

Определение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов у пациентов с раком желудка

Г.Г. Хакимова^{✉1}, Я.А. Божченко², Т.Н. Заботина², А.А. Трякин²

¹Ташкентский педиатрический медицинский институт, Ташкент, Узбекистан;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Аннотация

Обоснование. Рак желудка (РЖ) занимает 6-е место среди онкологических заболеваний (1 033 701 случай; 5,7%) и является 3-й ведущей причиной смерти от рака как у мужчин, так у женщин во всем мире (782 685 смертей, 8,2%). В настоящее время терапия РЖ представляет собой комплексное лечение с применением хирургического лечения, адъювантной химиотерапии, таргетных агентов и иммунотерапии ингибиторами контрольных точек. Несмотря на то, что за последние годы наше понимание РЖ значительно увеличилось, прогноз все еще остается неблагоприятным. Кроме того, очень часто у больных РЖ с одинаковой стадией по Международной классификации стадий злокачественных новообразований TNM регистрируется различная общая выживаемость. Поэтому, чтобы улучшить показатели выживаемости, необходимо понимать механизмы прогрессирования заболевания и найти новые эффективные прогностические факторы. Помимо многих существующих прогностических факторов, таких как клинико-морфологические характеристики (тип опухоли по Lauren, степень дифференцировки), биомаркеры, дефицит системы репарации неспаренных оснований (dMMR), в последнее время также выявлена положительная корреляция между степенью инфильтрации опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs), в особенности с пространственным расположением клеточных типов (интратуморальных или стромальных клеток), и показателями выживаемости пациентов со злокачественными новообразованиями. Более того, TILs признаны более значимым предиктивным фактором показателей выживаемости больных, нежели классификация TNM. В то же время прогностическая роль TILs при РЖ все еще четко не определена. Таким образом, понимание степени инфильтрации TILs в зависимости от их пространственного расположения позволило бы определить их прогностическую значимость, а также определить направление генерации иммунных реакций у больных РЖ на тканевом уровне в зависимости от риска и вероятности прогрессирования.

Цель. Изучить прогностическую значимость интратуморальных и стромальных CD4+TILs, CD8+TILs и их соотношения CD4+/CD8+TILs у больных с аденокарциномой желудка.

Материалы и методы. С 2017 по 2018 г. в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» 45 ранее не леченных больных аденокарциномой желудка (25 – с I–III стадиями, 20 – с IV стадией) получили хирургическое/комбинированное лечение или самостоятельную химиотерапию соответственно. Забор гистологического материала осуществлялся перед началом лечения. Исследовались интратуморальные (iTILs) и стромальные (sTILs) значения CD4+TILs, CD8+TILs, соотношения CD4+/CD8+TILs и их прогностическая значимость в отношении общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования (ВБП).

Результаты. За время наблюдения (16,4±6,2 мес) CD4+/CD8+iTILs явились факторами неблагоприятного прогноза для ВБП у больных 1-й группы ($p=0,035$; отношение рисков – ОР 3,264, доверительный интервал – ДИ 95%). Также выявлены достоверное снижение содержания CD4+iTILs, CD8+iTILs, CD4+/CD8+iTILs и отсутствие CD4+sTILs, CD8+sTILs, CD4+/CD8+sTILs у больных метастатическим РЖ ($p=0,0003$; $p=0,000004$; $p=0,00001$).

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о положительной прогностической значимости CD4+sTILs, CD8+sTILs, CD4+/CD8+sTILs. В то же время увеличение CD4+/CD8+iTILs уменьшает ВБП больных ранним и местно-распространенным РЖ.

Ключевые слова: аденокарцинома желудка, лимфоидное микроокружение, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, опухоль, CD4+TILs, CD8+TILs

Для цитирования: Хакимова Г.Г., Божченко Я.А., Заботина Т.Н., Трякин А.А. Определение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов у пациентов с раком желудка. Современная Онкология. 2021; 23 (2): 307–312. DOI: 10.26442/18151434.2021.2.200328

ORIGINAL ARTICLE

The identification of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with stomach cancer

Gulnoz G. Khakimova^{✉1}, Yana A. Bozhchenko², Tatyana N. Zabolina², Alexey A. Tryakin²

¹Tashkent Pediatric Medical Institute, Tashkent, Uzbekistan;

²Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Abstract

Background. Stomach cancer (SC) is the 6th most common neoplasm among cancers (1 033 701 cases; 5.7%) and the 3rd most deadly cancer worldwide for men and women (782 685 deaths, 8.2%). SC therapy is a complex treatment associated with surgery, adjuvant chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy with checkpoint inhibitors, nowadays. Despite the fact that the SC understanding has significantly increased within recent years, the prognosis still remains poor. In addition, very often the patients with the same stage of SC according to the international TNM classification of malignant tumors have different overall survival. Therefore, in order to improve survival rates, is necessary to understand the mechanisms of disease progression and to find new effective predictive factors. Besides many SC predictive factors, such as clinical and morphological characteristics (Lauren histolo-

Информация об авторах / Information about the authors

✉ Хакимова Гулноз Галибовна – канд. мед. наук, ассистент каф. онкологии, детской онкологии ТашПМИ, врач-онколог отд-ния химиотерапии Ташкентского городского филиала РСНПМЦОиР. E-mail: hgg_doc@mail.ru; ORCID: 0000-0002-4970-5429

Божченко Яна Анатольевна – канд. мед. наук, патологоанатомическое отд-ние ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

✉ Gulnoz G. Khakimova – Cand. Sci. (Med.), Tashkent Pediatric Medical Institute, Tashkent City branch of the Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Oncology and Radiology. E-mail: hgg_doc@mail.ru; ORCID: 0000-0002-4970-5429

Yana A. Bozhchenko – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology

gic type of tumor, degree of differentiation), biomarkers, deficient mismatch repair (dMMR), we have also revealed the positive correlation between the degree of tumor infiltration of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), especially with the spatial location of cell types (intratumoral or stromal cells), and the survival indicators of the patients with malignant neoplasms, recently. Moreover, TILs are the most significant predictive factors in patient survival rates than the TNM classification. At the same time, TILs predictive role in SC is still not clearly defined. Thus, the understanding of the degree of tumor infiltration of TILs depending on the spatial location would allow to determine the predictive significance, as well as to determine the direction of the immune reactions generating in patients with SC at the tissue level, depending on the risk and probability of progression.

Aim. To study the predictive significance of intratumoral and stromal CD4+TILs, CD8+TILs and CD4+/CD8+TILs in patients with gastric adenocarcinoma.

Materials and methods. From 2017 to 2018, 45 previously untreated patients with gastric adenocarcinoma (25 patients with stages I–III, 20 patients with stage IV) received surgical/combined treatment or independent chemotherapy, respectively, at the Blokhin National Medical Research Center of Oncology. The histological material was carried out before the treatment. Intratumoral (iTILs) and stromal (sTILs) values of CD4+TILs, CD8+TILs, CD4/CD8+TILs and the predictive significance in respect of overall survival and progression-free survival (PFS) were studied.

Results. During the observation period (16.4±6.2 months) CD4+/CD8+iTILs were factors of poor prognosis concerning PFS in patients of the first group ($p=0.035$; odds ratio – OR 3.264, 95% confidence interval – CI). We also identified the statistically significant decrease in CD4+iTILs, CD8+iTILs, CD4+/CD8+iTILs and the absence of CD4+sTILs, CD8+sTILs, CD4+/CD8+sTILs in patients with metastatic SC ($p=0.0003$; $p=0.000004$; $p=0.00001$).

Conclusion. The results show the positive predictive significance of CD4+sTILs, CD8+sTILs, CD4+/CD8+sTILs. At the same time, the increase of CD4+/CD8+iTILs reduces the PFS in patients with early and locally advanced SC.

Keywords: gastric adenocarcinoma, lymphoid microenvironment, tumor-infiltrating lymphocytes, tumor, CD4+TILs, CD8+TILs

For citation: Khakimova GG, Bozhchenko YA, Zabolina TN, Tryakin AA. The identification of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with stomach cancer. *Journal of Modern Oncology*. 2021; 23 (2): 307–312. DOI: 10.26442/18151434.2021.2.200328

Введение

В структуре онкологических заболеваний Российской Федерации рак желудка (РЖ) устойчиво занимает лидирующие позиции. Несмотря на снижение заболеваемости РЖ за последние 10 лет, около 17 тыс. россиян ежегодно умирают от этой патологии. За год в РФ диагностируется около 22 тыс. новых случаев РЖ, что составляет 4,6% всех злокачественных опухолей [1]. По данным О. Yazici и соавт., 5-летняя общая выживаемость (ОВ) РЖ в мире в 2016 г. по-прежнему составляет не более 20–30% [2]. В то же время примерно в 50% случаев после адьювантного лечения при местно-распространенных опухолях наблюдается местный/системный рецидив, где 5-летняя ОВ достигается только в 10–15% случаев [3]. При метастатическом процессе с применением паллиативной химиотерапии медиана ОВ составляет 8–10 мес [4]. И хотя «золотым стандартом» лечения РЖ являются радикальные операции, дополненные адьювантной и неадьювантной, регионарной и внутривенной химиотерапией, направленной на возможные имплантационные или гематогенные метастазы, результаты все еще довольно скромны. В связи с этим понятно стремление ученых найти ключ к пониманию возможностей регуляции процессов роста и дифференцировки злокачественных клеток [5].

В последнее время возникли попытки исследования биологических свойств опухоли и создания многофакторных систем прогноза РЖ, так как «классические» морфологические критерии прогноза не могут полностью объяснить все разнообразие биологических свойств опухоли и не всегда достаточно правильно предсказывают ее течение [6]. Особый интерес представляет оценка роли иммунной системы в контроле опухолевого роста и, соответственно, в прогнозе заболевания. Для этого необходимо изучение субпопуляций опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs), которые могут являться потенциальными биомаркерами прогноза течения онкологического заболевания и эффективности консервативного лечения.

В 1922 г. W. McCarty [7] предложил рассматривать TILs как проявление противоопухолевой активности иммунной системы. В конце 1990-х гг. в серии работ показано, что инфильтрация опухолей иммунными клетками соответствует прогрессированию опухоли. Позже ряд наблюдений выявил

двойственную роль TILs в микроокружении опухоли. Так, TILs могут не только подавлять рост опухоли, ингибируя ее рост, но и способствовать ее росту путем селекции иммуно-резистентных клонов или посредством создания в микроокружении благоприятных условий [8]. На морфологическом уровне TILs обнаруживаются в паренхиме опухоли. Оценка их субпопуляционного состава может быть проведена иммунологическим и иммуногистохимическим (ИГХ) методами. Наиболее важное значение придается исследованию субпопуляций зрелых Т-клеток (CD3+), Т-киллеров (CD8+) и Т-хелперов (CD4+).

Корреляцию между TILs и клиническим исходом исследовали при различных злокачественных новообразованиях [9], таких как рак толстой кишки [10], молочной железы [11], меланомы [12], рак яичников [13], поджелудочной железы [14] и т.д. Однако прогностическое значение TILs при ряде типов опухоли остается спорным. Известно, что высокая плотность CD8+ Т-клеток в строме опухоли ассоциируется с более длительной ОВ, тогда как О. Kawai и соавт. показали, что только увеличение инфильтрации опухолевой ткани стромальными CD8+ Т-клетками коррелирует с увеличением выживаемости больных [15]. J. Gos и соавт. сообщили, что уровень CD8+ Т-клеток (интра- и перитуморальных) имеет прогностическую ценность для пациентов с раком легкого [16]. Эти работы свидетельствуют о том, что в настоящее время стандартные клинические и морфологические факторы прогноза могут быть дополнены оценкой инфильтрации опухоли зрелыми Т-клетками. Следовательно, данное направление исследований представляется весьма актуальным, так как в перспективе может привести к установлению дополнительных факторов прогноза.

Цель исследования – изучить прогностическую значимость Т-хелперов (CD4+TILs), цитотоксических Т-клеток (CD8+TILs) и их соотношения (CD4+/CD8+TILs) ИГХ-методом у больных РЖ. Кроме того, провести анализ TILs в зависимости от расположения иммунных клеток в опухолевой ткани – интра- и перитуморальных (iTILs) и стромальных (sTILs).

Материалы и методы

Нами выполнено проспективное исследование с включением больных аденокарциномой желудка, проходивших лечение

Заболотина Татьяна Николаевна – д-р биол. наук, зав. централизованным клинико-лабораторным отд. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина».
E-mail: tazabolotina@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-7631-5699

Трякин Алексей Александрович – д-р мед. наук, ст. науч. сотр. онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтическое) №2 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Tatyana N. Zabolotina – D. Sci. (Biol.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology.
E-mail: tazabolotina@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-7631-5699

Alexey A. Tryakin – D. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology

Рис. 1. ИГХ-анализ степени инфильтрации CD8+ Т-лимфоцитами в лимфоидном инфильтрате РЖ: а – интратуморальная инфильтрация опухоли (×40); б – перитуморальная инфильтрация опухоли (×20).
Fig. 1. Immunohistochemical (IHC) study of the degree of tumor infiltration of CD8+ T-lymphocytes into stomach cancer (SC) lymphoid infiltration: a – intratumoral tumor lymphocyte infiltration (×40); b – peritumoral tumor lymphocyte infiltration (×20).

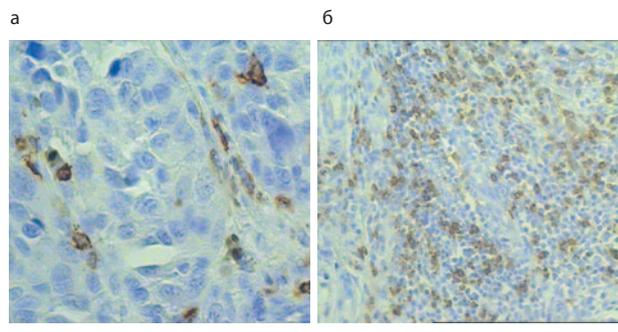


Рис. 2. ИГХ-анализ степени инфильтрации CD4+ Т-лимфоцитами в лимфоидном инфильтрате РЖ: а – интратуморальная инфильтрация опухоли (×20); б – интратуморальная инфильтрация опухоли (×10).
Fig. 2. IHC-analysis of the degree of tumor infiltration of CD4+ T-lymphocytes into SC lymphoid infiltration: a – intratumoral tumor lymphocyte infiltration (×20); b – intratumoral tumor lymphocyte infiltration (×10).

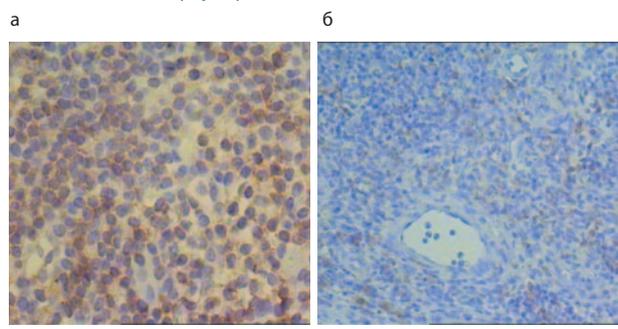
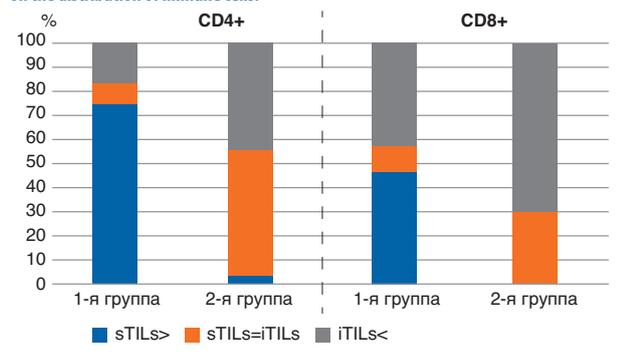


Рис. 3. Соотношение CD4+TILs, CD8+TILs и CD4+/CD8+TILs в зависимости от распределения иммунных клеток.
Fig. 3. The correlation between CD4+TILs, CD8+TILs and CD4+/CD8+TILs depending on the distribution of immune cells.



в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» в период с 2017 по 2018 г.

Критериями включения пациентов явились:

- 1) возраст больных старше 18 лет;
- 2) морфологическая верификация опухоли – аденокарцинома желудка.

Критерии исключения:

- 1) воспалительные заболевания в анамнезе за последние 3 мес;
- 2) поддерживающая антибактериальная и иммуномодулирующая терапия на момент включения в исследование.

Пациентам проводилось лечение согласно существующим стандартам (I–III стадия – хирургическое лечение; IV стадия – лекарственная терапия 1-й линии). На этапе исходной оценки всем больным проведены следующие обследования: физикальный осмотр, клинический и биохимический анализ крови (анализатор Abbott Diagnostic, США: Cell-Dyn 3700 SL и

Architect c8800), компьютерная томография. Статус пациентов удовлетворительный, по шкале ECOG – 0–1 балл. Анализ опухоли-инфильтрирующих лимфоцитов у пациентов с РЖ осуществлялся с помощью ИГХ-анализа с целью определения показателей CD4+TILs, CD8+TILs, CD4+/CD8+TILs.

Иммуногистохимический анализ. Срезы с парафиновых блоков наносились на поли-L-лизиновые стекла с последующей инкубацией их при температуре 35–37°C в условиях термостата для их плотного прикрепления. После выполнялись депарафинизация материала в ксилоле, отмывание в 96 и 70% этиловых спиртах и дистиллированной воде. Далее осуществлялась демаскировка антигенов при температуре 96°C в буфере Antigen Retrieval Solution (DAKO), pH 9.0. Ингибирование эндогенной пероксидазы 3% перекисью водорода и инкубация первых антител (CD8 – DAKO, клон C8/144B, 1:100; CD4 – DAKO, клон C4/144B, 1:100); выявление процесса связывания антиген–антитело осуществлялось с помощью системы визуализации Dako EnVision и диаминобензидина в качестве хромогена. Окрашивание ядер осуществлялось при помощи гематоксилина Майера. Оценка результатов исследования осуществлялась с помощью светового микроскопа Olympus CX41, камера DP72. Количество CD8- Т-лимфоцитов на препаратах подсчитывалось на 1 мм² (5 полей зрения при ×400, окуляре WHB10X/20) двумя способами: только в опухолевой ткани и в опухолевой ткани и прилежащей строме, однако опухоль должна была занимать не менее 50% поля зрения.

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка материала и расчеты показателей выполнены с использованием статистического пакета Statistica for Windows v.10 (однофакторный анализ, корреляционный анализ по Спирмену, описательная статистика сравнения количественных показателей по Манну–Уитни, анализ Каплана–Мейера). Категориальные переменные выражали в процентах и абсолютных значениях.

Статистическая значимость различий между количественными показателями вычислялась по непараметрическим критериям Манна–Уитни и Вилкоксона. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера и χ^2 . Различия считали значимыми при $p < 0,05$ (допустимый уровень а-ошибки 5%). Степень взаимосвязи параметров оценивалась с помощью корреляционного анализа по Спирмену.

Критерии оценки

В данном исследовании оцениваемыми параметрами были ОВ и выживаемость без прогрессирования (ВБП). ОВ рассчитывалась как время от момента постановки диагноза до момента смерти пациента от любой причины либо до даты последнего контакта с больным. ВБП рассчитывалась как время от начала лечения заболевания до времени регистрации роста имеющихся проявлений болезни либо появления новых метастатических очагов. Показатели выживаемости рассчитывались из реальных данных о длительности жизни каждого больного на момент завершения исследования с использованием методики Каплана–Мейера. Сравнение кривых выживаемости выполнялось с использованием log-rank-теста.

Характеристика пациентов. Под нашим наблюдением находились 45 ранее не леченных пациентов с РЖ – 19 (42,2%) мужчин и 26 (57,8%) женщин. Возраст пациентов варьировал от 37 до 80 лет (средний возраст 60,9±10,9 года, медиана 62 года). Из них 25 (55,6%) пациентов с РЖ, получивших хирургическое лечение (1-я группа) и 20 (44,4%) пациентов, получивших химиотерапевтическое лечение (2-я группа) в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» в 2017–2018 гг. Медиана наблюдения за больными составила 18,5 мес [15,2; 20,4]. В 1-й группе – 18,3 мес [15,2; 19,2], во 2-й – 19,5 мес [8,7; 22,7]. При морфологическом обследовании у всех больных верифицирована аденокарцинома: у 5 (11,1%) пациентов опухоль имела низкую степень дифференцировки, у 14 (31,1%) – умеренную и у 26 (57,8%) пациентов – высокую.

При ИГХ-исследовании криостатных срезов опухоли (n=45) подсчет числа интратуморальных иммунокомпетентных клеток проводили на площади 0,34 мм² отдельно в строме и паренхиме опухоли. При этом исследовались эпителиальные и стромальные поля с наиболее выраженной инфильтрацией. Подсчет осуществлялся двумя исследователями независимо друг от друга.

Таблица 1. Показатели опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) у больных РЖ 1 и 2-й групп до начала лечения (n=45)
Table 1. The level of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in patients with SC of the first and second groups before the treatment (n=45)

Показатели клеточного иммунитета в ткани, кл./п.зр.		Хирургическая группа (1-я); n=25		Химиотерапевтическая группа (2-я); n=20		p	Всего	
		медиана	квартили	медиана	квартили		медиана	квартили
CD4+TILs	CD4+TILs	22,2	10,5–38,5	0,4	0–1,1	0,0000001	6,0	0,4–22,5
	CD4+iTILs	1,1	0,4–7,4	0,2	0–1,1	0,021	0,5	0–2,1
	CD4+sTILs	21,9	7,7–26,5	0	0–0	0,0000003	0,2	0–21,9
CD8+TILs	CD8+TILs	53,5	39,1–106,9	3,0	0–9,0	0,0000002	16,6	1,7–64,8
	CD8+iTILs	24,1	4,9–37,3	3,0	0–9,0	0,0027	9,0	1,1–28,3
	CD8+sTILs	38,0	11,7–54,9	0	0–0	0,0000004	1,3	0–38,0
CD4+/CD8+TILs	CD4+/CD8+TILs	0,35	0,19–0,54	0,04	0–0,32	0,000001	0,23	0–0,47
	CD4+/CD8+iTILs	0,06	0,007–0,59	0,04	0–0,27	0,157	0,04	0–0,38
	CD4+/CD8+sTILs	0,48	0,20–0,61	0	0–0	0,002	0	0–0,50

Примечание. Кл./п.зр. – клетки в поле зрения.

Таблица 2. Соотношение компонентов TILs (iTILs, sTILs) у больных РЖ 1 и 2-й групп до начала лечения (n=45)
Table 2. The correlation between iTILs and sTILs in patients with SC of the first and second groups before the treatment (n=45)

Показатели клеточного иммунитета в ткани		Хирургическая группа (1-я), n=25		Химиотерапевтическая группа (2-я), n=20		Всего	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
CD4+TILs	>iTILs	3	12,0	8	40,0	11	24,4
	>sTILs	20	80,0	1	5,0	21	46,7
	iTILs=sTILs	2	8,0	11	55,0	13	28,9
CD8+TILs	>iTILs	10	40,0	13	65,0	23	51,1
	>sTILs	13	52,0	0	0,0	13	28,9
	iTILs=sTILs	2	8,0	7	35,0	9	20,0
CD4+/CD8+TILs	>iTILs	7	28,0	8	40,0	15	33,3
	>sTILs	15	60,0	3	15,0	18	40,0
	iTILs=sTILs	3	12,0	9	45,0	12	26,7

Таблица 3. Показатели CD8+TILs, CD4+TILs, CD4+/CD8+TILs в зависимости от стадии заболевания у больных РЖ до начала лечения (n=45)
Table 3. The levels of CD8+TILs, CD4+TILs, CD4+/CD8+TILs depending on the stage of the disease in patients with SC before treatment (n=45)

Показатели клеточного иммунитета в ткани, кл./п.зр.		I–II (n=11)		III (n=14)		IV (n=20)		p		
		медиана	квартили	медиана	квартили	медиана	квартили	I–II/III	I–II/IV	III–IV
CD4+TILs	CD4+iTILs	1,10	0,20–15,70	0,90	0,40–2,1	0,20	0–1,05	0,563	0,0371	0,079
	CD4+sTILs	21,90	13,10–27,80	10,10	6,00–26,5	0,00	0–0,00	0,335	0,0004	0,00001
	CD4+TILs	22,50	20,50–44,60	13,15	8,90–38,5	0,40	0–1,05	0,146	0,00001	0,0002
CD8+TILs	CD8+iTILs	28,30	24,10–49,80	9,90	1,10–37,3	2,95	0–9,00	0,146	0,0032	0,0387
	CD8+sTILs	26,80	7,60–44,00	40,90	11,70–58,5	0,00	0–0,00	0,721	0,0004	0,0001
	CD8+TILs	64,80	49,80–117,40	46,30	16,60–106,9	2,95	0,00	0,285	0,00004	0,0005
CD4+/CD8+TILs	CD4+/CD8+iTILs	0,02	0,01–0,32	0,07	0,01–0,7	0,04	0–0,27	0,425	0,549	0,0924
	CD4+/CD8+sTILs	0,50	0,38–1,22	0,45	0,00–0,5	0,00	0–0,00	0,116	0,0004	0,0002
	CD4+/CD8+TILs	0,35	0,32–0,61	0,29	0,19–0,5	0,04	0–0,32	0,528	0,0024	0,0346

В результате фиксировались средние арифметические по данным двух исследователей. Реакцию расценивали как слабую или отрицательную (<5 клеток в поле зрения микроскопа), умеренную (6–19 клеток) или выраженную (>20 клеток) [3]. При исследовании показателей CD4+TILs и CD8+TILs учитывалось iTILs и sTILs расположение лимфоцитов.

Показатели содержания CD8+TILs в лимфоидном инфильтрате рака желудка

В нашем исследовании инфильтрация опухолевой ткани стромальными и интралимфатическими лимфоцитами с фенотипом CD8+TILs отмечалась в 23 (51,1%) исследуемых образцах гистологического материала. В 9 (20%) образцах не обнаружено CD8+ T-лимфоцитов ни в стромальном, ни в интралимфатическом пространстве, интралимфатически не обнаружено в 11 (24,4%), стромально – в 22 (48,8%) случаях (рис. 1).

Интралимфатическая инфильтрация опухоли CD8+TILs во всех случаях преобладала над стромальной инфильтрацией. В 27 (79,4%) случаях отмечалась диффузная интралимфатическая лимфоидная инфильтрация CD8+TILs, в 7 (20,5%) случаях отмечены отдельные очаговые скопления лимфоидных

клеток. Стромальная инфильтрация опухоли представлена преимущественно незначительными скоплениями CD8+TILs (2–3 клетки), расположенными в соединительнотканых прослойках между железистыми клетками желудка, внутри клеток опухоли отмечались редкие единичные CD8+TILs.

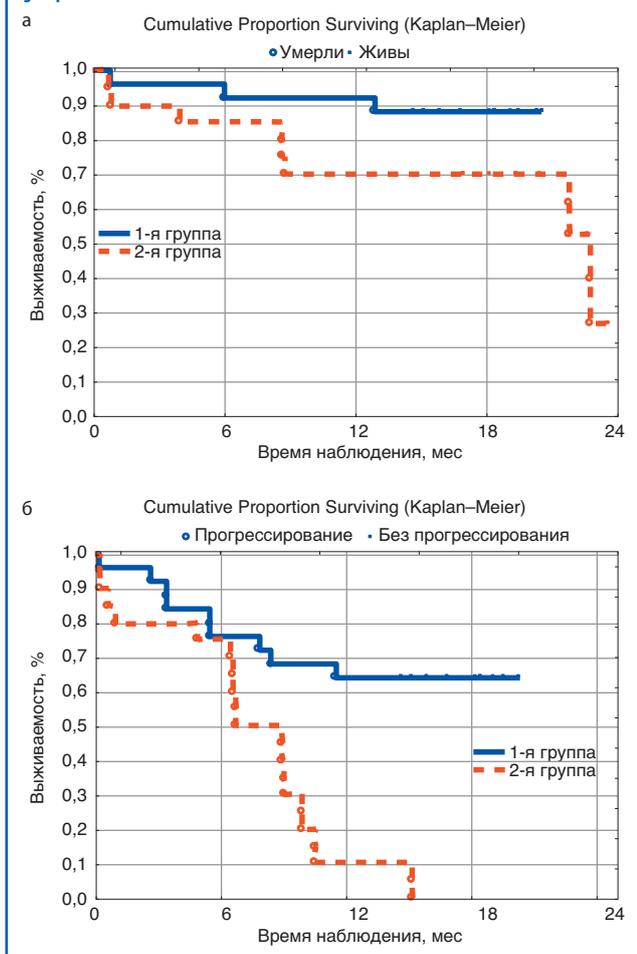
Из рис. 1 следует, что более высокие показатели CD8+TILs коррелировали с выраженной общей лимфоцитарной инфильтрацией опухоли.

Показатели содержания CD4+TILs в лимфоидном инфильтрате рака желудка

В нашем исследовании инфильтрация опухолевой ткани стромальными и интралимфатическими лимфоцитами с фенотипом CD4+TILs отмечалась в 25 (55,5%) исследуемых образцах гистологического материала. В 22 (48,8%) образцах не обнаружено CD4+TILs ни в стромальном, ни в интралимфатическом пространстве, интралимфатически не обнаружено в 14 (31,1%), стромально – в 20 (44,4%) случаях (рис. 2).

Интралимфатическая инфильтрация опухоли CD4+TILs имела диффузно-очаговый характер и во всех случаях преобладала над стромальной инфильтрацией. Интралимфатическая ин-

Рис. 4. ОВ и ВБП у больных 1 и 2-й групп.
Fig. 4. Overall survival and progression-free survival in patients of the first and second groups.



фильтрация опухоли представлена преимущественно незначительными скоплениями CD4+TILs (2–3 клетки), расположенными в соединительнотканых прослойках между железистыми клетками желудка, внутри клеток опухоли отмечались редкие единичные CD4+TILs.

Показатели содержания CD4+/CD8+TILs в лимфоидном инфильтрате рака желудка

В данном исследовании инфильтрация опухолевой ткани стромальными и интрастромальными лимфоцитами с фенотипом CD4+/CD8+TILs отмечалась в 31 (68,8%) исследуемых образцах гистологического материала. В 14 (31,1%) образцах не обнаружено CD4+/CD8+TILs ни в стромальном, ни в интрастромальном пространстве, интрастромально не обнаружено в 9 (20%), стромально – в 14 (31,1%) случаях.

Далее при проведении анализа CD4+TILs, CD8+TILs и их соотношения CD4+/CD8+TILs, в частности их интрастромальных и стромальных значений у больных 1 и 2-й групп, выявлено, что медиана CD4+sTILs, CD8+sTILs, CD4+/CD8+sTILs достоверно выше в 1-й группе по сравнению со 2-й ($p=0,0003$; $p=0,000004$; $p=0,00001$ соответственно). При этом наличие содержания CD4+sTILs, CD8+sTILs и CD4+/CD8+sTILs у пациентов 2-й группы не найдено. В то же время медиана CD4+iTILs и CD8+iTILs также достоверно ниже у пациентов с метастатическим РЖ ($p=0,02$, $r=0,70$; $p=0,0027$, $r=0,65$); табл. 1.

При проведении анализа соотношения интрастромального и стромального расположения иммунных клеток в опухолевой ткани отмечено, что для больных 1-й группы характерно преобладание содержания CD4+sTILs, CD8+sTILs – 80% против 5,0% и 52% против 0% соответственно. В то же время равнозначное число ($\pm 10\%$) интрастромальных и стромальных им-

мунных клеток для CD4+TILs, CD8+TILs преимущественно встречалось у пациентов 2-й группы: 55 и 35% соответственно (табл. 2; рис. 3).

Для соотношения CD4+/CD8+TILs отмечена аналогичная закономерность. Для больных 1-й группы характерно преобладание CD4+/CD8+sTILs иммунных клеток – 60,0% против 15,0%, равнозначное число ($\pm 10\%$) iTILs и sTILs отмечено у больных 2-й группы – 45,0% против 12,0%.

Далее при подгрупповом анализе пациентов с РЖ в соответствии со стадией заболевания выявлено, что содержание CD4+TILs, CD4+sTILs, CD8+iTILs, CD8+sTILs, CD8+TILs, CD4+/CD8+sTILs и CD4+/CD8+TILs достоверно снижается по мере увеличения стадии заболевания с I–II по IV (табл. 3).

При оценке TILs относительно таких клинических факторов, как стадия заболевания, степень дифференцировки (G), тип Lauren (кишечный или диффузный), возраст и пол 45 пациентов с РЖ, сила корреляции отмечена только для CD8+TILs. При этом сильная корреляция наблюдается, когда при увеличении стадии заболевания снижается инфильтрация CD8+sTILs ($r=-0,65$).

Таким образом, снижение инфильтрации опухолевой ткани интрастромальными и отсутствием стромальных CD4+TILs, CD8+TILs, CD4+/CD8+TILs характерно для пациентов с метастатическим РЖ. Кроме этого, для больных 2-й группы характерны равнозначные значения iTILs и sTILs.

Оценка выживаемости

За время наблюдения 18,5 мес [15,2; 20,4] летальность составила 28,9% (13/45): 12% (3/25) – в 1-й группе и 50% (10/20) – во 2-й ($p=0,007$). Прогрессирование заболевания зарегистрировано у 29 (62,2%) пациентов с РЖ: у 20 (100%) пациентов 2-й группы против 9 (36%) – 1-й группы. Годичная ОВ пациентов 1-й группы составила $92,0 \pm 5,4\%$; 2-й группы – $70,0 \pm 10,2\%$. Годичная ВБП для 1 и 2-й групп составила $64,0 \pm 9,6\%$ и $10,0 \pm 6,7\%$ соответственно (рис. 4).

Для определения независимых прогностических признаков, влияющих на ВБП и ОВ, нами выполнен последовательный регрессионный анализ по Коксу. В анализ включены все переменные из однофакторного анализа с уровнем $p < 0,05$. Результаты анализа выявили, что CD4+/CD8+iTILs являются фактором неблагоприятного исхода для ВБП у больных ранним и местно-распространенным РЖ ($p=0,035$; ОР 3,264, ДИ 95%).

Результаты и обсуждение

Ключевая роль в формировании противоопухолевого иммунитета отводится иммунной системе и опухоль-инфильтрирующим лимфоцитам, являющимся объектом активного изучения [17–19]. По данным недавнего метаанализа, включавшего 22 исследования и более 2900 образцов РЖ, выявлено позитивное влияние CD4+TILs и CD8+TILs на ОВ (CD4+ ОР 0,70, 95% ДИ 0,55–0,90; CD8+ ОР 0,63, 95% ДИ 0,48–0,83) [20]. Кроме того, в данном метаанализе высокая инфильтрация опухолевой ткани CD8+ Т-лимфоцитами являлась самым сильным предиктивным фактором увеличения показателей выживаемости. Однако в исследовании Z. Shen и соавт. при анализе 133 образцов ткани больных РЖ корреляция CD4+TILs и CD8+TILs с ОВ не найдена [21]. В рамках нашего исследования соотношение CD4+/CD8+iTILs снижает ВБП у больных ранними и местно-распространенными формами РЖ. Соответственно, определение пространственного расположения иммунных клеток в опухолевой ткани является крайне актуальным. Определение типов, плотности и расположения иммунных клеток также имеет большее прогностическое значение. В. Kang и соавт. определили, что sTILs могут использоваться в качестве позитивного прогностического фактора для ВБП [22]. Напротив, другое исследование показало, что увеличение iTILs ассоциировано с улучшением показателей выживаемости [23]. По факту sTILs хорошо известны как благоприятный параметр при раке молочной железы [24]. Это согласуется с результатами нашего исследования, где наличие CD4+sTILs, CD8+sTILs является фактором благоприятного прогноза и встречается у больных с локальными и местно-распространенными формами РЖ ($p=0,000003$;

$p=0,000004$). Однако в научных кругах, исследующих РЖ, нет единого мнения о корреляции показателей выживаемости с распределением TILs.

Заключение

Таким образом, несмотря на то, что TILs могут быть легко обнаружены путем анализа слайдов срезов опухоли, окрашенных ИГХ-методом, необходимо точное определение степени

инфильтрации и пространственного распределения лимфоцитов в опухолевой ткани РЖ. Очевидно, что различные типы инфильтрирующих клеток имеют различную предиктивную и прогностическую значимость.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Литература/References

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 г. М., 2019 [Kaprin AD, Starinskii VV, Petrova GV. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2018 g. Moscow, 2019 (in Russian)].
- Yazici O, Sendur MA, Ozdemir N, Aksoy S. Targeted therapies in gastric cancer and future perspectives. *W J Gastroenterol.* 2016;22(2):41-89.
- Waddell T, Verheij M, Allum W, et al. Gastric cancer: ESMO-ESSO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24(Suppl. 6):57-63.
- Okines AF, Norman AR, McCloud P, et al. Meta-analysis of the REAL-2 and ML17032 trials: evaluating capecitabine-based combination chemotherapy and infused 5-fluorouracil-based combination chemotherapy for the treatment of advanced oesophago-gastric cancer. *Ann Oncol.* 2009;20:1529-34.
- Никитин М.П., Сельчук В.Ю. Рак желудка. *Рус. мед. журн.* 2003;26(11):1441-9 [Nikulin MP, Selchuk VU. Gastric cancer. *RMZh.* 2003;26(11):1441-9 (in Russian)].
- Kim JS, Kim MA, Kim TM, et al. Biomarker analysis in stage III-IV (M0) gastric cancer patients who received curative surgery followed by adjuvant 5-fluorouracil and cisplatin chemotherapy: epidermal growth factor receptor (EGFR) associated with favourable survival. *Br J Cancer.* 2009;100:732-8.
- McCarty WC. Principles of prognosis in cancer. *JAMA.* 1931;96:30-3.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011;331:1565-70.
- Al-Shibli K, Al-Saad S, Donnem T, et al. The prognostic value of intraepithelial and stromal innate immune system cells in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology.* 2009;55:301-12.
- Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol.* 2011;29:610-8.
- Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29:1949-55.
- Mackensen A, Ferradini L, Carcelain G, et al. Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressive melanoma. *Cancer Res.* 1993;53:3569-73.
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(3):203-13.
- Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas.* 2004;28:e26-31.
- Kawai O, Ishii G, Kubota K, et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2008;113:1387-95.
- Goc J, Germain C, Vo-Bourgeois TK, et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res.* 2014;74:705-15.
- Бережная Н.М. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения. *Онкология.* 2009;1(2):86-93 [Berezhnaya NM. Role of immune system cells in tumor microenvironment. II. Interaction of the immune system cells with other microenvironment components. *Oncology.* 2009;1(2):86-93 (in Russian)].
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;6917(420):860-7.
- Takenaka Y, Oya R, Kitamiura T, et al. Platelet count and platelet-lymphocyte ratio as prognostic markers for head and neck squamous cell carcinoma: Meta-analysis. *Head Neck.* 2018;40(12):2714-23.
- Lee JS, Won HS, Sun S, et al. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(32):e.11769.
- Shen Z, Zhou S, Wang Y, et al. Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136:1585-95.
- Kang BW, Seo AN, Yoon S, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer. *Ann Oncol.* 2016;27:494-501.
- Grogg KL, Lohse CM, Pankratz VS, et al. Lymphocyte-rich gastric cancer: associations with Epstein-Barr virus, microsatellite instability, histology, and survival. *Mod Pathol.* 2003;16(7):641-51.
- Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26:259-71.

Статья поступила в редакцию / The article received: 21.04.2020

Статья принята к печати / The article approved for publication: 12.07.2021



OMNIDOCTOR.RU