 18,2)	27,0 (15,8; 40,6)	5,4 (1,4; 14,6)
M2	80,2 (72,8; 86,8)	0,0 (0,0; 0,2)	18,6 (12,9; 27,2)	0,4 (0,0; 0,5)
p	<0,0001	<0,0001	0,049	<0,0001

формуле, для M1 макрофагов более характерна экспрессия PD-1 или/и PD-L1 (табл. 3).

Анализ связи между относительными количествами M1 макрофагов и M2 макрофагов с учетом экспрессии ими PD-1 или/и PD-L1 показал прямую связь количества PD1-PDL1- M1 и PD1-PDL1- M2 ($r=0,79$; $p=0,000$), PD1-PDL1+ M1 и PD1-PDL1+ M2 ($r=0,57$; $p=0,011$), а также PD1+PDL1+ M1 и PD1-PDL1+ M2 ($r=0,64$; $p=0,003$). Обратная связь была показана для количества PD1-PDL1- M1 и PD1-PDL1+ M2 ($r=-0,75$; $p=0,000$), PD1-PDL1- M1 и PD1+PDL1+ M2 ($r=-0,50$; $p=0,030$), PD1-PDL1+ M1 и PD1-PDL1- M2 ($r=-0,50$; $p=0,029$), PD1+PDL1+ M1 и PD1-PDL1- M2 ($r=-0,68$; $p=0,001$) (рис. 2). Сильная взаимосвязь наблюдалась между двумя парами фенотипов: PD1-PDL1- M1 и PD1-PDL1- M2, PD1-PDL1- M1 и PD1-PDL1+ M2. Примечательно, что прямую вза-

имосвязь имели только те фенотипы M1 и M2 макрофагов, которые экспрессировали PD-L1 независимо от экспрессии PD-1. Исключение составляла положительная связь между M1 и M2 макрофагами, не экспрессирующими ни PD-1, ни PD-L1. Перекрестная отрицательная связь наблюдалась между не экспрессирующими PD-1 и PD-L1 M1 и экспрессирующими PD-L1 M2, а также между не экспрессирующими PD-1 и PD-L1 M2 и экспрессирующими PD-L1 M1. Отрицательная связь также не зависела от экспрессии PD-1.

Были оценены частота встречаемости (рис. 3) и доля макрофагов с различным сочетанием экспрессии PD-1 и PD-L1 в зависимости от разных клинико-патологических параметров.

У пациенток с размером опухоли до 2 см (T1) PD1+PDL1- M2 макрофаги не обнаруживались, однако

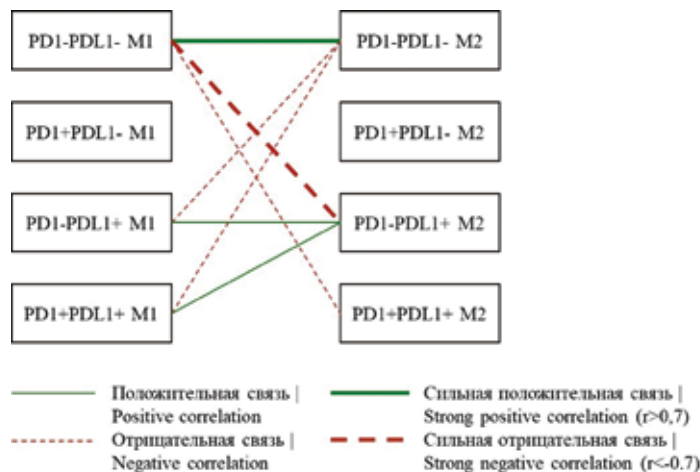


Рис. 2. Взаимосвязи между относительными количествами M1 и M2 макрофагов различных фенотипов

Fig. 2. Association between the number of M1 and M2 macrophages of different phenotypes

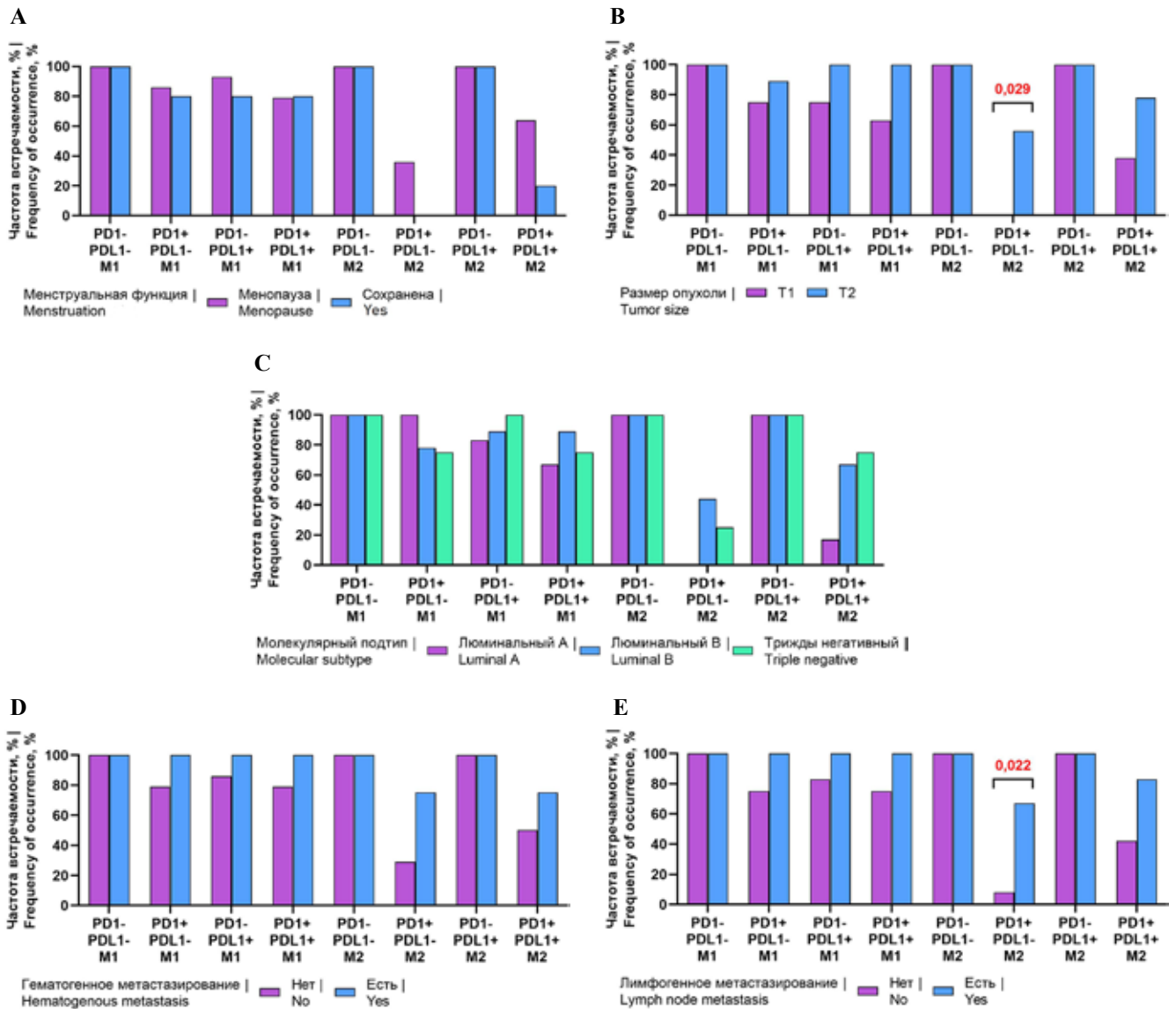


Рис. 3. Частота встречаемости макрофагов в опухоли в зависимости от менструальной функции (А), размера новообразования (В), молекулярного подтипа (С), наличия лимфогенных метастазов (D), наличия гематогенных метастазов (Е)

Fig. 3. Frequency of occurrence of macrophages in the tumor depending on: menstruation (A), tumor size (B), molecular subtype (C), lymph node metastases (D), hematogenous metastases (E)

они присутствовали у 55,6% пациенток с размером опухоли от 2 до 5 см (T2) ($p=0,029$). Этот же фенотип макрофагов встречался чаще у пациенток с метастазами в лимфатические узлы (66,7%) по сравнению с пациентками без лимфогенных метастазов (8,3%) ($p=0,022$). Частота встречаемости остальных фенотипов не была ассоциирована ни с одним из рассмотренных клинико-патологических параметров (рис. 3).

Состояние менструальной функции не было связано с количеством макрофагов в целом и каждого из их типов (рис. 4).

У пациенток с опухолями, соответствующими по размеру значению параметра T2, относительное количество макрофагов с фенотипом PD1-PDL1+ M1 было выше, чем при T1 (38,8% (23,0; 43,4) и 16,8% (7,9; 31,3), соответ-

ственно, $p=0,046$). Также наблюдалось различие в долях макрофагов типа PD1+PDL1+ M2 – 0,0% (0,0; 0,4) и 0,5% (0,4; 0,9) при T1 и T2, соответственно ($p=0,046$) (рис. 5).

Доли макрофагов среди клеток стромы были наименьшими при люминальном В подтипе ($p=0,026$, $p=0,034$) и не различались ($p=0,914$) при люминальном А и трижды негативном (8,5% (7,4; 8,8), 14,7% (12,1; 24,4) и 14,2% (11,3; 19,8), соответственно). Относительное количество M1 и M2 макрофагов не различалось в разных молекулярных подтипах опухолей. Аналогично доли макрофагов, экспрессирующих PD-1 и/или PD-L1, не имели различий в зависимости от молекулярного подтипа опухоли (рис. 6).

У пациенток с метастазами в лимфатических узлах M2 макрофагов с экспрессией PD-1 было больше,

чем у пациенток без лимфогенного метастазирования. В частности, относительное количество PD1+PDL1– M2 макрофагов в данных группах пациенток составляло 0,3% (0,0; 0,9) и 0,0% (0,0; 0,0), соответственно ($p=0,032$), а количество PD1+PDL1+ M2 макрофа-

гов – 0,7% (0,5; 1,1) и 0,0% (0,0; 0,4), соответственно ($p=0,014$) (рис. 7).

Гематогенное метастазирование также было связано с различиями в количестве макрофагов микроокружения опухоли (рис. 8) У пациенток с возникшими

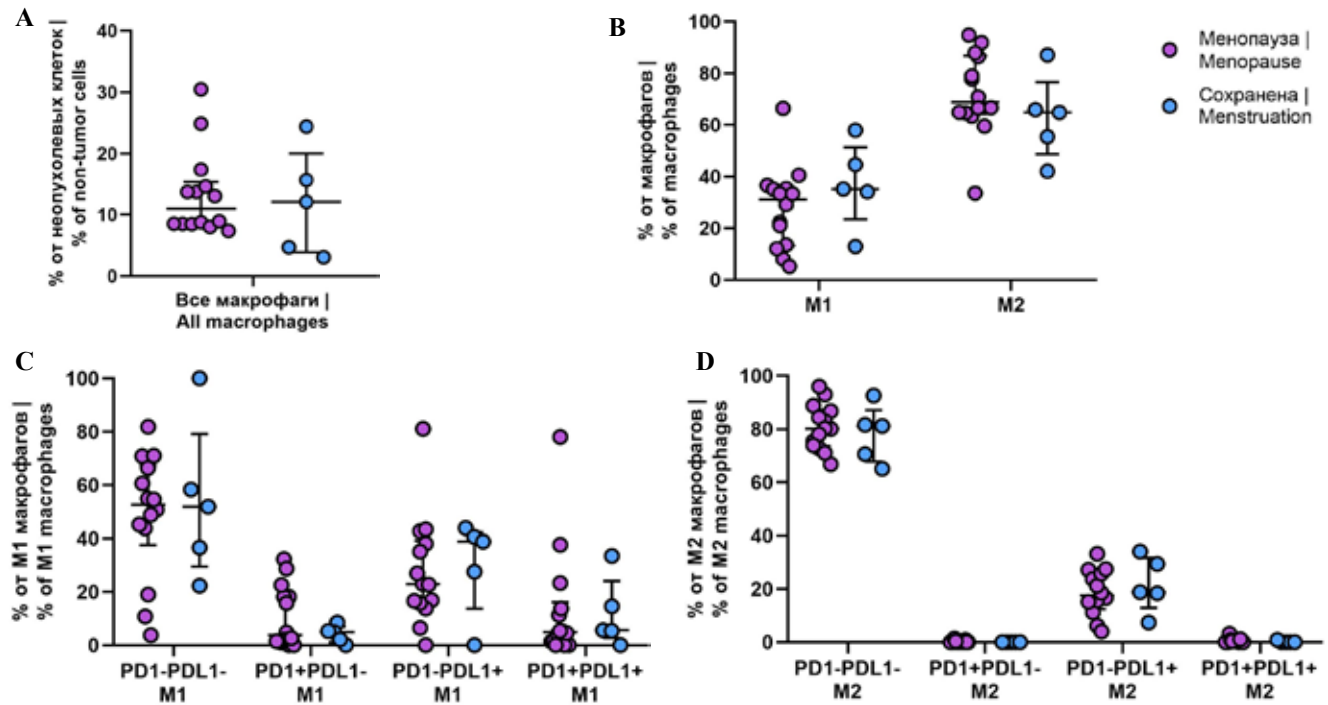


Рис. 4. Доля макрофагов в зависимости от менструальной функции.

А – процентное распределение макрофагов по отношению ко всем неопухолевым клеткам, В – процентное распределение M1 и M2 макрофагов по отношению ко всем макрофагам в опухоли, С – процентное распределение PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 макрофагов по отношению ко всем M1 макрофагам в опухоли, D – процентное распределение PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофагов по отношению ко всем M2 макрофагам в опухоли

Fig. 4. Proportion of macrophages depending on menstruation.

А – percentage distribution of macrophages to all non-tumor cells, В – percentage distribution of M1 and M2 macrophages to all macrophages in the tumor, С – percentage distribution of PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M1 macrophages to all M1 macrophages in the tumor, D – percentage distribution of PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 and PD1+PDL1+ M2 macrophages to all M2 macrophages in the tumor

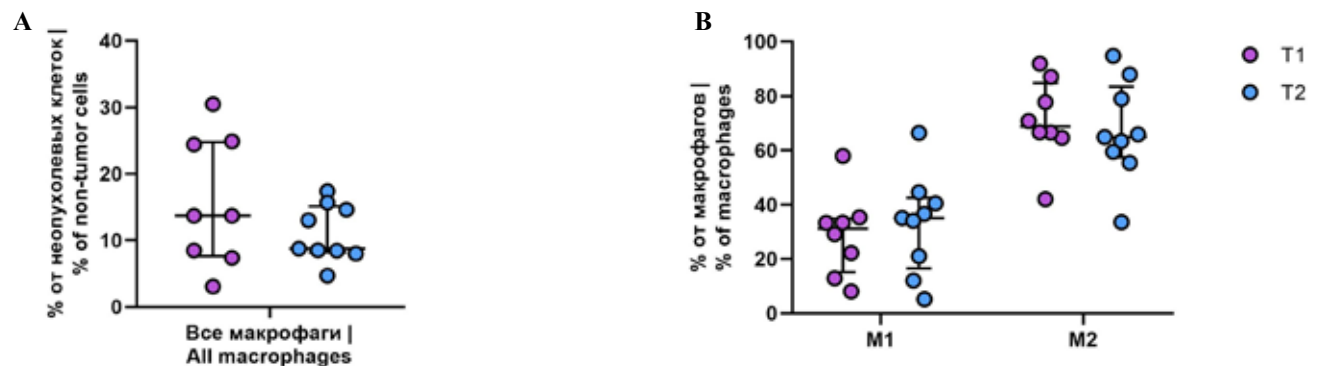


Рис. 5. Доля макрофагов в зависимости от размера опухоли (значения параметра Т).

А – процентное распределение макрофагов по отношению ко всем неопухолевым клеткам, В – процентное распределение M1 и M2 макрофагов по отношению ко всем макрофагам в опухоли

Fig. 5. Proportion of macrophages depending on tumor size (value of the parameter T).

А – percentage distribution of macrophages to all non-tumor cells, В – percentage distribution of M1 and M2 macrophages to all macrophages in the tumor

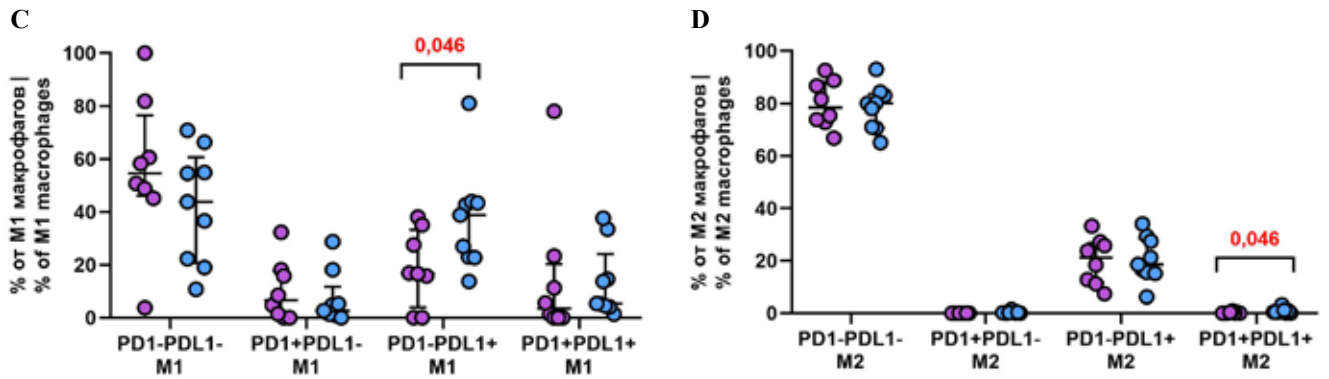


Рис. 5 (окончание). Доля макрофагов в зависимости от размера опухоли (значения параметра T).

С – процентное распределение PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 макрофагов по отношению ко всем M1 макрофагам в опухоли, D – процентное распределение PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофагов по отношению ко всем M2 макрофагам в опухоли

Fig. 5 (end). Proportion of macrophages depending on tumor size (value of the parameter T).

С – percentage distribution of PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M1 macrophages to all M1 macrophages in the tumor, D – percentage distribution of PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 and PD1+PDL1+ M2 macrophages to all M2 macrophages in the tumor

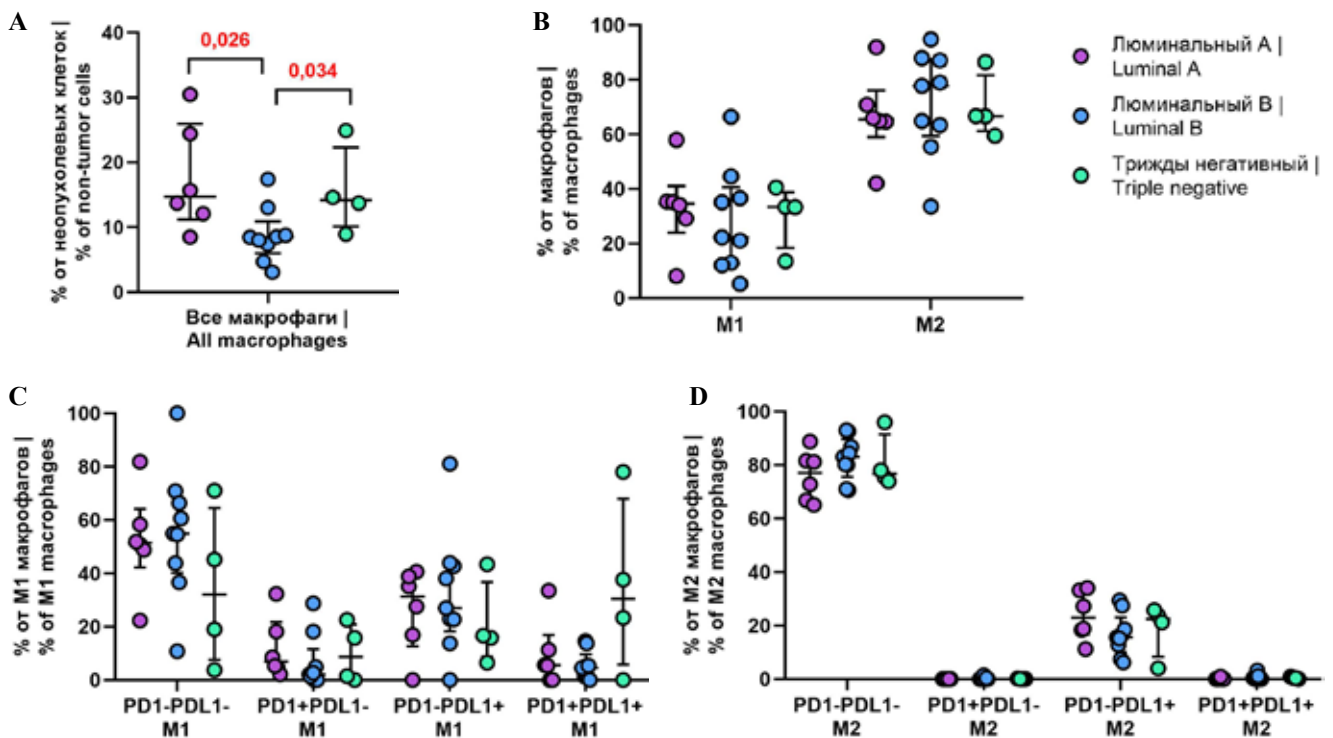


Рис. 6. Доля макрофагов в зависимости от молекулярного подтипа опухоли.

А – процентное распределение макрофагов по отношению ко всем неопухолевым клеткам, В – процентное распределение M1 и M2 макрофагов по отношению ко всем макрофагам в опухоли, С – процентное распределение PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 макрофагов по отношению ко всем M1 макрофагам в опухоли, D – процентное распределение PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофагов по отношению ко всем M2 макрофагам в опухоли

Fig. 6. Proportion of macrophages depending on tumor molecular subtype.

А – percentage distribution of macrophages to all non-tumor cells, В – percentage distribution of M1 and M2 macrophages to all macrophages in the tumor, С – percentage distribution of PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M1 macrophages to all M1 macrophages in the tumor, D – percentage distribution of PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 and PD1+PDL1+ M2 macrophages to all M2 macrophages in the tumor

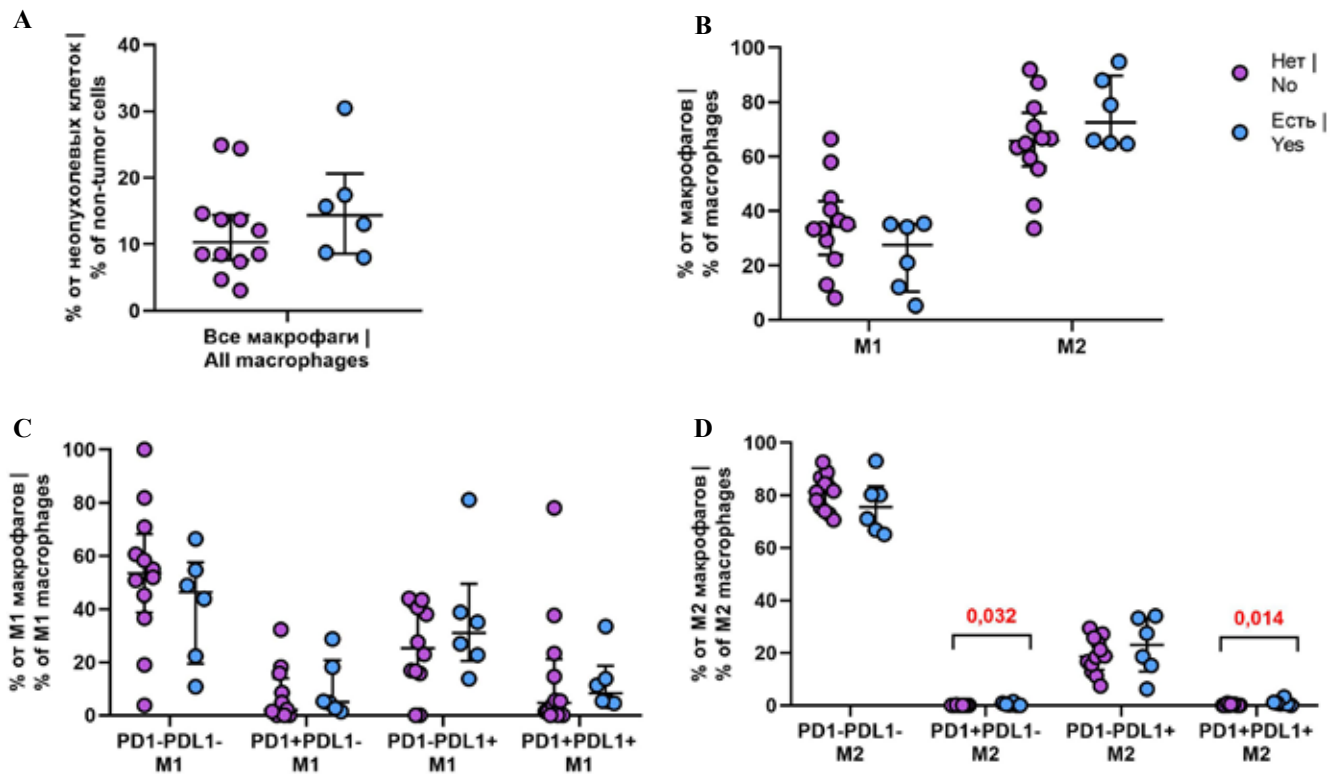


Рис. 7. Доля макрофагов в зависимости от наличия лимфогенных метастазов.

А – процентное распределение макрофагов по отношению ко всем неопухолевым клеткам, В – процентное распределение M1 и M2 макрофагов по отношению ко всем макрофагам в опухоли, С – процентное распределение PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 макрофагов по отношению ко всем M1 макрофагам в опухоли, D – процентное распределение PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофагов по отношению ко всем M2 макрофагам в опухоли

Fig. 7. Proportion of macrophages depending on the presence of lymph node metastases.

А – percentage distribution of macrophages to all non-tumor cells, В – percentage distribution of M1 and M2 macrophages to all macrophages in the tumor, С – percentage distribution of PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M1 macrophages to all M1 macrophages in the tumor, D – percentage distribution of PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 and PD1+PDL1+ M2 macrophages to all M2 macrophages in the tumor

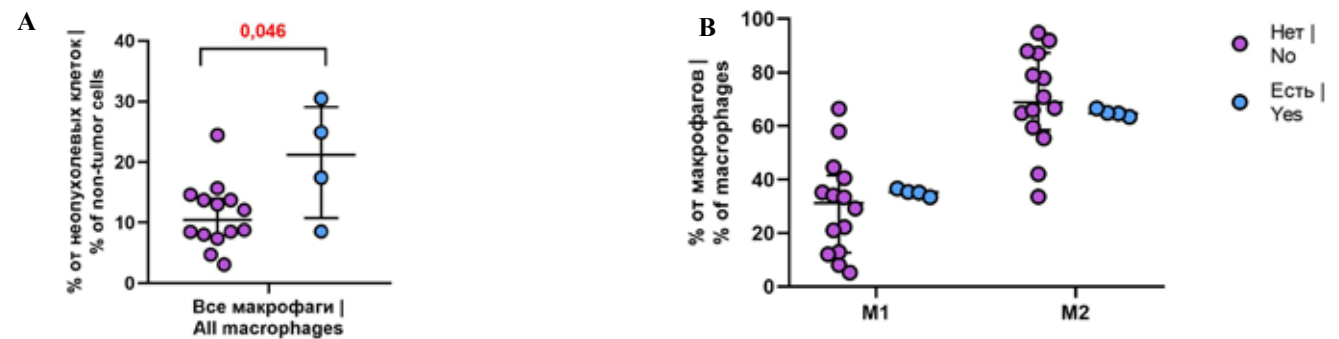


Рис. 8. Доля макрофагов в зависимости от наличия гематогенных метастазов.

А – процентное распределение макрофагов по отношению ко всем неопухолевым клеткам, В – процентное распределение M1 и M2 макрофагов по отношению ко всем макрофагам в опухоли

Fig. 8. Proportion of macrophages depending on the presence of hematogenous metastases.

А – percentage distribution of macrophages to all non-tumor cells, В – percentage distribution of M1 and M2 macrophages to all macrophages in the tumor

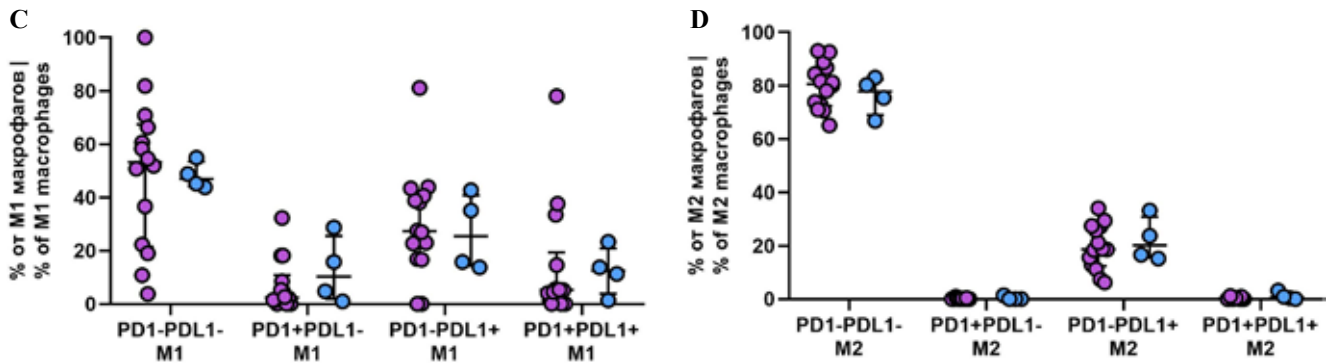


Рис. 8 (окончание). Доля макрофагов в зависимости от наличия гематогенных метастазов.

С – процентное распределение PD1-PDL1- M1, PD1+PDL1- M1, PD1-PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 макрофагов по отношению ко всем M1 макрофагам в опухоли, D – процентное распределение PD1-PDL1- M2, PD1+PDL1- M2, PD1-PDL1+ M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофагов по отношению ко всем M2 макрофагам в опухоли

Fig. 8 (end). Proportion of macrophages depending on the presence of hematogenous metastases.

С – percentage distribution of PD1-PDL1- M1, PD1+PDL1- M1, PD1-PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M1 macrophages to all M1 macrophages in the tumor, D – percentage distribution of PD1-PDL1- M2, PD1+PDL1- M2, PD1-PDL1+ M2 and PD1+PDL1+ M2 macrophages to all M2 macrophages in the tumor

впоследствии отдаленными метастазами процент макрофагов микроокружения от общего числа неопухолевых клеток составил 21,1% (13,0; 27,7), что выше, чем у пациенток без метастазов, – 10,4% (8,0; 13,7) ($p=0,046$).

Тем не менее подобная связь терялась, когда учитывались подтип макрофагов и экспрессия ими PD-1 или/и PD-L1 (рис. 8).

Обсуждение

Показанием к иммунотерапии трижды негативно-го РМЖ ингибиторами иммунных контрольных точек служит наличие в строме опухоли более 1% клеток, экспрессирующих PD-L1 [13]. Механизм полезного эффекта иммунотерапии в таких случаях до конца не понятен. Судя по показателю, определяющему вероятность положительного эффекта иммунотерапии, он может быть обусловлен изменением функционального состояния иммуноцитов, которое происходит при взаимодействии антител с PD-L1 на клетках, формирующих иммуновоспалительное микроокружение в опухоли [14]. В связи с этим особое значение имеет понимание характера зависимости активности лимфоцитов, макрофагов и других иммуноцитов от экспрессии на них PD-L1 или PD-1. Прежде всего это касается способности секретировать цитокины и проявлять пластические свойства, трансформируясь в разные функциональные типы клеток.

Макрофаги являются одними из ключевых клеток иммунных реакций в микроокружении как РМЖ, так и опухолей других локализаций, например рака почки, колоректального рака, рака предстательной железы [15], рака яичника [16]. По этой причине столь важно понимание механизмов активации и ингибирования макрофагов. Влияние экспрессии PD-1 и PD-L1 на макрофагах на течение про- и противоопухолевых иммунных реакций микроокружения изучено неполностью. Считается, что связывание PD-L1, экспрессируемого

на макрофагах, с PD-1 на Т-клетках противодействует костимулирующему и антигенпрезентирующему эффекту макрофагов на Т-клетки, что приводит к анергии Т-клеток и ускользанию опухолевых клеток от иммунного ответа [17]. Тем не менее имеются данные о том, что в отличие от PD-L1, экспрессируемого на опухолевых клетках, который подавляет активность CD4+ лимфоцитов, PD-L1+ макрофаги не вызывают такого эффекта. При взаимодействии PD-L1+ макрофагов с PD-1+ Т-лимфоцитами не происходит разрушения макрофагов [18].

Предположительно индукторами экспрессии PD-1 у макрофагов являются цитокины Т-клеток, в частности IFN- γ , а также DAMP, связывающиеся с TLR макрофагов [12]. Экспрессия PD-L1 увеличивается в M1 макрофагах при индуцировании с помощью CSF2, LPS или IFN- γ [17], в то время как IL-4, IL-6, IL-10 и IL-13 могут повышать экспрессию CD163, CD204 и PD-L1 на незрелых макрофагах [19].

PD-L1-сигнальный путь регулирует активность и пролиферативную способность макрофагов. S. Singhal et al. показали, что взаимодействие PD-L1 макрофага и PD-1 Т-клетки защищает макрофаг от разрушения Т-клеткой [18]. Обработка антителами против PD-L1 приводила к увеличению пролиферативной активности и выживаемости PD-L1+ макрофагов, а также повышению экспрессии костимулирующих молекул и цитокинов [17, 20]. Антитела против PD-L1 оказывали на макрофаги действие, сходное с эффектами растворимой молекулы CD80 (sCD80) или растворимого PD-1 (sPD-1). CD80 является альтернативным лигандом для PD-L1, причем CD80 оказывал более сильное влияние на макрофаги, чем PD-1 [20].

Экспрессия PD-L1 или PD-1 препятствует противоопухолевому действию макрофагов, функция которых может восстанавливаться после блокады PD-L1/PD-1. Макрофаги с высокой экспрессией PD-L1 или PD-1 рас-

считают как функционально истощенные [17]. Согласно полученной в проведенном нами исследовании макрофагальной формуле микроокружения РМЖ, доля макрофагов, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, выше среди M1 макрофагов по сравнению с M2 макрофагами. Учитывая это, следует считать, что M2 макрофаги более склонны к осуществлению различных молекулярных взаимодействий с опухолевыми клетками, чем M1 макрофаги. Существуют исследования, в ходе которых были получены сходные данные, однако на уровне экспрессии генов. Так, результаты сравнения транскрипционных различий макрофагов M1 (индуцированных CSF2 или LPS/IFN- γ) и M2 (индуцированных CSF1 или IL-4), по данным Gene Expression Omnibus (GSE95404, 71253, 66805, 95405, 69607), показали, что экспрессия PD-L1 значительно выше в M1 макрофагах, чем в M2 макрофагах [17]. J.P. Antonios et al. показали, что экспрессия PD-L1 также значительно выше в клетках CD163-, чем в клетках CD163+ [21].

Вместе с тем имеются результаты, демонстрирующие, что подавление экспрессии PD-L1 в макрофагах приводило к снижению экспрессии IL-10 и аргиназы-1 и увеличению экспрессии IL-12 и TNF- α у M2 макрофагов [22, 23]. С одной стороны, этот результат свидетельствует о том, что активная экспрессия PD-L1 на макрофагах сочетается с их M2 поляризацией и не препятствует высокому уровню экспрессии IL-10, а с другой – подавление экспрессии PD-L1 вызывает трансформацию M2 макрофагов в M1. Однако прямое влияние PD-L1 на поляризацию макрофагов неясно.

Проведенный анализ ассоциаций позволяет обсуждать характер функциональных взаимоотношений между M1 и M2 макрофагами. Положительная связь между M1 и M2, не экспрессирующими PD-1 и PD-L1, а также экспрессирующих PD-L1 может свидетельствовать о возможности одновременного, но это не значит что одинакового по количеству накопления в микроокружении опухоли антагонистических по функции макрофагов. Резльтирующий антагонизм M1 и M2 макрофагов подчеркивается отрицательными связями. В соответствии с этими ассоциациями увеличение в микроокружении PD-L1+ M2 должно сочетаться с уменьшением количества M1, а увеличение PD-L1+ M1 – с уменьшением числа M2 макрофагов. Эти эффекты достигаются, по-видимому, благодаря тому, что экспрессия PD-L1 не препятствует секреции макрофагами специфических для каждого типа цитокинов.

PD1+PDL1- M1 макрофаги микроокружения РМЖ обнаруживаются у большинства пациенток, а PD1+PDL1- M2 только у четверти, согласно полученным нами данным. Экспрессия PD-1 в макрофагах играет супрессорную роль, ингибируя фагоцитоз и противоопухолевую активность, и может быть связана с поляризацией в M2 фенотип. Эти эффекты могут быть подавлены антителами против PD-1/PD-L1 [9]. Кроме того, PD-1 может также влиять на секрецию цитокинов макрофагами. По данным С.Д. Ма

et al., экспрессия PD-1 отрицательно коррелировала с экспрессией IL-12 в моноцитах крови [24], а активация PD-1 рекомбинантным PD-L1 снижала выработку IL-6 макрофагами [25]. Анти-PD-1 терапия индуцирует в макрофагах поляризацию M1 и оказывает противоопухолевый эффект в отсутствие CD8+ Т-клеток [26].

Нами рассмотрена связь количества макрофагов, учитывая экспрессию PD-1 и/или PD-L1, и параметров, характеризующих течение РМЖ. Показано, что макрофагальный состав микроокружения не различался в зависимости от молекулярного подтипа. При этом наименьшее общее количество макрофагов все же было характерно для люминального В подтипа. Для пациенток с размером опухоли от 2 до 5 см и метастатическим поражением лимфатических узлов было характерно повышение количества макрофагов с экспрессией PD-1 и/или PD-L1 в строме опухоли. У пациенток с размером опухоли от 2 до 5 см относительное количество PD1 PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M2 выше, чем у пациенток с размером опухоли до 2 см. Известно, что высокая экспрессия Ki67 связана с более агрессивным ростом опухоли, более выраженной степенью инфильтрации опухолевого микроокружения макрофагами и более высоким риском развития рецидива заболевания [27]. При этом сообщалось, что экспрессия PD-L1 или PD-1 тормозит противоопухолевое действие макрофагов [17]. Все это согласуется с полученными нами данными.

При лимфогенном метастазировании в строме опухоли появляются PD1+PDL1- M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофаги, в то время как у пациенток без лимфогенных метастазов эти клетки в строме практически отсутствуют. На основании этих данных можно предположить, что лимфогенное метастазирование ассоциировано с PD-1+ M2 макрофагами, у которых, вероятно, ингибирована секреция цитокинов. Для M2 макрофагов характерна секреция TGF β 1 [28], который способен переключать подвижность опухолевых клеток с коллективной на индивидуальную посредством программы транскрипции, включающей *Smad4*, *EGFR*, *Nedd9*, *M-RIP*, *FARP* и *RhoC*. Блокада передачи сигналов TGF β предотвращает индивидуальную миграцию клеток *in vivo*, но не подавляет коллективную миграцию. Клетки, ограниченные коллективной миграцией, способны к лимфатической инвазии, но не к гематогенному распространению [29]. По нашим данным, PD-1+ M2 макрофаги ассоциированы с лимфогенным метастазированием, а для гематогенного метастазирования имеет значение не столько тип макрофагов, сколько их общее количество. Это подчеркивает различный вклад микроокружения в эти два вида опухолевой прогрессии. Практическая значимость проведенного исследования заключается в обнаружении фенотипов макрофагов, которые ассоциированы с неблагоприятным течением заболевания и могут в дальнейшем использоваться в качестве прогностических маркеров.

Заключение

M1 и M2 макрофаги обладают выраженной гетерогенностью по экспрессии PD-1 и PD-L1. M2 представлены в опухоли в большем количестве. При этом доля M2, несущих рецептор и лиганд программированной клеточной гибели, меньше, что говорит о том, что вероятность их блокирования меньше, а значит, больше вероятность функционально активного состояния. Только два фенотипа макрофагов – PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M2 – в нашем исследовании были ассоциированы с увеличением размера опухоли, и также два фенотипа – PD1+PDL1– M2 и PD1+PDL1+ M2 – были связаны с лимфогенным метастазированием. Если в качестве предсказательного фактора эффективности ингибиторов иммунных контрольных точек оцениваются функциональные характеристики макрофагов, следует оценивать долю M2 макрофагов, экспрессирующих PD-1, увеличение которой является неблагоприятным фактором относительно лимфогенного метастазирования. Также необходимо иметь в виду, что экспрессия PD-L1 на M1 является фактором, подавляющим их активность, что в нашем исследовании ассоциировано с большей величиной первичной опухоли. Можно ожидать, учитывая полученные результаты, что применение ингибиторов иммунных контрольных точек при описанном исходном состоянии макрофагально-го звена может привести к активации макрофагов M1 типа. Относительно M2 макрофагов этот эффект будет менее заметен, что может служить ожиданию хорошего общего эффекта. Тем не менее следует иметь в виду, что на функции M2 макрофагов, экспрессирующих PD-1, количество которых связано с лимфогенным метастазированием, подобная терапия влиять не будет.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.А. Таширева, А.Ю. Калинчук.
Сбор и обработка материала – А.Ю. Калинчук, Л.А. Таширева.
Написание текста – А.Ю. Калинчук, В.М. Перельмутер.
Редактирование – В.М. Перельмутер, Л.А. Таширева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.A. Tashireva, A.Yu. Kalinchuk.
Collected the data and performed the analysis – A.Yu. Kalinchuk, L.A. Tashireva.
Wrote the paper – A.Yu. Kalinchuk, V.M. Perelmuter.
Edited the manuscript – V.M. Perelmuter, L.A. Tashireva.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

- World Health Organization. Fact sheets. Breast cancer. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (accessed 05.09.2022).
- Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):412–24. DOI: 10.5306/wjco.v5.i3.412.
- Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Front Immunol*. 2020;11:583084. DOI: 10.3389/fimmu.2020.583084.
- Li JJ, Tsang JY, Tse GM. Tumor microenvironment in breast cancer – Updates on therapeutic implications and pathologic assessment. *Cancers (Basel)*. 2021;13(16):4233. DOI: 10.3390/cancers13164233.
- Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):76. DOI: 10.1186/s13045-019-0760-3.
- Zhao X, Qu J, Sun Y, Wang J, Liu X, Wang F et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: A meta-analysis of the literature. *Oncotarget*. 2017;8(18):30576–86. DOI: 10.18632/oncotarget.15736.
- Ковалева О.В., Подлесная П.А., Грачев А.Н. Цитотоксическая активность макрофагов и ее роль в патогенезе опухолей. Альманах клинической медицины. 2022;50(1):13–20. DOI: 10.18786/2072-0505-2022-50-008.
Kovaleva OV, Podlesnaya PA, Grachev AN. Macrophage cytotoxic activity and its role in the tumor pathogenesis. *Almanac of Clinical Medicine*. 2022;50(1):13–20 (In Russ.). DOI: 10.18786/2072-0505-2022-50-008.
- Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:123–47. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.
- Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*. 2017;545(7655):495–9. DOI: 10.1038/nature22396.
- Wagner J, Rapsomaniki MA, Chevrier S, Anzeneder T, Langwieder C, Dykgers A et al. A single-cell atlas of the tumor and immune ecosystem of human breast cancer. *Cell*. 2019;177(5):1330–45.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2019.03.005.
- Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity*. 2018;48(3):434–52. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.014.
- Lu D, Ni Z, Liu X, Feng S, Dong X, Shi X et al. Beyond T-cells: understanding the role of PD-1/PD-L1 in tumor-associated macrophages. *J Immunol Res*. 2019;2019:1919082. DOI: 10.1155/2019/1919082.
- VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/p160002c.pdf (accessed 05.09.2022)
- Асатурова А.В., Трегубова А.В., Шушканова Д.В. Ингибирование контрольных точек иммунитета при раке яичников. Клиническая и экспериментальная морфология. 2020;9(1):11–19. DOI: 10.31088/CEM2020.9.1.11-19.
Asaturova AV, Tregubova AV, Shushkanova DV. Inhibition of immunity control points in ovarian cancer. *Clinical and experimental morphology*. 2020;9(1):11–19 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.1.11-19.
- Якупова Е.Р., Тугузбаева Г.М., Кабиров И.Р., Урманцев М.Ф., Насибуллин И.М., Усманов Э.Г. и др. Роль опухоляссоциированных макрофагов в патогенезе различных видов рака. Медицинский вестник Башкортостана. 2020;15(1(85)):79–87. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44091738> (получено 05.09.2022).

- Yakupova ER, Tuguzbaeva GM, Kabirov IR, Urmantsev MF, Nasibullin IM, Usmanov EG, Zabolotnyi OA.* Role of tumor-associated macrophages in the pathogenesis of various cancer species. *Bashkortostan Medical Journal.* 2020;15(1(85)):79–87 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44091738> (accessed 05.09.2022).
16. *Казакова А.Д., Ракина М.А., Ларионова И.В.* Фенотипическое разнообразие макрофагов при раке яичников. *Вестник Томского государственного университета. Биология.* 2022;57:109–130. DOI: 10.17223/19988591/57/6.
Kazakova AD, Rakina MA, Larionova IV. Phenotypic diversity of macrophages in ovarian cancer. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology.* 2022;57:109–130 (In Russ.). DOI: 10.17223/19988591/57/6.
17. *Cai H, Zhang Y, Wang J, Gu J.* Defects in macrophage reprogramming in cancer therapy: The negative impact of PD-L1/PD-1. *Front Immunol.* 2021;12:690869. DOI: 10.3389/fimmu.2021.690869.
18. *Singhal S, Stadanlick J, Annunziata MJ, Rao AS, Bhojnagarwala PS, O'Brien S et al.* Human tumor-associated monocytes/macrophages and their regulation of T cell responses in early-stage lung cancer. *Sci Transl Med.* 2019;11(479):eaat1500. DOI: 10.1126/scitranslmed.aat1500.
19. *Zhang J, Cao D, Yu S, Chen L, Wei D, Shen C et al.* Amphotericin B suppresses M2 phenotypes and B7-H1 expression in macrophages to prevent Raji cell proliferation. *BMC cancer.* 2018;18(1):467. DOI: 10.1186/s12885-018-4266-0.
20. *Hartley GP, Chow L, Ammons DT, Wheat WH, Dow SW.* Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) signaling regulates macrophage proliferation and activation. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(10):1260–73. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0537.
21. *Antonios JP, Soto H, Everson RG, Moughon D, Orpilla JR, Shin NP et al.* Immunosuppressive tumor-infiltrating myeloid cells mediate adaptive immune resistance via a PD-1/PD-L1 mechanism in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2017;19(6):796–807. DOI: 10.1093/neuonc/now287.
22. *Zhang Y, Du W, Chen Z, Xiang C.* Upregulation of PD-L1 by SPP1 mediates macrophage polarization and facilitates immune escape in lung adenocarcinoma. *Exp Cell Res.* 2017;359(2):449–57. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.08.028.
23. *Xiong H, Mittman S, Rodriguez R, Moskalenko M, Pacheco-Sanchez P, Yang Y et al.* Anti-PD-L1 treatment results in functional remodeling of the macrophage compartment. *Cancer Res.* 2019;79(7):1493–506. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3208.
24. *Ma CJ, Ni L, Zhang Y, Zhang CL, Wu XY, Atia AN et al.* PD-1 negatively regulates interleukin-12 expression by limiting STAT-1 phosphorylation in monocytes/macrophages during chronic hepatitis C virus infection. *Immunology.* 2011;132(3):421–31. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2010.03382.x.
25. *Tsukamoto H, Fujieda K, Miyashita A, Fukushima S, Ikeda T, Kubo Y et al.* Combined blockade of IL6 and PD-1/PD-L1 signaling abrogates mutual regulation of their immunosuppressive effects in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2018;78(17):5011–22. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0118.
26. *Rao G, Latha K, Ott M, Sabbagh A, Marisetty A, Ling X et al.* Anti-PD-1 induces M1 polarization in the glioma microenvironment and exerts therapeutic efficacy in the absence of CD8 cytotoxic T-cells. *Clin Cancer Res.* 2020;26(17):4699–712. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-4110.
27. *Lindsten T, Hedbrant A, Ramberg A, Wijkander J, Solterbeck A, Eriksson M et al.* Effect of macrophages on breast cancer cell proliferation, and on expression of hormone receptors, uPAR and HER-2. *Int J Oncol.* 2017;51(1):104–14. DOI: 10.3892/ijo.2017.3996.
28. *Liu Z, Kuang W, Zhou Q, Zhang Y.* TGF- β 1 secreted by M2 phenotype macrophages enhances the stemness and migration of glioma cells via the SMAD2/3 signalling pathway. *Int J Mol Med.* 2018;42(6):3395–403. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3923.
29. *Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E.* Localized and reversible TGF β signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol.* 2009;11(11):1287–96. DOI: 10.1038/ncb1973.

Информация об авторах

Анна Юрьевна Калининчук – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной терапии рака НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Любовь Александровна Таширева – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной терапии рака НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Владимир Михайлович Перельмутер – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Author information

Anna Yu. Kalinchuk – Junior Researcher, Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences.
<https://orcid.org/0000-0003-2106-3513>

Lyubov A. Tashireva – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences.
<https://orcid.org/0000-0003-2061-8417>

Vladimir M. Perelmutter – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences.
<https://orcid.org/0000-0002-7633-9620>