

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

ХАКИМОВА ГУЛНОЗ ГОЛИБОВНА

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАКА
ЖЕЛУДКА**

14.01.12 – Онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Алексей Александрович Трякин

доктор биологических наук

Татьяна Николаевна Заботина

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Иммунокомпетентные клетки в периферической крови при раке желудка	19
1.2 Факторы воспаления в периферической крови при раке желудка.....	23
1.3 Иммунокомпетентные клетки в опухолевой ткани при раке желудка.....	24
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
2.1 Общая характеристика клинического материала	35
2.2 Лабораторные (иммунологические) методы исследований	38
2.2.1 Исследование иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови	39
2.2.2 Исследование цитотоксического потенциала клеток-эффекторов	40
2.2.3 Исследование иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль	41
2.3 Проточно-цитометрический анализ	41
2.4 Исследование лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль методом иммуногистохимии	42
2.5 Характеристика больных.....	44
2.6 Статистический анализ.....	46
ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА	48
3.1 Анализ линейной структуры лимфоцитов периферической крови, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка	48
3.2 Анализ линейной структуры лимфоцитов периферической крови, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка (в зависимости от стадии заболевания)	51
3.3 Анализ факторов системного воспаления у больных раком желудка.....	53
3.4 Клинико-иммунологический анализ иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови у больных раком желудка	55
3.5 Отдаленные результаты в зависимости от клинических показателей у больных раком желудка	58

3.6 Прогностическое значение линейной структуры лимфоцитов периферической крови, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка.....	60
ГЛАВА 4 ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ, У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА	72
4.1 Анализ линейной структуры лимфоцитов опухолевой ткани, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка.....	72
4.2 Анализ линейной структуры лимфоцитов опухолевой ткани, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка (в зависимости от стадии заболевания)	74
4.3 Клинико-иммунологический анализ иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у больных раком желудка	77
4.4 Прогностическое значение линейной структуры лимфоцитов опухолевой ткани, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка.....	78
ГЛАВА 5 ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ, МЕТОДОМ ИММУНОГИСТОХИМИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА	90
5.1 Анализ CD8+TILs, CD4+TILs и соотношения CD4+/CD8+TILs в лимфоидном инфильтрате у больных раком желудка.....	90
5.2 Анализ CD8+TILs, CD4+TILs и соотношения CD4+/CD8+TILs в лимфоидном инфильтрате у больных раком желудка (в зависимости от стадии заболевания). .	95
5.3 Клинико-иммуногистохимический анализ лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль у больных раком желудка.....	97
5.4 Сравнение метода проточной цитометрии и иммуногистохимического анализа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль у больных раком желудка	98
5.5 Прогностическое значение содержания CD4+TILs, CD8+TILs и соотношения CD4+/CD8+TILs в лимфоидном инфильтрате у больных раком желудка.....	98

ГЛАВА 6 ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ДО И В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА	103
6.1 Динамика показателей иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови в процессе лечения у больных метастатическим раком желудка	103
6.2 Динамика показателей иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, в процессе лечения у больных метастатическим раком желудка	109
ГЛАВА 7 КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, ФАКТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ, ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ, И КЛИНИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ ВЫЖИВАЕМОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА	116
ГЛАВА 8 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	141
ВЫВОДЫ	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	148

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Рак желудка (РЖ) по распространенности занимает пятое место среди онкологических заболеваний (1 313 000 случаев) и является третьей причиной смертности от рака (819 000 случаев смерти) в мире [63]. В структуре онкологических заболеваний в России 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 рака желудка, что составляет 4,6% от всех злокачественных опухолей [11]. По данным Yazıcı O., Sendur M.A. et al., 5-летняя общая выживаемость (ОВ) РЖ в мире в 2016 году составляла не более 20-30% [176]. В то же время, при местнораспространенных опухолях примерно в 50% случаев после адьювантного лечения наблюдается местный/системный рецидив, где 5-летняя ОВ достигается только в 10-15% случаев [163]. При метастатическом процессе паллиативная химиотерапия дает незначительный выигрыш с медианой ОВ приблизительно 8-10 месяцев [134].

В настоящее время стандартными клинико-морфологическими факторами, позволяющими прогнозировать течение рака желудка, остаются такие параметры как размер опухоли, количество пораженных регионарных лимфатических узлов, степень злокачественности, тип по Lauren, статус MSI; экспрессия онкобелка Her-2. Разработаны оптимальные и эффективные лечебные алгоритмы для каждой конкретной стадии заболевания с учетом ключевых морфологических, клинических и молекулярно-биологических факторов. Вместе с тем отдаленные результаты лечения РЖ остаются малоудовлетворительными. И хотя агрессивная хирургическая тактика и расширенные операции являются стандартом, при котором можно добиться полного излечения в сочетании с воздействием на предположительно существующие даже на ранних стадиях имплантационные или гематогенные метастазы с помощью адьювантной, неоадьювантной, регионарной, внутриволостной химиотерапией, результаты все еще довольно скромны. Поэтому

понятны стремления ученых найти «ключ» к пониманию возможностей патогенетической регуляции процессов роста и дифференцировки злокачественной клетки [176]. Особый интерес представляет оценка роли иммунной системы в контроле опухолевого роста и, соответственно, в прогнозе заболевания. Иммунная система и клетки, инфильтрирующие опухоль, являются объектом активного изучения [2; 49; 158], поскольку им отводится ключевая роль в формировании противоопухолевого иммунитета. Многообразие субпопуляций иммунных клеток, а также основных продуктов их синтеза и путей совместного взаимодействия может объяснять как активацию путей противоопухолевой защиты, так и потенцирование прогрессирования заболевания. В настоящее время не вызывает сомнения утверждение, что иммунная система способна распознавать опухоль и генерировать как локальный, так и системный иммунный ответ, направленный на подавление опухолевого роста [75]. Кроме того, существует понимание процессов, лежащих в основе взаимодействия клеток опухоли с иммунной системой. В частности, известно, что продуктивный иммунный ответ и уничтожение клеток опухоли связаны с активацией CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), а их созревание и цитолитический потенциал находятся под контролем CD4⁺Т-хелперов. Анергия ЦТЛ связана с привлечением в опухоль супрессорных популяций клеток, таких как регуляторные CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие белок Foxp3, миелоидные супрессорные клетки, а также с секрецией иммуносупрессорных молекул, ингибирующих иммунный ответ на опухоль. Вопрос о связи между количеством и иммуносупрессорной активностью регуляторных Т-клеток (Tregs) внутри опухоли, состоянием эффекторных и цитотоксических лимфоцитов, а также общим состоянием иммунной системы при раке желудка исследован недостаточно. Неуклонно растущий интерес к изучению процессов, происходящих в месте действия антиген-специфических Т-клеток, привел к накоплению массива данных, свидетельствующих о том, что в подавляющем большинстве случаев существует прямая связь между составом и количеством инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TILs) определенных субпопуляций и эффективностью лечения опухолей с помощью традиционных и

таргетных методов терапии. Кроме того, состав TILs и его изменения коррелируют с клиническим течением заболевания [120]. Этот факт позволяет рассматривать отдельные субпопуляции TILs как клинические маркеры. В частности, для ряда злокачественных опухолей фактически доказана связь между клиническим прогнозом и соотношением между количеством CD8⁺ Т-клеток и регуляторных/супрессорных Т-клеток. Увеличение числа Tregs является неблагоприятным фактором, и напротив, повышение величины CD8⁺ Т-клеток повышает вероятность благоприятного прогноза [120].

В тоже время, анализ литературы последних лет показал несомненную прогностическую ценность системных воспалительных индексов, основанных на подсчете соотношений нейтрофилов, лимфоцитов и тромбоцитов в периферической крови пациентов с колоректальным раком [139], раком желудка [129] и гепатоцеллюлярным раком [82]. Это позволяет использовать данные показатели в клинической практике на этапе планирования комплексного лечения пациентов злокачественными новообразованиями, а также максимально рано выявлять признаки рецидива заболевания.

В перспективе полученные в работе данные могут стать основой для разработки индивидуальных подходов к лечению больных раком желудка с учетом функционирования иммунокомпетентных клеток, что является актуальной, социально-значимой проблемой российского здравоохранения.

Цель исследования

Изучить клинико-иммунологические показатели циркулирующих лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль у больных раком желудка и установить их прогностическое значения.

Задачи исследования

1. Изучить линейную структуру популяций CD45⁺ лимфоцитов (Т-клеток с фенотипом CD3⁺CD19⁻, В-клеток с фенотипом CD3⁻CD19⁺ и NK- лимфоцитов с фенотипом CD3⁻CD16⁺56⁺) в периферической крови и опухолевой ткани у больных раком желудка методом проточной цитометрии.

2. Изучить субпопуляционную структуру Т-клеток (CD3+CD4+, CD3+CD8+) и функциональную активность (CD8+Perforin+; CD16+Perforin+) и их цитотоксического потенциала в периферической крови и опухолевой ткани у больных раком желудка методом проточной цитометрии.

3. Оценить минорные субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов (CD4+CD25+CD127-; CD8+CD11b-CD28-) и НКТ-лимфоцитов (CD3+CD16+CD56+) в периферической крови и опухолевой ткани у больных раком желудка методом проточной цитометрии.

4. Оценить субпопуляции Т-хелперов (CD4+) и цитотоксических лимфоцитов (CD8+) у больных раком желудка методом иммуногистохимии.

5. Оценить влияние факторов воспаления (нейтрофильно-лимфоцитарного индекса, тромбоцитарно-лимфоцитарного индекса) на показатели общей выживаемости (ОВ) и выживаемости без прогрессирования (ВБП).

6. Провести анализ прогностической и предиктивной значимости иммуноморфологических вариантов опухоли для показателей общей выживаемости (ОВ) и выживаемости без прогрессирования (ВБП) у больных раком желудка при проведении системной терапии.

Научная новизна

В рамках данной диссертационной работы впервые дано определение 3 основных уровней иммунологических нарушений структуры клеток лимфоидной дифференцировки у больных раком желудка. При проведении сравнительного анализа впервые показано, что структура циркулирующих лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, больных ранними, местно-распространенными и метастатическими формами рака желудка принципиально отличаются. Определены факторы благоприятного и неблагоприятного прогнозов среди показателей системного и локального иммунитета у больных с ранними, местно-распространенными и метастатическими формами рака желудка. Показано, что изменения НКТ-клеток имеют разнонаправленный характер: увеличение в опухолевой ткани и напротив,

снижение в периферической крови больных I-II групп. Выявлено, что у больных с метастатическим раком желудка низкий уровень цитотоксического и перфоринового потенциалов эффекторных CD16 клеток в опухолевой ткани и CD8 T-регуляторных клеток в периферической крови до начала химиотерапии свидетельствует о высоком риске и вероятности прогрессирования до 6 месяцев.

Дана многопараметровая характеристика иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови и опухолевой ткани до и в процессе проведения полихимиотерапии. Определены предикторные и прогностические факторы в отношении показателей выживаемости (ОВ, ВВП) при проведении химиотерапии у больных раком желудка.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные знания о функционировании различных клеток лимфоидной дифференцировки в периферической крови и в опухолевой ткани позволят установить направление генерации иммунных реакций у больных раком желудка на системном и тканевом уровне. Выяснение баланса иммунокомпетентных клеток, контролирующих процессы активации и/или супрессии, в сочетании с клинико-морфологическими данными и их взаимосвязи с показателями выживаемости (ОВ, ВВП) послужит основой для определения прогностических и предиктивных факторов клинического течения заболевания и противоопухолевого контроля болезни. Оценка динамики изменения количественного состава лимфоцитов периферической крови и опухолевой ткани в процессе химиотерапии позволит определить влияние цитотоксических агентов на субпопуляции Т-лимфоцитов.

Методы и методология исследования

В работе использован проспективный клинический материал отделения хирургических методов лечения №6 абдоминальной онкологии, онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтическое) №3 и №1 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

С 2017 по 2018 год в исследование включены 45 больных аденокарциномой желудка, ранее не получавших лечение. В зависимости от стадии заболевания,

больные разделены на две исследуемые группы – I группа (25 больных с I-III ст.), II группа (20 больных с IV ст.). В I группе больные получили хирургическое/комбинированное лечение, во II – химиотерапию, соответственно.

При проведении исследования использованы:

– многопараметровая (четырёхцветная) количественная проточная цитометрия для анализа субпопуляционной структуры циркулирующих лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль больных раком желудка

– иммуногистохимический анализ структуры лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль больных раком желудка

– математические методы анализа и обработки результатов, полученных в ходе проспективного исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Структура линейных популяций CD45+ лимфоцитов (Т-клеток с фенотипом CD3+D19-, В-клеток с фенотипом CD3-CD19+ и НК-лимфоцитов с фенотипом CD3-CD16+56+) периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, больных с ранним, местно-распространенным и метастатическим раком (мРЖ) желудка принципиально отличается. Так, в опухолевой ткани больных мРЖ в сравнении с ранним и местно-распространенным РЖ отмечается увеличение НК-лимфоцитов с фенотипом CD3-CD16+56+TILs 6,9% – 3,2%, ($p=0,019$), тогда как в периферической крови больных I группы – В-клеток с фенотипом CD3-CD19+ составив 1,6% против 1,0%, ($p=0,017$).

2. В зависимости от прогрессирования заболевания определены нарушения в структуре лимфоцитов системного и локального иммунитета. У больных с ранними, местно-распространенными формами рака желудка с прогрессированием отмечено статистически значимое снижение CD3+CD19-TILs (72,70% против 86,25%, $p=0,008$) и увеличение CD3-CD16+CD56+TILs (3,80% против 2,80%, $p=0,033$). Однако, достоверных различий в

субпопуляционной структуре Т-клеток периферической крови между группами не выявлено.

3. По данным иммуногистохимического анализа, у больных ранними и местно-распространенными формами рака желудка стромальная субпопуляция лимфоцитов представлена CD4+sTILs, CD8+sTILs, величиной соотношения CD4+/CD8+ sTILs, тогда как у больных мРЖ инфильтрация представлена интралимфоцитарной субпопуляцией лимфоцитов.

4. Низкий уровень цитотоксического потенциала CD16+ лимфоцитов (CD16ЦТП) и количества CD16+Perforin+ лимфоцитов в опухолевой ткани (13,2% против 55,7%, $p=0,011$; 0,5% против 4,6%, $p=0,030$), CD8 Т-регуляторных клеток с фенотипом CD8+CD11b-CD28- в периферической крови (5,1% против 12,1%, $p=0,019$) до начала химиотерапии у больных мРЖ ассоциирован с высоким риском и вероятностью прогрессирования до 6 месяцев.

5. После 3-4 курсов химиотерапии у больных мРЖ в опухолевой ткани отмечалось повышение содержания цитотоксического потенциала CD16+клеток и цитотоксических лимфоцитов с фенотипом CD3+CD8+TILs составив 55,7% против 64,7%, $p=0,012$ и 3,1% против 5,4%, $p=0,009$ соответственно.

6. Вероятность достичь длительную ВБП (более 9 месяцев) у больных мРЖ увеличивалась при снижении числа Т-клеток (22,0% против -9,7%, $p=0,012$), НКТ-клеток (207,9% против -13,8%, $p=0,002$) и CD4 Т-регуляторных клеток (190,7% против -25,2%, $p=0,002$) в опухолевой ткани и увеличении эффекторных CD16-клеток (-69,5% против 9,1%, $p=0,013$) в периферической крови.

7. Низкий уровень CD3+CD8+TILs (16,40% против 32,35%, $p=0,010$) и CD8+CD11b-CD28-TILs (25,40% против 54,70%, $p=0,013$) до начала лечения увеличивают вероятность умереть у больных ранними и местно-распространенными формами рака желудка. При мРЖ вероятность умереть повышается при низком уровне CD3+CD19- Т-клеток (65,55% против 78,60%, $p=0,044$) в периферической крови и повышенном содержании CD3+CD16+CD56+TILs (13,80% против 7,65%, $p=0,072$) в опухолевой ткани.

8. При комплексной оценке показателей системного клеточного иммунитета, факторов воспаления, клинических признаков и показателей локального иммунитета, определенных методом проточной цитометрии и иммуногистохимии у больных раком желудка выявлено, что увеличение уровня CD3-CD16+CD56+TILs ухудшает ВБП у больных с ранними, местно-распространенными формами рака желудка и ОБ у больных с метастатическим раком желудка (HR=1,382; 95% ДИ 1,087-1,758, p=0,08). Увеличение содержания CD3+CD19-TILs является благоприятным фактором прогноза для ВБП у больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ (HR=0,865; 95% ДИ 0,782-0,957, p=0,05). Напротив, увеличение соотношения CD4+/CD8+iTILs является фактором неблагоприятного исхода для ВБП у больных ранним и местно-распространенным РЖ (HR=3,264; 95% ДИ 1,09-9,78, p=0,035). В то же время, для больных мРЖ факторами неблагоприятного прогноза для ОБ являются увеличение уровня нейтрофилов в периферической крови (HR=1,64; 95% ДИ 1,12-2,40, p=0,011), а также увеличение инфильтрации опухолевой ткани НК-клетками (CD3-CD16+CD56+TILs) (HR=1,42; 95% ДИ 1,06-1,89, p=0,017). Для ВБП больных мРЖ статистически значимыми являются возраст, уровень нейтрофилов и тромбоцитов.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$, что соответствует 95% точности результатов. Для проверки статистической значимости использовали статистические методы с учетом вида распределения сравниваемых параметров.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Злокачественные новообразования желудка являются наиболее распространенными опухолями, занимая шестое место по распространенности (1 033 701 случаев; 5,7%) и третьей ведущей причиной смерти от рака как у мужчин, так у женщин во всем мире (782 685 смертей, 8,2%) [40]. В России в 2016 году рак желудка занимал 5 (7,8%) и 8 (4,8%) место среди мужчин и женщин соответственно [10].

Будучи гетерогенным заболеванием и конечной точкой длительного и многоэтапного процесса, РЖ возникает в результате постепенного накопления многочисленных (эпи) генетических изменений, приводящих к нарушению регуляции онкогенных и опухолевых супрессорных путей [128]. Недавние открытия молекулярного анализа подтвердили данную неоднородность и привели к появлению нескольких схем молекулярной классификации рака желудка [42; 52; 107; 159]. К примеру, определение с использованием гибридизации *in situ* (ISH) и иммуногистохимии (ИHC) мутации HER2-neu в сочетании с клинико-патологическими данными о размере опухоли, степени злокачественности (G), микросателлитной нестабильности (MSI), а также тип опухоли согласно классификации Lauren являются широкодоступными методами в повседневной диагностической практике. Как сообщается в метаанализе, MSI-H (высокий уровень микросателлитной нестабильности) у пациентов РЖ продемонстрировал снижение риска смерти на 37% и пролонгированную ОБ в сравнении с отсутствием микросателлитной нестабильности (MSS) [185]. В зависимости от классификации Lauren, диффузный тип опухоли чаще встречается в молодом возрасте и, в отличие от кишечного типа, отличается худшим прогнозом, что может быть связано с более злокачественным потенциалом опухолевых клеток, быстрым течением, ранним метастазированием и плохой выявляемостью на ранних стадиях [1]. Однако не вызывает сомнений тот факт, что неудовлетворительные результаты лечения рака желудка в значительной степени связаны с его поздней диагностикой [7]. Например, в России более чем у 70%

заболевших РЖ, где абсолютное большинство имеют местно-распространенные и диссеминированные формы заболевания, [8; 14] показатели 5-летней выживаемости в 2005 году после радикальных вмешательств в большинстве клиник не превышали 36,0% [19; 21; 22]. По данным Yazıcı O., Sendur M.A. et al., 5-летняя общая выживаемость РЖ в мире в 2016 году по-прежнему составляет не более 20-30% [176]. При этом при местнораспространенных опухолях примерно в 50% случаев после адьювантного лечения наблюдается местный / системный рецидив, где 5-летняя ОВ достигается только в 10-15% случаев [163]. При метастатическом процессе паллиативная химиотерапия дает незначительный выигрыш с медианой ОВ приблизительно 8-10 месяцев [134]. Современная хирургическая стратегия по отношению к РЖ включает выполнение радикальной операции с применением комбинированных резекций и расширенных лимфодиссекций (ЛД) [15; 22; 121]. Основными принципами оперативного лечения РЖ являются: максимальная безопасность вмешательства, онкологическая адекватность и высокая функциональность [7]. Радикальная резекция опухоли (R0-резекция) служит главным фактором в сокращении локальных рецидивов РЖ, но эта цель может быть достигнута только при условии безопасного, с онкологической точки зрения, уровня резекции, резекции «en block» и радикальной ЛД [16]. Результаты многолетних попыток воздействовать на предположительно существующие даже на ранних стадиях имплантационные или гематогенные метастазы с помощью адьювантной, неоадьювантной, регионарной, внутриволостной химиотерапии довольно скромные. Поэтому понятны стремления ученых, изучающих РЖ, найти «ключ» к пониманию возможностей патогенетической регуляции процессов роста и дифференцировки злокачественной клетки [15].

На сегодняшний день с целью оптимизации методов лечения широко развиваются исследования, направленные на более детальное изучение биологии рака желудка. Злокачественная опухоль является динамической системой, которую целесообразно рассматривать в комплексе со всеми клиническими и морфологическими составляющими, как формирующими ее микроокружение

(клетки стромы, клетки системы иммунитета, кровеносные, лимфатические сосуды и экстрацеллюлярный матрикс), так и определяющими общую реакцию организма пациента на развивающийся опухолевый процесс [28]. В частности, механизмы, лежащие в основе динамического взаимодействия между иммунными клетками и прогрессированием опухоли, изучаются на протяжении нескольких десятилетий. В процессе ускользания опухоли от иммунологического надзора, функции Т-клеток нарушаются и происходит истощение Т-клеточного пула [89]. Они играют важную роль в таких опухолевых процессах, как меланома [35], рак почки [182], рак легкого [87], колоректальный рак [156], рак молочной железы [84] и рак яичников [181]. В случае инфильтрации опухоли, например, Т-клетками, В-клетками, естественными клетками-киллерами, макрофагами и дендритными клетками, опухоли считаются иммунологически чувствительными [145]. В тоже время, TILs отвечают за рост и прогрессирование онкологического процесса, а также ответ на лечение комбинированными методами лечения, такими как химиотерапия и лучевая терапия. Тем не менее, результаты многочисленных исследований по злокачественным новообразованиям молочной железы, пищевода и легкого все еще противоречивы [83; 97; 130], что подтверждает актуальность определения прогностической роли TILs и различных субпопуляций Т-клеток при раке желудка.

CD8⁺ Т-лимфоциты являются основными клетками-эффекторами противоопухолевого иммунитета [127]. Популяция CD8⁺CD28⁺ Т-клеток [157], участвует в уничтожении опухолевых клеток [104]. В тоже время, активация CD8⁺ Т-клеток приводит к снижению экспрессии CD28 [61], представляя собой отличную от общей популяции популяцию CD8⁺CD28⁻ клеток. В корейском исследовании отмечено, что присутствие CD8⁺CD28⁻ в периферической крови раннее не леченых пациентов РЖ было выше у пациентов с вовлеченностью регионарных лимфатических узлов и размерами опухоли более 5 см ($27,08 \pm 1,60\%$ против $10,86 \pm 0,75\%$). Эти данные могут отражать возможность иммуносупрессии, вызванной опухолью, но их следует дополнить дальнейшими исследованиями [154]. Согласно исследованию Kyung-Ju Kim и его коллег рак желудка с MSI-H

имеет лучший прогноз с повышенным содержанием TILs в сравнении с MSS статусом. При этом низкая плотность TILs у MSI-H рака желудка тесно связана с III-IV стадиями по TNM-классификации, ($p=0,040$), глубиной инвазии ($p=0,044$) и более частыми лимфатическими и сосудистыми инвазиями ($p=0,033$ и $0,015$ соответственно). Более того, авторы обнаружили прямую зависимость между величиной снижения числа CD8+CD28- T-клеток и стадией заболевания и обратную с продолжительностью жизни пациентов [171].

Клетки РЖ, как и другие клетки, имеют кластер дифференцировки антигенов-CD, который характеризует реакцию иммунной системы на эти клетки. Так, например, недавний малазийский обзор исследований по раку желудка показал, что CD5, CD40, CD71 и CD39 были активированы более чем в два раза в клетках РЖ от шести пациентов по сравнению с нормальной слизистой, тогда как CD279 был активирован в нормальных клетках слизистой оболочки желудка, взятых у этих пациентов на расстоянии не менее 10 см от места опухоли [109]. Соответственно, что различные субпопуляции CD8+T-лимфоцитов вне зависимости от расположения первичной опухоли вовлекаются в иммунный ответ, но данных об их соотношении между собой не имеется. В структуре TILs помимо клеток эффекторного звена также присутствуют и T-регуляторные клетки, ингибирующие их функцию [118; 147]. Например, при раке анального канала прогностической значимости Tregs не выявлено [71]. При фолликулярной и В-клеточной лимфомах, Tregs ассоциируется с благоприятным прогнозом ($p<0,053$, $p<0,051$) [161]. Что касается рака желудка, Kono et al. отметили более высокий процент CD4+Tregs в крови у пациентов РЖ в сравнении со здоровой контрольной группой ($4,9\pm 1,2\%$ vs $1,9\pm 1,1\%$, $p<0,01$). Существенные различия также отмечены между ранней и поздней стадиями заболевания (стадия I против III, $p<0,05$; стадия I против IV, $p<0,05$). При этом, будучи фактором неблагоприятного прогноза содержание CD4+Tregs после хирургического вмешательства даже в объеме паллиативной резекции, уменьшается до нормального значения, как в контрольной группе [101].

В 2017 году Yuan и соавт. одними из первых опубликовывают результаты исследования ткани рака желудка методом проточной цитометрии, где относительно всех клеток отмечается повышенное количество CD4+T-клеток (51,3%) и более низкое число – CD8+T-клеток (38,4%) с повышением соотношения CD4+/CD8+ в ткани по сравнению с кровью и, более того, со здоровой тканью (опухоль vs. кровь, $p < 0,0341$; опухоль vs. здоровая ткань, $p < 0,0001$) [177]. Более того, опухоль ускользает от атаки иммунной системы посредством различных регуляторных молекул и клеток, из которых CD4+ Tregs является наиболее изученным отрицательным регулятором [87].

По мнению ряда авторов [48], CD4+CD25+CD127- являются наиболее специфичными маркерами для определения популяции Tregs [177]. Стоит отметить, что увеличение концентрации Tregs в опухолевой ткани не обуславливает их повышенное содержание в периферической крови. К примеру, исследование Yuan L., Xu B. подтвердило, что процент CD4+T-клеток среди CD3+ клеток в опухолях был значительно выше, чем в здоровой ткани и крови (опухоль vs. кровь, $p = 0,0341$; опухоль vs. здоровая ткань, $p < 0,0001$), а соотношение CD4+/CD8+ было значительно выше в периферической крови чем в здоровой ткани (0,94 против 0,53, $p < 0,0001$) [177]. Соответственно, при оценке статуса T-регуляторного звена следует учитывать состав и расположение иммунного инфильтрата. Ведь механизмы, лежащие в основе дисфункции T-клеток, являются точками приложения в лечении злокачественных новообразований. Последней из работ данной серии является метаанализ с включением 2941 пациента в период между 2000 и 2016 годами и размерами выборок от 52 до 220 пациентов (медиана: 122) Хотя все исследования были нерандомизированными и ретроспективными, четко прослеживается закономерность, что экспрессия пан-T-клеточного антигена CD3+ TILs коррелирует с общей выживаемостью (HR=0,64; 95% ДИ 0,52-0,78, $p = 0,71$). При этом при подгрупповом анализе выявлено влияние CD4+ и CD8+T-клеток на ОВ (HR=0,70; 95% ДИ 0,55-0,90; HR=0,63, 95% ДИ 0,48-0,83), что согласуется с вышеупомянутыми исследованиями, где отмечалось повышение CD4+ и CD8+T-

клеток у больных РЖ в сравнении с контрольной группой. Помимо этого, анализ семи исследований выявил, что увеличение инфильтрации TILs коррелирует с увеличением безрецидивной выживаемости (HR=0,59; 95% ДИ 0,42-0,81). Соответственно, высокая содержание TILs с преобладанием CD8+ лимфоцитов, может быть потенциальным прогностическим биомаркером у пациентов раком желудка [106].

Взаимосвязь субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток с прогнозом и ОВ заставила ученых искать и другие признаки, позволяющие оценивать поведение опухоли уже в процессе лечения.

Естественные киллеры (NK-клетки) представляют собой клетки врожденного иммунитета [45]. Ряд наблюдений показывают, что между количеством NK-клеток и прогрессированием РЖ существует обратно пропорциональная взаимосвязь. Так, при РЖ по мере прогрессирования заболевания, количество и функция NK-клеток резко уменьшаются, и наоборот. Помимо этого, выявлены изменения числа NK-клеток в зависимости от стадии и распространенности опухолевого процесса. Gulubova et al. выяснили, что количество NK-клеток у больных раком желудка и колоректального рака с метастазами в печени значительно ниже по сравнению с пациентами без метастазов в печени ($10,1 \pm 11,6\%$ против $16,6 \pm 8,9\%$, $p=0,039$) [73]. Интересно, что у больных РЖ после гастрэктомии содержание NK-клеток в крови, значительно возрастает в отличие от CD4-клеток [165]. Однако, в литературе не представлено данных об изменении содержания CD4-клеток в процессе химиотерапии (ХТ) и будучи многообещающей перспективой, в качестве мишени для вакцин и различных иммунных препаратов при онкологических заболеваниях, включая NK-клетки заслуживают прицельного изучения, особенно в расширенной панели цитотоксических клеток, как в данной научной работе.

NKT-клетки, обеспечивая связь между врожденным и адаптивным звеньями иммунитета [142]. И даже с учетом сильной гетерогенности группы CD3+CD56+NKT-клеток, при исследовании более 60 образцов ткани пациентов РЖ методом проточной цитометрии, Liu-sheng Peng et al. выявили, что содержание

CD3+CD16+CD56+ NKT-клеток в опухолевой ткани значительно ниже в сравнении со здоровой (4,44% (0,52-18,10%) против 7,20% (0,23-26,50%), $p < 0,01$). Кроме того, низкое содержание CD3+CD16+CD56+ NKT-клеток положительно коррелирует с низкой ОБ пациентов [140]. Таким образом, роль NKT-клеток при онкологических заболеваниях не однозначна [100]. С учетом того, что NKT-клетки участвуют не только в защите от опухолевого роста, но и в подавлении противоопухолевого иммунного ответа, исследование факторов микроокружения, определяющих направление влияния данных клеток на опухолевый рост актуально.

Таким образом, анализ данных литературы выявил разнонаправленные мнения о роли локального иммунитета и периферических иммунокомпетентных клеток в патогенезе рака желудка.

1.1 Иммунокомпетентные клетки в периферической крови при раке желудка

Считается, что Т-лимфоциты представляют основную популяцию иммунных клеток, среди которых CD3+CD4+ Т-клетки и CD3+CD8+ Т-клетки, которые включают в свой состав иммунные клетки, отвечающие за подавление опухолевого роста [178]. Ряд исследований показал значительную корреляцию между CD8+ Т-клетками и высокой частотой показателей ответа и выживаемости у пациентов с онкологическими заболеваниями [70; 103]. Напротив, регуляторные Т-клетки, определяемые как CD4+CD25+ Т-клетки преимущественно подавляют активность CD3+CD8+Т-клеток, тем самым коррелируя с неблагоприятным прогнозом [143; 155]. У пациентов раком желудочно-кишечного тракта, раком молочной железы, раком поджелудочной железы, гепатоцеллюлярным раком и т.д. отмечается повышение уровня Tregs как в микроокружении опухоли, так и в периферической крови [43; 110; 135].

В одном из недавних исследований, опубликованном в 2016 году [80], ученые исследовали потенциальный иммуномодулирующий эффект неоадьювантной химиотерапии на популяцию иммунных клеток, включая CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ и CD4+CD25+ в периферической крови у пациентов с местно-распространенным раком желудка. Оценка иммунокомпетентных клеток

производилась методом проточной цитометрии у 105 пациентов до начала лечения ХТ по схеме FLEEOX (5-фторурацил/лейковорин/этопозид/оксалиплатин/эпирубицин) и через неделю после завершения последнего курса ХТ. По завершению двух циклов неoadъювантной химиотерапии частота объективных ответов (ЧОО) составила 78,1%, включая 7 случаев CR (полный ответ), 75 случаев PR (частичный ответ), 11 случаев (10,5%) SD (стабилизация) и 12 случаев (11,4%) PD (прогрессирование заболевания). Смертельных случаев, связанных с лечением, не было. Данные проточной цитометрии для 105 пациентов до и после химиотерапии суммированы в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели системного иммунитета до/после химиотерапии

Показатели	До химиотерапии	После химиотерапии	p
CD3+Т-клетки (%)			
Среднее значение	55,55±12,48	54,94±13,56	0,295
95%ДИ	53,03-58,26	49,71-55,42	
Медиана	55,55	54,94	
CD4+Т-клетки (%)			
Среднее значение	33,09±9,15	35,50±10,13	0,851
95%ДИ	31,17-35,00	33,38-37,63	
Медиана	34,04	37,14	
CD8+Т-клетки (%)			
Среднее значение	22,56±8,28	24,67±9,07	0,003
95%ДИ	20,82-24,29	22,7-26,57	
Медиана	21,74	24,35	
Foxp3+Т-клетки (%)			
Среднее значение	8,32±3,92	5,81±2,54	<0,001
95%ДИ	6,03-10,23	4,68-7,37	
Медиана	8,56	5,92	

Доля CD3+CD8+ Т-клеток увеличена до и после химиотерапии (до химиотерапии $22,56 \pm 8,28\%$, после химиотерапии – $24,67 \pm 9,07\%$; $p=0,003$). Доля CD3+CD4+ и CD4+CD25+ Т-клеток снизилась (до химиотерапии $8,32 \pm 3,92\%$, после химиотерапии $5,81 \pm 2,54\%$; $p < 0,01$). Число CD3+ Т-клеток и CD3+CD4+ Т-клетки существенно не изменились после химиотерапии ($p=0,295$ и $p=0,851$, соответственно). При медиане наблюдения 15,0 месяцев (диапазон 5-84 месяца), 3-летняя ОВ составила 31,7%. В однофакторном анализе, пациенты с высоким уровнем CD3+CD8+ по сравнению с больными с низким содержанием CD3+CD8+ имели высокую ОВ (медиана выживаемости 22 против 13,5 месяцев; $p=0,006$). Точно так же, низкий уровень CD4+CD25+ коррелировал с улучшением показателей ОВ (высокий CD4+CD25+ против низкого CD4+CD25+: медиана выживаемости 15 против 22 месяцев; $p=0,048$). Между тем, ни CD3+, ни CD3+CD4+ не были в значительной степени связаны с ОВ. Данная работа является первым наблюдением за ответом опухоли на проведение химиотерапии и изменениями Т-клеток в периферической крови.

Теоретически, транзиторная лимфопения, индуцированная химиотерапией может стимулировать выработку большего количества опухолеспецифических Т-клеток, тем самым устраняя ингибирование регуляторных Т-клеток, которые приводят к увеличению гомеостаза и активности CD3+CD8+ Т-клеток [186; 187]. Также известно, что количество Tregs после химиотерапии имеет тенденцию к снижению [180], а результаты вышеописанного исследования подтверждают гипотезу, что ответ на химиотерапию частично иммуно-опосредован и подавлен присутствием Tregs.

Немного ранее в 2002 году, бразильское исследование по оценке Т-лимфоцитов у пациентов РЖ до и после операции в сравнении с контрольной группой выявило следующие закономерности [31]. Среди 41 пациента с местно-распространенным РЖ (20 больным выполнена расширенная радикальная гастрэктомия, лимфодиссекция D2, и 21 больным проведено паллиативное лечение) и 20 человек из контрольной группы, с помощью метода проточной цитометрии после гейтирования популяций лимфоцитов между группами не было

зафиксировано значительной разницы в количестве лейкоцитов. Однако, при увеличении числа лейкоцитов после операции и отсутствии изменений в количестве CD4+ Т-лимфоцитов, число CD8+Т-клеток после операции снижалось (в абсолютном количестве и в процентах) ($p < 0,05$) (Таблица 2).

Таблица 2 – Субпопуляции Т-лимфоцитов в клетках периферической крови пациентов раком желудка до и после хирургического лечения, и у пациентов с воспалительным процессом

Показатели	Контрольная группа (n=20)	Пред-операционные больные (n=20)	Пост-операционные больные (n=20)	Больные с воспалительным процессом (n=21)
Лейкоциты (10^3)	6,7±1,9	6,03±1,7	6,5±2,1	6,8±3,1
%Лимфоциты	34,3±8,3	29,9±5,46	30,5±9,23	29,0±11,8
%CD3	27,8±7,9	25,3±8,9	24,8±8,5	27,9±12,0
%CD4	41,6±8,2	43,6±8,9	43,1±8,2	39,5±10,3
%CD8	33,2±7,6	27,2±5,8*	27,3±7,3*	30,9±7,5
CD4/CD8	1,28±0,54	1,69±0,63	1,75±0,76	1,52±0,91

Т-клеточные субпопуляции измерялись с помощью МКА и методом проточной цитометрии до хирургического вмешательства и через 20 дней после лечения. * $p < 0,05$ в сравнении с здоровой (контрольной) группой и группой больных с воспалительным процессом (тест Стьюдента).

Процент CD8+ был значительно ниже как у предоперационных, так и послеоперационных пациентов, что указывает на значительный дефицит клеточного иммунитета, тогда как процент CD4+ был сопоставим с таковым в контрольной группе и у пациентов с воспалительным процессом.

Определение маркеров НКТ-клеток, количественные изменения которых коррелируют с неблагоприятным течением заболевания также могут иметь прогностическое значение при лечении злокачественных новообразований. В исследовании L. Peng [140] методом проточной цитометрии проанализировал присутствие CD3+CD56+НКТ-клеток в периферической крови пациентов с РЖ (n=63) и здоровых людей (n=30). В результате выявлено, что различия в содержании CD3+CD56+НКТ-клеток между контрольной группой и больными

РЖ статистически не значимы (5,17% (0,37-23,01%) против 5,55% (1,22-12,04%), $p > 0,05$) (Рисунок 1).

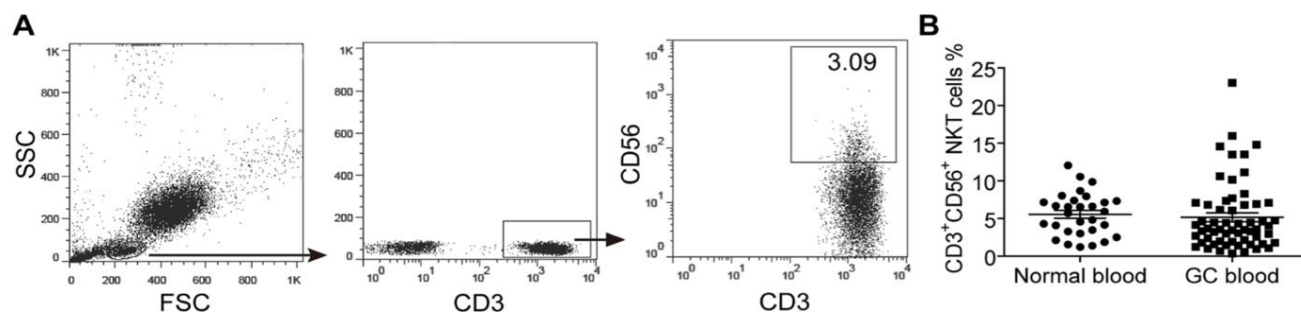


Рисунок 1 – Репрезентативный анализ проточной цитометрии CD3+CD56+NKT-клеток в периферической крови больных РЖ и здоровой группы после гейтирования CD3+ T-клеток

Соответственно, определение прогностического значения CD3+CD56+NKT-клеток в крови совместно с иммунными клетками при раке желудка требует дальнейшего изучения.

1.2 Факторы воспаления в периферической крови при раке желудка

Анализ литературы последних лет показал несомненную прогностическую ценность системных воспалительных индексов, основанных на подсчете соотношений нейтрофилов, лимфоцитов и тромбоцитов в периферической крови пациентов с колоректальным раком [123], раком желудка [74; 116] и гепатоцеллюлярным раком [82], что позволяет использовать эти показатели в клинической практике на этапе планирования комплексного лечения пациентов со злокачественными новообразованиями, а также максимально рано выявлять признаки рецидива заболевания.

Таким образом, за последние 20-30 лет достигнуты большие успехи в терапии РЖ. Важным этапом в разработке новых терапевтических агентов стало понимание роли прогностических и предиктивных факторов, включая значение субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток и биологии опухоли. Несмотря на то, что клинические факторы прогноза для РЖ изучаются уже

достаточно долго, механизмы блокирования противоопухолевых иммуносупрессивных путей и пути стимулирования локального иммунного ответа остаются не до конца изученными.

Становится очевидным, что время, когда главенствующую роль в тактике лечения пациента имели клинические характеристики опухоли остается в прошлом. В последние годы активно изучается роль различных молекулярно-генетических факторов, позволяющих лучше понимать «поведение» опухоли. Результаты оценки прогностической значимости многих иммунокомпетентных критериев при РЖ достаточно противоречивы. Недавно выявленная ассоциация между РЖ и экспрессией субпопуляций иммунокомпетентных клеток – CD8+, CD4+, NK, NKT в ткани представляет большой интерес для изучения этого вопроса и с точки зрения клинициста. Понимание значения роли и корреляции показателей местного и системного иммунного ответа в развитии РЖ, в конечном счете, должно привести к улучшению результатов лечения этой патологии. Ведь на успех лечения и прогноз заболевания влияет ряд не только клинических, но и морфологических факторов.

1.3 Иммунокомпетентные клетки в опухолевой ткани при раке желудка

Поскольку иммунной системе и клеткам, инфильтрирующим опухоль, отводится ключевая роль в формировании противоопухолевого иммунитета, они являются объектом активного изучения [2; 49; 158]. Многообразие субпопуляций иммунных клеток, а также основных продуктов их синтеза и путей совместного взаимодействия, может объяснить их возможное диаметрально противоположное действие: от активации путей противоопухолевой защиты до потенцирования прогрессирования заболевания. Кроме того, в литературе встречаются данные, свидетельствующие о том, что хроническое воспаление является риском развития опухоли и ее прогрессирования [2]. На сегодняшний день, во взаимосвязи между иммунокомпетентными клетками локального иммунитета человека и возникновением и прогрессированием онкологических заболеваний, опухоль инфильтрирующие лимфоциты, по-видимому, приобретают способность к

двунаправленной регуляции. Ускользание от иммунологического надзора является фундаментальной причиной в развитии злокачественных новообразований. Существует все больше доказательств того, что CD4+CD25+ регуляторные Т-клетки способны вызывать толерантность к аутоантигенам и также могут ингибировать противоопухолевый иммунный ответ. Tregs также могут ингибировать эффекторные Т-клетки, подавляя антигенпрезентирующую функцию и продвигая иммуносупрессивную функцию дендритных клеток, моноцитов и макрофагов [118; 147]. Взаимодействие опухолевых неоантигенов, захваченных дендритными клетками на молекулах главного комплекса гистосовместимости (МНС), с Т-клетками приводит к активации эффекторных Т-клеток с последующей инфильтрацией опухоли и разрушением опухолевых клеток. Кроме того, эти активированные клетки секретируют ингибирующие цитокины с усилением противоопухолевого эффекта [44; 90]. С другой стороны, TILs могут способствовать пролиферации опухолевых клеток, создавая соответствующую среду для роста опухоли или предотвращая опухолевые клетки от разрушения [152].

TILs стромы представляют собой мононуклеарные воспалительные клетки, инфильтрирующие опухолевую строму, тогда как внутриопухолевые TILs представлены интраэпителиальными лимфоцитами / мононуклеарными клетками в опухоли. Анализ ряда зарубежных исследований показал, что стромальные TILs являются прогностическим фактором выживаемости без прогрессирования у пациентов раком желудка. Например, по данным Kang B.W. среди 120 пациентов РЖ (II, III стадии), 73 пациента (60,8%) и 60 пациентов (50,0%) были определены как sTILs+ (стромальные) и iTILs+ (перитуморальные), соответственно. В однофакторном анализе показатель sTILs+ статистически значимо ассоциировался с более длительной безрецидивной выживаемостью ($p=0,008$), но не с общей выживаемостью ($p=0,145$). В то время как iTILs встречаются у пациентов с более благоприятными показателями БРВ и ОВ, статистически значимых различий не отмечено (БРВ, $p=0,151$; ОВ, $p=0,191$). В многопараметровом анализе клинико-патоморфологических признаков (возраст,

стадия pTNM, лимфатическая инвазия, периневральная инвазия и венозная инвазия; гистологический подтип, классификация Lauren) и sTILs были независимо связаны с благоприятной БРВ (HR=4,836; 95% ДИ 0,917-25,525, p=0,063) [91]. Однако, наличие различных подмножеств клеток, возможно, по-разному влияет на прогноз пациента. По результатам нескольких исследований выявлено, что высокая плотность стромальных TILs все же связана с благоприятным прогнозом (HR=0,55) [51; 59; 86]. Кроме того, согласно имеющимся данным, повышенное количество CD8+ Т-клеток, локализованных как внутри, так и вне опухоли, связано с улучшением показателей ВВП и ОВ [47; 76; 86; 111]. Помимо понимания значения количества тех или иных клеток и их плотности, важно иметь четкое представление о расположении иммунных клеток; в внутриопухолевой или перитуморальной строме. Чтобы улучшить понимание «сложной» роли иммунных клеток при РЖ, необходимы дальнейшие исследования по их изучению как методом многопараметровой проточной цитометрии, так и иммуногистохимическим методом, как выполняется в большинстве случаев. Проточная цитометрия является высокотехнологичным методом быстрого измерения характеристик клеток и основывается на флюоресцентных методах анализа иммунокомпетентных клеток и их антигенов. Гарантируя статистическую значимость результатов, данный метод обладает высокой чувствительностью, высоким уровнем автоматизации и простотой эксплуатации [4]. Недавние исследования выявили несколько типов TILs, таких как CD3+Т-клетки, CD8+Т-клетки, регуляторные Т-клетки (Tregs), клетки-киллеры (NK-клетки), связанных с различными исходами заболевания при онкологических заболеваниях [66; 117; 137; 164]. Впервые CD8 Т-супрессоры были описаны Gershon R.K. и Kondo K. [67]. В дальнейшем супрессорная активность CD8+ Т-клеток была продемонстрирована при различных аутоиммунных заболеваниях экспериментальных животных и человека [31]. Описано несколько субпопуляций CD8 TILs. Они включают CD8+CD28-, CD8+CD25+, CD8+CD122+ Т-клетки [114]. Однако в настоящее время не ясно, идентичные ли они по функции или это разные популяции. Особый интерес

представляют CD8+CD28-Т-клетки, не экспрессирующие основной костимуляторный рецептор CD28+, который необходим для полноценной активации наивных Т-лимфоцитов. В экспериментальных исследованиях Najafian и соавт. показали, что адаптивный перенос CD8+CD28-, но не CD8+CD28+Т-клеток подавлял аутоиммунный процесс у CD8-дефицитных мышей [133]. CD8+CD28-Т-клетки являются гетерогенной популяцией и включают в себя как клетки-супрессоры, так и клетки-эффекторы. Это подтверждается продукцией ими и супрессорных (IL-10, IL-4, TGF- β) и эффекторных (IFN- γ , TNF- α) цитокинов. Однако во многих экспериментальных и клинических исследованиях, эта популяция характеризуется в основном как супрессорная [92; 124; 162]. Filaci и соавт. исследовали опухолевые ткани, лимфоузлы и периферическую кровь больных различными злокачественными новообразованиями (рак толстой кишки, желудка, легких, поджелудочной железы, почки, яичников, щитовидной железы, молочной железы, простаты и другие). CD8+CD28-Т-клетки были обнаружены во всех доступных образцах опухолевой ткани. Количество этих клеток было значительно выше, чем CD8+CD28+лимфоцитов. Полученные из лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, CD8+CD28-, но не CD8+CD28+ Т-клетки проявляли IL-10-зависимое подавление пролиферативной и цитотоксической активности Т-клеток. CD8+CD28-Т-клетки, полученные из метастатических, но не из интактных регионарных лимфоузлов, также обладали супрессорной активностью. Авторы показали также, что только у онкологических больных CD8+CD28- Т-клетки в периферической крови проявляли супрессорную активность, в отличие от CD8+CD28+Т-клеток здоровых доноров, которые супрессорной активностью не обладали. Инфильтрация CD8+ Т-клетками, а также CD3+ Т-клетками [66; 111] в опухоли является благоприятными прогностическими факторами при многих онкологических заболеваниях, включая РЖ [95]. Также отмечено, что у пациентов РЖ с высокой плотностью CD8+ Т-клеток отмечается более длительная общая выживаемость нежели у больных с низкой плотностью CD8+TILs ($p=0,017$ и $0,013$ соответственно, тест Каплана-Мейера). В многофакторном анализе выживаемости, высокая плотность TILs связана с улучшением общей

выживаемости (HR=0,269; p=0,027), при этом CD8+TILs являются независимым прогностическим фактором (p=0,003). Данные результаты подтверждают, что высокая плотность CD8+TILs коррелирует с благоприятным прогнозом, что может быть использовано в качестве независимого прогностического фактора у больных РЖ с MSI-H статусом. Несмотря на сведения о корреляции иммунных клеток и показателей выживаемости, определенных методом проточной цитометрии, данных об их пространственном расположении не имеется. Так, например, Keren et al. при анализе трижды-негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) с помощью мультиплексной ионно-лучевой визуализации разработали подход для оценки пространственного расположения клеточных типов в опухолевой ткани. Они обнаружили, что опухоли с одинаковой степенью инфильтрации иммунными клетками пространственно располагались по-разному. Тем самым, разделили опухоли на «Cold» (без инфильтрации), «Mixed» (иммунные клетки, смешанные с опухолевыми клетками) и «Compartmentalized» (иммунные клетки, пространственно отделенные от опухолевых клеток) (Рисунок 2) [93].

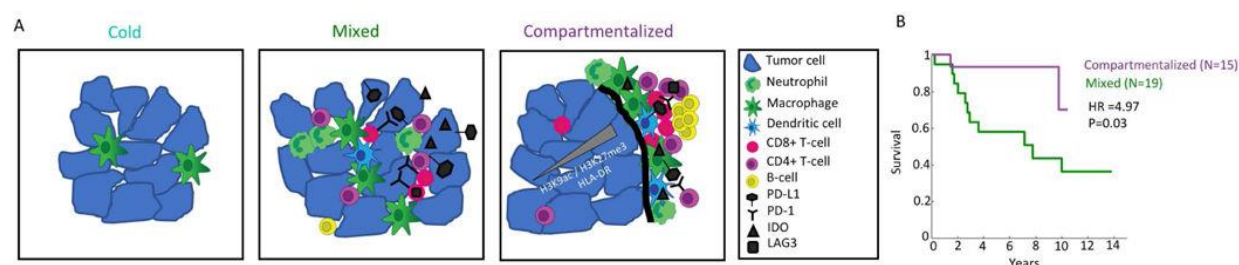


Рисунок 2 – Модели опухолево-иммунного смешивания и иммуно-регуляторной экспрессии относительно ОВ. А – Три архетипа опухолевой иммунной композиции и организации при ТН РМЖ. «Cold» опухоли – малое число иммунных клеток, в основном, макрофаги. «Mixed» опухоли состоят из опухоли и иммунных клеток, смешанных вместе. В «Compartmentalized» опухолях иммунные и опухолевые клетки пространственно разделены. Нейтрофилы обогащены вблизи границы, тогда как В-клетки образуют вторичные лимфоидные структуры еще дальше. В – Кривые Каплана-Мейера, показывающие выживаемость в зависимости от времени для пациентов с «compartmentalized» или «Mixed» опухолево-иммунными организациями.

Соответственно, из графика следует, что «compartmentalized» опухоли имеют лучший прогноз для общей выживаемости по сравнению с «Mixed» опухолями, (HR=4,97, p=0,03) [93]. Таким образом, подмножества иммунокомпетентных клеток приводят к различному течению заболеваний у онкологических больных. Их функции зависят от местоположения, категории, взаимодействия между клетками и так далее. Необходимы дополнительные исследования для изучения взаимосвязи между клеточным иммунитетом и раком желудка, в частности влиянием локализации и взаимоотношений между клетками.

Огромным вкладом в понимание сложной системы взаимодействия опухоли и иммунитета стало открытие в конце прошлого века целого ряда минорных популяций иммунокомпетентных клеток. Согласно сложившимся к настоящему времени представлениям, основная функциональная роль Tregs состоит в регуляции толерантности к антигенам нормальных собственных тканей, что обеспечивает защиту организма от развития аутоиммунных и воспалительных процессов [34; 98; 105; 153]. Однако именно такой характер физиологической регуляции, как полагают, и является одной из основных причин возможного стимулирующего влияния Tregs клеток на рост опухоли в результате уклонения ее от влияния иммунной системы, приводящего к развитию так называемой Tregs-опосредованной толерантности [25; 149].

Прогностическая значимость регуляторных Т-клеток представляется неоднозначной, что объясняет необходимость более прицельного изучения данных иммунологических параметров [53; 126]. В отношении рака желудка сообщалось, что сочетание большого количества внутриопухолевых Tregs связано с улучшением выживаемости. Однако другие показали, что Tregs играли роль индукторов иммуносупрессии и прогрессирования опухоли у пациентов раком желудка и пищевода, что привело к ухудшению прогноза [85]. Внутриопухолевое высокое соотношение Tregs/CD8+Т-клеток было независимым предиктором для худшего прогноза рака желудка. Однако CD4+ и CD8+TILs не были связаны с общей выживаемостью [155]. Анализ Mizukami et al. при ИГХ-исследовании 80 образцов ткани ранее не леченых пациентов РЖ (I – 42; II, III – 27; IV – 11) не

обнаружил влияния количества Tregs на выживаемость, но показал, что диффузное распространение Tregs представлено на поздних стадиях, что связано с низкой выживаемостью, а накопления Tregs в перитуморальном пространстве коррелирует с более благоприятным прогнозом заболевания и наблюдается у пациентов с I стадией заболевания ($p < 0,05$ по критерию χ^2) [125].

В исследовании китайских авторов, опубликованном в 2015 году впервые был проведен анализ, демонстрирующий прогностические значения различных видов иммунокомпетентных клеток и их взаимодействие между собой. В исследование было включено 166 пациентов преимущественно с местнораспространенными формами РЖ (I – 23; II – 41; III – 76; IV – 22). В результате иммуногистохимической оценки образцов ткани выявлено, что высокая плотность клеток CD3+, CD4+, CD8+iTILs; CD3+, CD4+sTILs, а также высокое соотношение CD8+iTILs/CD8+sTILs, CD4+sTILs/CD8+sTILs связаны с улучшением выживаемости. Соответственно, данные характеристики опухоли являются многообещающими независимыми предикторами общей выживаемости при раке желудка [111]. В большинстве случаев показатели выживаемости зависят не только от выбора проводимого лечения, но и от биологических особенностей опухоли. Так, известными прогностическими факторами, определяющими раннее метастазирование у больных после радикального лечения, являются: глубина опухолевой инвазии (параметр T), статус регионарных лимфоузлов (параметр N), морфологическая дифференцировка опухоли, лимфоваскулярная или периневральная инвазия, позитивные края резекции и перфорация опухоли [17]. В настоящее время, клиницисты в основном оценивают прогноз больных раком желудка согласно данным 9-го издания TNM. Тем не менее, прогноз у больных раком желудка в пределах одной и той же стадии TNM обычно отличается даже после прохождения идентичного лечения. Поэтому исследования по выявлению новых опухолевых маркеров с высокой специфичностью и чувствительностью при раке желудка, а также выделение подгрупп пациентов с высоким риском рецидива и метастазирования остаются актуальными.

Все вышеизложенные примеры наблюдений подтверждают изменения субпопуляционного состава TILs у пациентов РЖ как методом проточной цитометрии так и ИГХ-методом, но было бы интересно выявить взаимосвязь иммунного статуса пациента в зависимости от химиочувствительности. Накопленные данные свидетельствуют о том, что иммунокомпетентные клетки опухоли изменяет ее химиочувствительность [36; 39]. Например, высокие уровни CD3+ или CD8+ TILs в микроокружении опухоли после лечения коррелируют с более устойчивыми ответами на неoadъювантную химиотерапию паклитакселом при раке молочной железы [55]. Плотность CD8+TILs влияет на чувствительность к 5-фторурацилу (5-ФУ) при раке толстой кишки III стадии [77]. Более высокая плотность CD3+TILs и CD8+TILs связана с высокой чувствительностью на химиотерапию на основе иринотекана и платины при метастатическом колоректальном раке [78]. Уровень Tregs до химиотерапии является прогностическим маркером раннего рака молочной железы [101]. Однако взаимосвязь иммунокомпетентных клеток опухоли и химиочувствительности при раке желудка никогда не изучалась. Первое пилотное исследование [125] по изучению изменения TILs в зависимости от выбора химиотерапевтического препарата после гастрэктомии включало 15 пациентов РЖ (II – 7; III – 6; IV – 2). Корреляционные тесты Пирсона не показали статистически значимой связи между частотой гибели опухолевых клеток для каждого химиотерапевтического агента и субпопуляциями TILs от соответствующего пациента (Таблица 3).

Таблица 3 – Корреляции между TILs и частотой гибели опухолевых клеток после химиотерапии

Препарат	P				
	CD3	CD4	CD8	Foxp3+	Granzyme B
Этопозид	0,005 (0,986)	0,164 (0,560)	-0,048 (0,865)	0,199 (0,478)	-0,212 (0,449)
Доксорубицин	0,097 (0,730)	0,232 (0,405)	0,010 (0,973)	0,356 (0,193)	-0,087 (0,758)
Эпирубицин	0,392 (0,149)	0,276 (0,318)	0,156 (0,578)	0,386 (0,155)	0,014 (0,962)
Митомицин	-0,159 (0,571)	0,194 (0,489)	-0,058 (0,837)	0,324 (0,239)	-0,238 (0,393)

Фторурацил	0,356 (0,193)	-0,002 (0,994)	0,255 (0,360)	0,338 (0,217)	0,506 (0,054)
Оксалиплатин	0,248 (0,373)	0,402 (0,137)	-0,101 (0,721)	0,257 (0,355)	-0,219 (0,433)
Иринотекан	0,285 (0,302)	0,282 (0,309)	0,135 (0,631)	0,308 (0,264)	0,138 (0,625)
Доцетаксел	-0,022 (0,937)	-0,453 (0,090)	-0,066 (0,816)	0,091 (0,747)	0,277 (0,318)
Паклитаксел	-0,116 (0,693)	0,148 (0,614)	-0,117 (0,691)	0,026 (0,931)	0,248 (0,393)
Метотрексат	0,238 (0,393)	0,111 (0,694)	0,365 (0,181)	0,223 (0,424)	0,477 (0,072)
Цисплатин	0,238 (0,393)	-0,052 (0,853)	-0,230 (0,410)	0,136 (0,630)	-0,053 (0,851)

Три пары химиотерапевтических препаратов / количество субпопуляции TILs- доцетаксел/CD4, 5-ФУ/гранзим В и метотрексат/гранзим В коррелировали с коэффициентами корреляции -0,453, 0,506 и 0,477, соответственно, и р- значения 0,090, 0,054 и 0,072, соответственно (Рисунок 3 А-В).

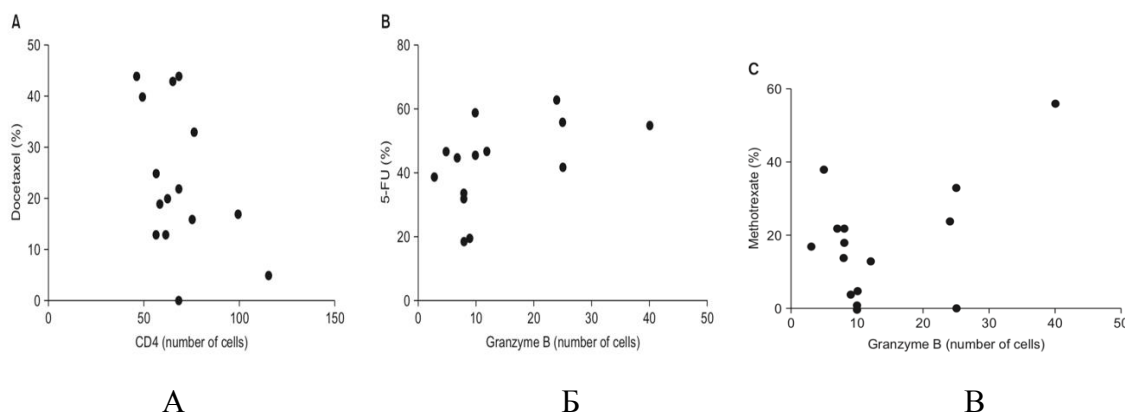


Рисунок 3 – Графики корреляционного разброса Пирсона для частоты гибели опухолевых клеток в ответ на различные химиотерапевтические препараты в анализах реакции химиотерапии на основе аденозинтрифосфата и субпопуляций TILs для 15 пациентов: А – Коэффициент гибели клеток CD4-доцетаксел; Б – Гранзим В-5-фторурацил; В – Гранзим В-метотрексат

Для всех графиков каждая точка представляет результаты одного пациента. Хотя показатели гибели опухолевых клеток в ответ на специфические химиотерапевтические агенты имели слабую взаимосвязь с распределением субпопуляций TILs, неизвестно вызывают или повышают TILs восприимчивость к химиотерапевтическим препаратам или являются только маркерами

химиочувствительности [125]. Также, по мнению ряда авторов известно, что соотношение $CD4^+/CD8^+$ очень важно и этот фактор взаимосвязан с ролью $CD4^+CD25^+$ Т-клеток в опухолевой ткани [41; 72].

Помимо цитотоксических $CD4-CD8^+$ Т-клеток выявлено, что при раке желудка и НК-клетки претерпевают некие изменения. Так, например, в исследование Ishigami S. et al. для оценки степени инфильтрации НК-клетками вошло более 140 образцов ткани больных раком желудка после гастрэктомии. Пациенты с высоким уровнем инфильтрации НК-клетками имели более высокую частоту встречаемости раннего рака желудка, меньшее число вовлеченных лимфоузлов ($p < 0,01$) и меньшую лимфатическую инвазию ($p < 0,05$), чем у пациентов с низким уровнем инфильтрации НК-клетками. Помимо этого, инфильтрация НК-клетками коррелирует с глубиной инвазии и клинической стадией заболевания. Например, по данным 10-летнего анализа пациентов плоскоклеточным раком головы и шеи, 5-летняя ОВ пациентов с высоким уровнем НК-клеток составила 78%, что было значительно лучше, чем у пациентов с низким уровнем инфильтрации НК-клетками ($p < 0,01$) [86].

Уникальной популяцией Т-лимфоцитов являются НКТ-клетки. Благодаря своей способности быстро продуцировать достаточные количества различных цитокинов (Th1, Th2, Th3 и/или Th17), они обеспечивают связь между врожденным и адаптивным звеньями иммунитета. Помимо Т-клеточного рецептора НКТ-клетки экспрессируют некоторые маркеры НК-клеток и Т-клеток памяти. В связи с их значимым модулирующим воздействием на иммунноопосредованные ответы, клетки НКТ также считаются важными медиаторами опухолевого иммунодефицита [151]. Впервые детальный анализ $CD3^+CD56^+$ НКТ-клеток был представлен у ранее не леченых пациентов РЖ [142]. В контрольную группу вошли 30 пациентов. Как показано на рисунке 4, содержание $CD3^+CD56^+$ НКТ-клеток в опухолях было значительно ниже, чем в здоровых тканях (4,44% (0,52-18,10%) против 7,20% (0,23-26,50%), $p < 0,01$). Кроме того, было показано, что низкое содержание $CD3^+CD56^+$ НКТ-клеток положительно коррелируют с уменьшением общей выживаемости больных

(Рисунок 4). Кроме того, низкий уровень CD3⁺ CD56⁺ NKT-клеток пропорционален клинической стадии заболевания, включая размер опухоли, инвазию опухоли и отдаленные метастазы (TNM). Таким образом, эти данные позволяют предположить, что уменьшение количества CD3⁺ CD56⁺ NKT-клеток связано с прогрессированием заболевания и уменьшением ОВ пациентов РЖ.

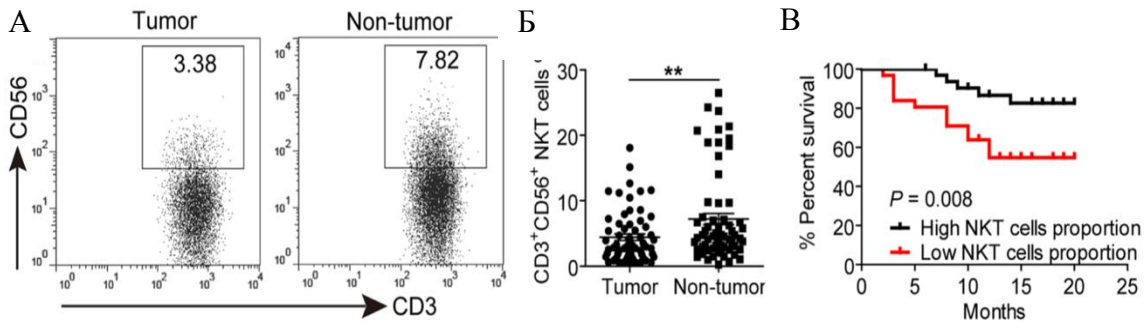


Рисунок 4 – Распространенность CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT-клеток в опухолевой и здоровой ткани пациентов с РЖ: А – Репрезентативный точечный график CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT-клеток после стробирования CD3⁺ T-клеток в здоровых и опухолевых образцах ткани одного и того же пациента; Б – Содержание CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT-клеток в CD3⁺ T-клетках здоровых и опухолевых образцах ткани 63 пациентов; В – График Каплан-Мейер представляет графики общей выживаемости пациентов по медиане частоты CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT-клеток (2,99%)

Тем самым, если снижение уровня CD3⁺CD56⁺ NKT-клеток коррелирует с прогрессированием заболевания и низкой ОВ пациентов РЖ, то восстановление их эффекторной функции способствует противоопухолевому иммунитету.

С учетом того, что «классические» морфологические критерии прогноза не могут полностью объяснить все разнообразие биологических свойств опухоли и не всегда достаточно правильно предсказывают ее течение, в последнее время широкий интерес представляют исследования биологических свойств опухоли и создания многофакторных систем прогноза РЖ [140]. Соответственно, вопрос о сопряженности TILs, Tregs с прогрессированием заболевания все еще остается открытым.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Общая характеристика клинического материала

В настоящей главе представлен анализ 45 больных раком желудка, которые за период с октября 2017 года по октябрь 2018 года получали лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В проспективное исследование были включены больные раком желудка, ранее не получавшие противоопухолевое лечение (Рисунок 5). В зависимости от типа проводимого лечения пациенты были разделены на две группы: хирургическая (I) и химиотерапевтическая (II).



Рисунок 5 – Дизайн исследования

В группу I включено 25 пациентов (55,6%) с ранним и местно-распространенным операбельным раком желудка (стадия I-III). В группу II включено 20 пациентов (44,4%) с метастатическим раком желудка (наличие отдаленных метастазов или опухолевых клеток в смывах/биоптатах с брюшины). Стадирование проведено согласно 8-й редакции TNM (2017).

При проведении работы, мы руководствовались следующими критериями включения больных в данный анализ:

– морфологическая верификация диагноза. Всем больным была проведена эзофагогастродуоденоскопия (ЭГДС) с биопсией и последующим гистологическим исследованием опухоли.

– Отсутствие ранее проведенной химиотерапии.

– Наличие достаточного количества опухолевых клеток в биологическом материале. Производился сбор операционного материала хирургической и биопсийного материала химиотерапевтической групп в изотонический раствор 0,9% NaCl для иммунологического исследования и 10% забуференный нейтральный формалин для патологанатомического и иммуногистохимического исследования (ИГХ).

– Проведение лечения, с адекватным объемом хирургического лечения (резекция желудка или гастрэктомия с лимфодиссекцией Д2 по показаниям) в группе I и платиносодержащие режимы, включающие в себя оксалиплатин (комбинации FOLFIRINOX, FOLFOX, FLOT, XELOX), в группе II.

– Отсутствие других злокачественных опухолей.

Ниже представлены стандартные химиотерапевтические режимы, применявшиеся при лечении пациентов.

Комбинация FOLFOX: оксалиплатин – 85 мг/м², фолинат кальция – 400 мг/м², 5-фторурацил – 400 мг/м² в/в болюсно и 5-фторурацил – 2400 мг/м² в течение 46 часов внутривенно (в/в) капельно через центральный венозный доступ. Повторяемость курсов – каждые 14 дней.

Комбинация FOLFIRINOX: оксалиплатин – 85 мг/м², иринотекан – 180 мг/м², фолинат кальция – 400 мг/м², 5-фторурацил – 400 мг/м² в/в болюсно и

5-фторурацил – 2400 мг/м² в течение 46 часов в/в капельноельно через центральный венозный доступ. Повторяемость курсов – каждые 14 дней.

Комбинация FLOT: оксалиплатин – 85 мг/м², доцетаксел – 50 мг/м², фолинат кальция – 200 мг/м², 5-фторурацил – 400 мг/м² в/в болюсно и 5-фторурацил – 2400 мг/м² в течение 46 часов в/в капельноельно через центральный венозный доступ. Повторяемость курсов – каждые 14 дней.

Комбинация XELOX: Оксалиплатин – 130 мг/м² в/в в 1-й день, капецитабин – 2000 мг/м²/сут. в 1-14-й дни. Начало очередного курса — на 22-й день

В хирургической группе лечение было представлено в виде гастрэктомии или субтотальной резекции желудка в пределах здоровых тканей R0 в сочетании с лимфодиссекцией D2. Из 25 прооперированных больных, гастрэктомии выполнены 14 (56,0%), проксимальная резекция желудка 4 (16,0%), дистальная резекция желудка 7 (28,0%) больным.

С целью определения степени распространенности процесса и молекулярно-биологического подтипа опухоли (приведено в главе «Обзор литературы») до начала лечения проводилось комплексное обследование больного, которое включало: эзофагогастродуоденоскопию с множественной биопсией опухоли (не менее 6 участков), колоноскопию, рентгенографию органов грудной клетки, ультразвуковую или компьютерную томографию органов брюшной полости и малого таза, исследование уровня РЭА, СА-19.9 сыворотки крови.

Общая выживаемость больных рассчитывалась, начиная с первого дня лечения (хирургия, химиотерапия) до даты последнего наблюдения/смерти. Выбывшие из исследования пациенты оценивались по дате их последнего визита. Безрецидивная выживаемость определялась от даты начала лечения до прогрессирования заболевания или смерти от любой причины.

Эффект терапии в группе II оценивался согласно критериям RECIST 1.1 (2008) следующим образом:

Полный эффект (ПЭ): исчезновение всех проявлений заболевания (остаточные образования < 1 см) на протяжении более одного месяца.

Частичный эффект (ЧЭ): снижение СНД (суммы наибольших диаметров) проявлений болезни > 30%.

Прогрессирование заболевания: появление новых опухолевых очагов и/или увеличение СНД > 20%.

Стабилизация: отсутствие признаков прогрессирования, полного и частичного эффектов.

Среднее время наблюдения за выжившими больными составило $16,4 \pm 6,2$ месяца (от 0,7 до 23,6 месяцев, медиана 18,5 месяца).

В группе I, пациентам на первом этапе выполнялось хирургическое лечение с последующим проведением адъювантной химиотерапии по показаниям. Анализ иммунного статуса по морфологическому материалу и периферической крови до операции осуществлялся однократно.

В группе II, обследование больных проводилось через каждые 2-3 курса терапии. Пациентам проводилось 9 двухнедельных циклов ХТ I линии либо 6 трехнедельных курсов с последующим наблюдением до прогрессирования болезни. Анализ иммунного статуса по морфологическому материалу и периферической крови осуществлялся дважды (до начала лечения и после 3-4 курсов химиотерапии).

2.2 Лабораторные (иммунологические) методы исследований

В основе данного исследования лежит оценка содержания основных линейных популяций лимфоцитов в периферической крови и опухолевой ткани, в состав которых входят Т-лимфоциты с фенотипом CD45+CD3+CD19-, В-лимфоциты с фенотипом CD3-CD19+ и НК-лимфоциты с фенотипом CD3-CD16+CD56+. Также анализ CD3+CD4+, CD3+CD8+ Т-клеток, субпопуляций эффекторных клеток с фенотипом CD16+Perforin+, CD8+Perforin+ и субпопуляций регуляторных клеток. Цитотоксический потенциал CD16+ (CD16ЦТП) и CD8+ (CD8ЦТП) лимфоцитов определялся как процент CD16+Perforin+ или CD8+Perforin+ клеток в составе соответствующей популяции. Согласно международным требованиям контроля качества пробоподготовки и

анализа образцов, контрольная сумма линейных клеточных популяций лимфоцитов должна составлять $100\pm 5\%$ ($T+B+NK=100\pm 5\%$). В нашем исследовании данный показатель являлся внутренним контролем качества при анализе каждого образца периферической крови.

Иммунологические исследования структуры иммунокомпетентных клеток, а также анализ минорных субпопуляций, включая регуляторные и эффекторные лимфоциты, проводили путем многопараметрового иммунофенотипирования лимфоидных клеток периферической крови ($n=45$) и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TILs) ($n=45$). Исследование иммунокомпетентных клеток периферической крови и образцов опухолевой ткани у 5 пациентов химиотерапевтической группы в динамике провести не удалось. У двоих больных зафиксирована смерть через 20 и 25 дней от начала лечения. 3 больных не явились на повторное исследование.

2.2.1 Исследование иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови больных ранним, местно-распространенным и метастатическим раком желудка проводили методом многопараметрового цитометрического анализа с использованием коммерческих наборов моноклональных антител к поверхностным дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека, конъюгированных FITC, PE, PE-Cy5, PC5 (BD Biosciences, Becton Coulter). Использовали двух-, трех- и четырех-цветное окрашивание клеток с подбором различных комбинаций реагентов, представленных в таблице 4.

Таблица 4 – Специфичность моноклональных антител, используемых в исследовании

№	Кластер дифференцировки	Клетки-мишени
1.	CD45	Все лейкоциты
2.	CD3	Зрелые Т-клетки
3.	CD4	Субпопуляция Т-клеток
4.	CD8	Субпопуляция Т-клеток
5.	CD19	В-лимфоциты

6.	CD16	НК-клетки, НКТ-клетки
7.	CD56	НК-клетки, НКТ-клетки
8.	CD11b	Цитотоксические клетки, НК-клетки
9.	CD28	Субпопуляция Т-лимфоцитов
10.	CD127	Активированные клетки, регуляторные клетки
	CD8, CD16	Внутриклеточный перфорин

Кровь забирали из локтевой вены натощак, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА. Для проведения прямой реакции поверхностной иммунофлуоресценции 50 мкл цельной крови инкубировали с моноклональными антителами (МКА) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте, после лизирования эритроцитов клетки отмывали и фиксировали в 300 мкл фиксирующего раствора BD CellFIX. Анализировали готовые образцы методом проточной цитометрии.

2.2.2 Исследование цитотоксического потенциала клеток-эффекторов

Цитотоксический потенциал клеток-эффекторов изучали с использованием коммерческой тест-системы, содержащей моноклональные антитела к внутриклеточному белку перфорины (BD Biosciences). Применяли комбинированное окрашивание поверхностных антигенов в сочетании с окрашиванием внутриклеточного белка перфорины. Для субпопуляционного анализа экспрессии внутриклеточного белка использовали метод одновременного окрашивания поверхностных антигенов в сочетании с окрашиванием внутриклеточного маркера – CD8/Perforin, CD16/Perforin. Клетки в количестве 5×10^5 помещали в пробирки BD Falcon clear polystyrene test tubes 12x75 mm и инкубировали с МКА, конъюгированными флуорохромами (или FITC, или PE, или PE Cy5) в течение 15 минут при 4°C, после чего добавляли по 100 мкл FIX&PERM раствора А и продолжали инкубацию еще 15 минут при тех же условиях. После этого клетки отмывали в 2,0 мл PBS, затем вносили МКА к внутриклеточным белкам по 10 мкл и по 100 мкл FIX&PERM раствора В. После

20-ти минутной инкубации клетки отмывали в 2,0 мл PBS и фиксировали в 300 мкл фиксирующего раствора BD CellFIX. Анализировали готовые образцы методом проточной цитометрии.

2.2.3 Исследование иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль

Забор опухолевой ткани проводили во время эндоскопического исследования до начала химиотерапии во II группе больных и во время хирургического этапа лечения I группы. Образцы ткани помещали в 2,0 мл охлажденного 0,9% изотонический раствора, фрагментацию и анализ проводили в тот же день или хранили при +4°C не более 12 часов. С целью получения клеточных суспензий фрагментацию ткани опухолей проводили с использованием системы Medimachine (BDBiosciences). Сначала опухоль гомогенизировали в нестерильных контейнерах (Medicons) для одноразового использования, затем фильтровали через фильтры Filcons с диаметром пор не более 50 мкм. Далее осуществляли иммунофлуоресцентное окрашивание клеток аналогично периферической крови. Использовали коммерческие МКА (BeckmanCoulter, BDBiosciences), конъюгированные различными флуорохромами FITC, PE, PE-Cy5, APC к дифференцировочным антигенам CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD28, CD11b, CD25, CD127, HLA-Dr, CD19, CD45. Анализировали готовые образцы методом проточной цитометрии.

2.3 Проточно-цитометрический анализ

Количественный анализ структуры субпопуляций лимфоидных клеток периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, проводили на проточном цитометре аналитического типа FACSCalibur (BDBiosciences), укомплектованного двумя лазерами с длиной волны 488 и 635 нм. Использовали стандартные настройки и протоколы сбора и анализа образцов CellQuestPRO software. При анализе образцов периферической крови накапливали и анализировали не менее 5000 событий в гейте CD45+/CD14- лимфоцитов. При

этом, согласно международным стандартам качества пробоподготовки и анализа образцов методом проточной цитометрии, количество клеток с фенотипом CD45+/CD14- составляло не менее 95-97%. Использовали Dotplot анализ, учитывали относительное число позитивных клеток (%). Для дискриминации неспецифического связывания использовали следующие изотипические конъюгаты IgG1FITC/IgG2aPE, IgG1FITC/IgG2aPE/IgG2a PC5, IgG1FITC/IgG2aPE/IgG2aPerCP. При анализе регуляторных и/или эффекторных субпопуляций лимфоцитов, «гейтирование» клеток осуществляли по связыванию с МКА анти-CD4 или анти-CD8, в этом случае применяли стратегию последовательного «гейтирования» клеток, при этом изотипические контроли не использовали. Для анализа образцов клеточной суспензии из фрагментированной опухолевой ткани накапливали $0,1-2 \times 10^6$ событий для каждого образца с дальнейшим анализом не менее 500-5000 клеток в CD45+гейте. Дальнейшую обработку FSC файлов первичных цитометрических данных проводили с использованием программного пакета WinMDI версия 2.8.

2.4 Исследование лимфоцитов инфильтрирующих опухоль методом иммуногистохимии

Забор опухолевой ткани проводили во время эндоскопического исследования до начала химиотерапии во II группе больных и в процессе выполнения хирургического этапа лечения I группы. Фиксированные формалином образцы из парафиновых тканей последовательно разрезали на срезы толщиной 4 мкм. Использовались следующие первичные моноклональные антитела: клон анти-CD4 113 (разведение 1: 200; Sino Biological, BDA, Beijing, PR China) и клон анти-CD8 SP16 (разведение 1: 150; Thermo Scientific, Fremont, CA). Двухэтапный протокол (Novolink Polymer Detection System, Novocastra, Newcastle, UK) был выполнен на парафиновых срезах для иммуногистохимии. Согласно инструкциям производителя парафиновые срезы депарафинировали в ксилоле и получали градиентное элюирование в этаноле. Затем предметные стекла

инкубировали в 0,3% H_2O_2 для блокирования активности эндогенной пероксидазы.

Извлечение антигена проводили погружением предметных стекол в горячую воду с температурой 95 градусов на 45 минут. Проводили инкубацию с первичными антителами, затем промывали фосфатно-солевым буфером и затем инкубировали с вторичными антителами, используя систему обнаружения GTVision™ III / Mo & Rb (Gene Tech, Shanghai, PR China). Срезы пигментировали в растворе 3,3-диамибензидина (DAB) (разведение 1:50; Gene Tech, Shanghai, PR China) в течение ± 5 с под контролем микроскопического наблюдения. Затем все срезы были окрашены гематоксилином. Срезы с отрицательным контролем без первичных антител выполняли в каждой серии.

Количество иммунных клеток определяли отдельно в интратуморальной ткани (I) и перитуморальной ткани (II). Каждое сечение оценивали на наличие иммунных клеток с помощью микроскопического исследования ($\times 400$; BX51; Olympus, Токио, Япония). Пять несмежных микроскопических областей были случайно выбраны для каждого компартмента в каждом образце, чтобы обеспечить репрезентативность и гомогенность. Количество иммунных клеток в 10 полях накапливалось и затем усреднялось для расчета среднего числа для 1 компьютеризированного 400x микроскопического поля ($0,1590 \text{ мм}^2/\text{поле}$). Фотографии были получены с помощью светового микроскопа (BX51; Olympus, Токио, Япония), который был подключен к персональному компьютеру и отображен на цветном 14-дюймовом мониторе с высоким разрешением. Подсчет осуществлялся двумя исследователями независимо друг от друга. Оценку клеток проводили независимые патоморфологи, которые не имели доступа к клинико-патологическим данным.

Иммунологические исследования структуры лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, больных ранним, местно-распространенным и метастатическим раком желудка проводились в отделе клинико-лабораторной диагностики НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ

онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России (зав. лабораторией, д.б.н. Заботина Т.Н.).

Морфологическая часть исследования проводилась в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России (зав отделением, д.м.н. Делекторская В.В.).

2.5 Характеристика больных

В связи с различиями в прогнозе и тактике лечения, больные с ранним/операбельным, местно-распространенным и метастатическим РЖ проанализированы отдельно. Основные характеристики больных приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика больных

Критерий		Хирургическая группа (I)		Химио-терапевтическая группа (II)		Всего	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Число пациентов		25	55,6	20	44,4	45	100
Средний возраст		65 [60;69]		58 [44,5;64,0]		62 [58; 67]	
Возрастная группа	до 45 лет	0	0,0	5	25,0*	5	11,1
	46-60 лет	7	28,0	6	30,0	13	28,9
	старше 60 лет	18	72,0	9	45,0	27	60,0
Пол	мужчины	10	40,0	9	45,0	19	42,2
	женщины	15	60,0	11	55,0	26	57,8
Индекс массы тела (ИМТ)	недостаточность	3	12,0	1	5,0	4	8,9
	норма	8	32,0	6	30,0	14	31,1
	избыток	10	40,0	8	40,0	18	40,0
	ожирение – 1 ст.	4	16,0	3	15,0	7	15,6
	ожирение – 2 ст.	0	0,0	2	10,0	2	4,4
Локализация первичной опухоли:	антральный отдел	13	52,0	5	25,0	18	40,0
	тело желудка	12	48,0	12	60,0	24	53,3
	пилорический отдел	–	–	3	15,0	3	6,7

Стадия TNM	I	4	16,0	0	0,0	3	9,7
	II	8	32,0	0	0,0	6	19,4
	III	13	52,0	0	0,0	9	29,0
	IV	0	0,0	20	100,0	13	41,9
Категория T	Tx	0	0,0	6	30,0	6	13,3
	T1	1	4,0	0	0,0	1	2,2
	T2	2	8,0	2	10,0	4	8,9
	T3	10	40,0	2	10,0	12	26,7
	T4	12	48,0	10	50,0	22	48,9
Категория N	Nx	0	0,0	6	30,0	6	13,3
	N0	9	36,0	0	0,0	9	20,0
	N1	6	24,0	10	50,0	16	35,6
	N2	10	40,0	4	20,0	14	31,1
M	M0	25	100,0	0	0,0	25	55,6
	M+	0	0,0	20	100,0	20	44,4
Степень дифференцировки (G)	G1	3	12,0	2	10,0	5	11,1
	G2	8	32,0	6	30,0	14	31,1
	G3	14	56,0	12	60,0	26	57,8
Классификация Lauren	кишечный тип	16	64,0	12	60,0	28	62,2
	диффузный тип	7	28,0	6	30,0	13	28,9
	смешанный тип	2	8,0	2	10,0	4	8,9
Статус MSI	MSS	23	92,0	20	100,0	43	95,6
	MSI-H	2	8,0	0	0,0	2	4,4
Мутация HER2	нет	0	0,0	11	55,0	11	24,4
	есть	0	0,0	6	30,0	6	13,3
	не известно	25	100,0	3	15,0	28	62,2
*статистические различия между I и II группами, p=0,008							

Как видно из представленной таблицы, у большинства больных (53,3%) первичная опухоль находилась в теле желудка. Больные из хирургической группы старше 60 лет (в среднем на 7 лет старше пациентов из группы химиотерапии) и в половине случаев (50%) представлены операбельным местно-распространенным РЖ. Обращает на себя внимание, что с вовлечением серозной

оболочки в двух группах подавляющее число больных группы I (76%) не имели метастазов в регионарные лимфатические узлы либо наблюдалось поражение от 3 до 6 лимфоузлов в отличие от группы II (50%), где при наличии отдаленных метастазов были вовлечены 1-2 регионарных лимфатических узла. В I и II группах, опухоль низкодифференцированная (56% и 60%) и представлена кишечным типом Lauren (64% и 60%). В хирургической группе у 2 пациентов (4%) имел место высокий уровень MSI.

2.6 Статистический анализ

Основным критерием оценки являлись сопоставление иммунологических субпопуляций клеток в опухолевой ткани и периферической крови пациентов РЖ, а также их изменение до и в процессе химиотерапевтического лечения различными режимами. Также, выполнялась оценка безрецидивной выживаемости и общей выживаемости.

Выживаемость пациентов анализировали в соответствии с методом Каплана-Мейера и сравнивали по лог-ранг тесту. Проводили однофакторный и многофакторный регрессионный анализ Кокса.

Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием статистического пакета лицензионных программ Statistica for Windows v.10 (однофакторный анализ, корреляционный анализ Спирмена, описательная статистика сравнения количественных показателей Манна-Уитни, анализ Каплан-Майера) и SPSS v21 (ROC-кривые, многофакторный анализ). Характер распределения показателей определяли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Количественные переменные представлены в виде медианы и квартилей (25-75 процентиля). Категориальные переменные выражали в процентах и абсолютных значениях.

Статистическая значимость различий между количественными показателями вычисляли по критерию t Стьюдента, по непараметрическим критериям Манна-Уитни и Вилкоксона. Для сравнения качественных параметров применяли критерий Фишера и χ^2 . Различия считали значимыми при $p < 0,05$

(допустимый уровень альфа-ошибки 5%). Степень взаимосвязи параметров оценивали с помощью корреляционного анализа Спирмена. Определение границ с оптимальным соотношением чувствительности и специфичности выполняли методом построения ROC-кривой.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

3.1 Анализ линейной структуры лимфоцитов периферической крови, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка

Изучение субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови проведено у 45 больных ранним, местно-распространенным и метастатическим раком желудка (Таблица 6).

Таблица 6 – Показатели системного клеточного иммунитета у больных раком желудка до начала лечения

Показатели клеточного иммунитета в крови	Хирургическая группа (I) (n=25)		Химиотерапевтическая группа (II) (n=20)		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD3+CD19-	74,3	71,4-84,7	72,5	64,2-81,8	0,560
CD3-CD19+	1,6	1,3-2,2	1,0	0,6-1,5	0,017
CD3-CD16+CD56+	11,8	7,3-25,0	21,3	9,4-30,4	0,140
CD3+CD4+	39,7	29,6-45,5	37,3	32,0-49,1	0,828
CD3+CD8+	32,8	23,0-41,2	24,7	20,5-33,6	0,074
CD16+Perforin+	12,1	8,5-18,7	19,1	14,6-27,2	0,016
CD16ЦТП	66,7	42,5-75,5	81,9	63,0-90,3	0,010
CD8+Perforin+	19,0	14,6-25,3	23,5	12,8-27,3	0,515
CD8ЦТП	55,6	42,9-66,3	64,3	52,0-72,7	0,084
CD3+CD16+CD56+	15,9	8,7-25,1	11,1	8,7-18,4	0,167
CD4+CD25+CD127-	7,7	6,2-9,1	6,9	5,4-8,4	0,134
CD8+CD11b-CD28-	9,5	6,2-13,7	11,3	7,7-13,2	0,457

На первом этапе было проведено изучение линейной структуры клеточного звена иммунитета 25 больных ранним и местно-распространенным (I группа) и

20 больных метастатическим РЖ (II группа). Как известно, основным пулом лимфоцитов периферической крови являются Т-клетки с фенотипом CD3+CD19-, в норме на их долю приходится в среднем 75%. В целом, по группе различий между уровнем содержания зрелых Т-лимфоцитов периферической крови больных I и II групп не наблюдалось: оно составило 74,3% и 72,5% соответственно.

Второй значимой по количеству линейной популяцией лимфоцитов являются НК-клетки с фенотипом CD3-CD16+CD56+. В норме на их долю приходится не более 25% среди всех лимфоидных клеток. Нами выявлены различия в содержании популяции НК-лимфоцитов в периферической крови больных I и II групп. Медиана их процентного содержания была в 2 раза выше у пациентов с мРЖ, чем у больных с локальными и местно-распространенными формами РЖ – 21,3% против 11,8%, соответственно ($p=0,140$).

Третьей линейной популяцией в составе лимфоцитов являются В-клетки, на долю которых в норме приходится не более 5-9%. Медиана CD3-CD19+ В-клеток выше у пациентов I группы по сравнению с больными II группы, что составило 1,6% против 1,0%, соответственно ($p=0,017$).

Таким образом, различия «линейной» структуры лимфоцитов заключались в статистически значимом увеличении В-клеток у пациентов I группы и увеличении уровня НК-клеток у пациентов II группы. При этом, различий в процентном содержании Т-клеток не найдено.

Важнейшим показателем состояния клеточного звена иммунной системы является анализ субпопуляций CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в структуре Т-клеток. Ключевыми клетками эффекторного звена иммунитета является популяция CD8 лимфоцитов. Данная субпопуляция гетерогенна по своему фенотипу и представлена как специфическими, так и неспецифическими CD8 клетками.

В группе больных локальным и местно-распространенным раком желудка уровень специфических цитотоксических Т-клеток с фенотипами CD3+CD8+ и CD3+CD4+ оказался незначительно выше, чем у больных с мРЖ (32,8-24,7%; 39,7-37,3%), но оставался в пределах нормы.

Далее нами были изучены основные субпопуляции эффекторных лимфоцитов, содержащих перфорин – CD8+Perforin+ и CD16+Perforin+ клетки. Ранее было показано, что уровень экспрессии перфорина в эффекторных лимфоцитах можно рассматривать как маркер их цитотоксической состоятельности [9].

При оценке количества перфорин-содержащих эффекторных клеток в обеих группах оказалось, что вместе с повышенным уровнем НК-клеток у пациентов II группы выше оказалось и содержание CD16+Perforin+ эффекторных лимфоцитов 19,1% против 12,1%, ($p=0,016$), а также их цитотоксический потенциал – CD16ЦТП – 81,9% и 66,7%, ($p=0,010$) по сравнению с I группой. В то же время, уровень эффекторных клеток CD8 (CD8+Perforin+) и их цитотоксического потенциала (CD8ЦТП) имели схожую, но не достоверную тенденцию к увеличению своих значений в группе мРЖ – 23,5% против 19%; 64,3% против 55,6% соответственно.

Таким образом, для больных I и II групп характерны колебания уровня ЦТЛ в пределах нормы. Однако, исследование клеток эффекторного звена иммунитета больных раком желудка показало, что количество клеток-эффекторов CD16+ с экспрессией внутриклеточного перфорина и их цитотоксический потенциал у больных мРЖ статистически значимо выше показателей I группы.

Обнаруженные статистически значимые нарушения указывают на необходимость проведения многопараметрового анализа фенотипической структуры минорных субпопуляций клеток регуляторного и эффекторного звеньев иммунитета, поскольку регуляторные/супрессорные функции и эффекторные функции характерны как для Т-клеток, так и для НК-клеток [5]. На сегодняшний день идентифицировано несколько субпопуляций лимфоцитов, обладающих регуляторной активностью, наличие которых коррелирует с неблагоприятным клиническим течением при многих формах злокачественных заболеваний, в том числе, при раке желудка. Данные клетки представляют собой минорные субпопуляции и входят в структуру именно Т-клеточного звена иммунитета. Это НКТ-лимфоциты с фенотипом CD3+CD16+CD56+ и Т-

регуляторные клетки с фенотипом CD45+CD8+ CD11b-CD28- и CD45+CD4+CD25+CD127- [171,50].

3.2 Анализ линейной структуры лимфоцитов периферической крови, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка (в зависимости от стадии заболевания)

При подгрупповом анализе пациентов РЖ в соответствии со стадией заболевания было показано, что медиана процентного содержания популяции CD3+CD19- Т-клеток снижается по мере прогрессирования заболевания и составляет 83,2% – 73,0% – 72,5% при I-II-III-IV стадиях соответственно.

Медиана CD3-CD19+ В-клеток статистически значимо выше у пациентов с местно-распространенным РЖ, чем у больных с IV стадией заболевания – 1,9% против 1,0%, ($p=0,012$).

Также выявлена тенденция к повышению числа НК-клеток по мере прогрессирования: с 11,8% при I-II стадиях до 13,0% при III – до 21,3% при IV стадии болезни (Таблица 7).

Таблица 7 – Показатели системного клеточного иммунитета больных раком желудка в зависимости от стадии заболевания до начала лечения

Показатели клеточного иммунитета в крови	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
CD3+CD19-	83,2	72,6-84,8	73,0	58,9-74,3	72,5	64,2-81,8	0,197	0,179	0,819
CD3-CD19+	1,4	1,3-1,6	1,9	1,2-6,6	1,0	0,6-1,5	0,196	0,177	0,012
CD3-CD16+CD56+	11,8	7,3-15,9	13,0	7,3-27,5	21,3	9,4-30,4	0,641	0,094	0,410
CD3+CD4+	42,0	29,6-45,5	35,6	35,2-46,6	37,3	32,0-49,1	0,701	0,885	0,636
CD3+CD8+	39,9	23,0-42,0	28,7	18,9-32,8	24,7	20,5-33,6	0,197	0,016	0,494
CD16+Perforin+	10,4	5,9-26,9	12,5	11,3-18,7	19,1	14,6-27,2	0,162	0,030	0,065

CD16ЦТП	42,5	25,4-75,5	68,8	60,5-81,9	81,9	63,0-90,3	0,051	0,001	0,254
CD8+Perforin+	15,9	10,4-19,9	20,7	18,2-25,3	23,5	12,8-27,3	0,179	0,238	0,986
CD8ЦТП	42,9	27,5-70,0	56,6	52,3-66,3	64,3	52,0-72,7	0,161	0,044	0,352
CD3+CD16+CD56+	25,1	15,9-33,2	10,7	7,7-13,7	11,1	8,7-18,4	0,002	0,003	0,739
CD4+CD25+CD127-	7,7	5,5-10,0	7,9	7,0-9,1	6,9	5,4-8,4	0,640	0,273	0,177
CD8+CD11b-CD28-	7,5	3,0-9,8	12,3	6,2-17,0	11,3	7,7-13,2	0,084	0,079	0,739

Таким образом, отмечается тенденция к ослаблению Т-клеточного звена иммунитета за счет снижения числа Т-клеток и повышению уровня НК-клеток от I стадии к IV стадии рака желудка.

CD3+CD4+, CD3+CD8+ субпопуляции Т-клеточного звена соответствовала динамике показателей общего пула CD3+ Т-клеток, снижалась по мере роста стадии заболевания и составила 42,0% – 35,6% – 37,3%; 39,9% – 28,7% – 24,7%. Следует отметить, что показатель медианы числа CD3+CD8+ Т-клеток у пациентов I-II против IV стадии заболевания является статистически достоверным – 39,9% против 24,7%, ($p=0,0165$).

Анализ цитотоксического потенциала клеток-эффекторов показал, что медиана уровня CD16+Perforin+ клеток, а также их функциональная активность (CD16ЦТП) выше у пациентов II группы по сравнению с I группой и составляет 19,1% против 10,4%, ($p=0,0160$) и 81,9% против 42,5%, ($p=0,001$) соответственно. Аналогичная закономерность выявлена для клеток-эффекторов CD8+. Медиана цитотоксического потенциала CD8+ клеток у пациентов с IV стадией заболевания оказалась выше, чем у пациентов с ранними формами РЖ, составив 64,3% против 42,9%, ($p=0,044$).

При анализе 3 основных минорных популяций регуляторных клеток лимфоидной дифференцировки, отмечено, что для пациентов с ранними формами РЖ характерно статистически значимо более высокое содержание НКТ-клеток по сравнению с местно-распространенными и метастатическими формами – 25,1% – 10,7% – 11,1%, ($p=0,002$; $p=0,003$). При исследовании числа CD8+ регуляторных

T-клеток, напротив, высокие показатели характерны для больных IV стадии составив 11,3% по сравнению с местно-распространенными 12,3% и локальными формами РЖ 7,5%, ($p=0,07$).

Таким образом, высокое содержание NKT клеток свойственно пациентам с ранними формами рака желудка, а также отмечается их статистически значимое уменьшение по мере увеличения распространенности.

3.3 Анализ факторов системного воспаления у больных раком желудка

Изучение факторов системного воспаления, таких как нейтрофильно-лимфоцитарный индекс (НЛИ) и тромбоцитарно-лимфоцитарный индекс (ТЛИ) в периферической крови, проведено у 45 больных ранним, местно-распространенным и метастатическим раком желудка.

При анализе маркеров воспаления у пациентов РЖ относительно референсных значений нормы (нейтрофилы $2-6,85 \times 10^9/\text{л}$; лимфоциты $1,10-3,20 \times 10^9/\text{л}$, тромбоциты $180-320 \times 10^9/\text{л}$) было выявлено, что у 3/4 (73-78%) пациентов показатели нейтрофилов, лимфоцитов и тромбоцитов соответствуют норме, однако в группе I число пациентов с отклонением количества нейтрофилов от нормы было статистически значимо выше, чем в группе II – 40% против 10%, ($p=0,025$) при равнозначных значениях доли больных с повышенным числом лимфоцитов и тромбоцитов в обеих группах (24% против 30%; 24% против 20%). Количество нейтрофилов у пациентов метастатическим РЖ у 90% пациентов соответствовало норме, тогда как при I-III стадиях рака желудка лишь 60% ($p=0,025$) (Таблица 8).

При сравнении медиан показателей периферической крови и относительных индексов воспаления у пациентов с локальными, местно-распространенными и метастатическими формами рака желудка, достоверных различий не найдено (Таблица 9).

Таблица 8 – Показатели клинических маркеров воспаления у больных раком желудка относительно референсных значений нормы до начала лечения

Показатели клинических маркеров воспаления		Хирургическая группа (I) (n=25)		Химиотерапевтическая группа (II) (n=20)		Всего	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Нейтрофилы	выше-ниже нормальных показателей	10	40,0	2	10,0*	12	26,7
	нормальные показатели	15	60,0	18	90,0*	33	73,3
Лимфоциты	выше-ниже нормальных показателей	6	24,0	6	30,0	12	26,7
	нормальные показатели	19	76,0	14	70,0	33	73,3
Тромбоциты	выше-ниже нормальных показателей	6	24,0	4	20,0	10	22,2
	нормальные показатели	19	76,0	16	80,0	35	77,8

* статистические различия между группами, p=0,025; p= 0,025

Таблица 9 – Показатели клинических маркеров воспаления у больных раком желудка до начала лечения

Показатели клинических маркеров воспаления		Хирургическая группа (I) (n=25)		Химиотерапевтическая группа (II) (n=20)		p
		медиана	квартили	медиана	квартили	
Показатели периферической крови (10 ⁹ /л)	нейтрофилы	4,90	3,17-8,84	3,63	3,04-5,17	0,147
	тромбоциты	265,0	222,0-311,0	270,0	221,0-348,5	0,793
	лимфоциты	2,13	1,65-2,75	1,68	1,44-2,40	0,337
Относительные индексы	НЛИ	2,29	1,36-4,99	2,19	1,55-2,85	0,954
	ТЛИ	120,19	92,11-168,56	154,0	113,0-228,76	0,278

В то же время, при анализе показателей клинических маркеров воспаления в зависимости от стадии заболевания статистически значимыми явились показатели

нейтрофилов между ранними и местно-распространенными формами рака желудка (3,48% против 7,02%, $p=0,044$); местно-распространенными и метастатическими формами рака желудка (7,02% против 3,63%, $p=0,015$). Также, различия ТЛИ между ранними и метастатическими формами рака желудка явились статистически достоверными (113,09 против 154,03, $p=0,044$) (Таблица 10).

Таблица 10 – Показатели клинических маркеров воспаления до начала лечения у больных раком желудка в зависимости от стадии заболевания

Показатели клинических маркеров воспаления		I-II (n=11)		III (n=14)		IV (n=20)		p		
		ме-диа-на	квар-тили	ме-диа-на	квар-тили	ме-диа-на	квар-тили	I+ II/III	I+ II/IV	III/IV
Показатели периферической крови ($10^9/л$)	нейтро-филы	3,48	2,89-5,86	7,02	4,29-9,76	3,63	3,04-5,17	0,044	0,855	0,015
	тромбо-циты	252,0	222,0-292,0	282,5	213,0-466,0	270,0	221,0-348,5	0,149	0,317	0,666
	лимфо-циты	2,02	1,75-2,75	2,31	1,27-2,99	1,68	1,44-2,40	0,850	0,244	0,641
Относи-тельные индексы	НЛИ	1,85	1,21-2,29	3,77	1,43-5,34	2,19	1,55-2,85	0,134	0,157	0,192
	ТЛИ	113,09	101,49-125,42	168,56	90,64-257,30	154,03	113,0-228,76	0,244	0,044	0,986

Как следует из таблиц 9 и 10, исходные показатели нейтрофильно-лимфоцитарного и тромбоцитарно-лимфоцитарного индексов между группами не отличались.

3.4 Клинико-иммунологический анализ иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови у больных раком желудка

Нами были исследованы взаимосвязи таких клинических признаков, как возраст пациента (как по годам, так и по группам: до 45 лет, 46-60 лет, старше 60 лет), стадия заболевания, степень дифференции (G), индекс массы тела, тип по Lauren и статус MSI с исследуемыми иммунологическими показателями

периферической крови. Корреляционный анализ Спирмена показал значимые корреляции ($p < 0,05$), однако сила их взаимосвязи преимущественно была умеренная.

Группа I – Корреляционный анализ Спирмена показал значимые корреляции ($p < 0,05$):

– возраст – с увеличением возраста уменьшается число Т-клеток с фенотипом CD3+CD19- ($r_s = -0,45$), ЦТЛ с фенотипом CD3+CD8+ ($r_s = -0,48$), но увеличивается число НК-клеток с фенотипом CD3-CD16+CD56+ ($r_s = 0,53$), эффекторных клеток с фенотипом CD16+Perforin+ ($r_s = 0,46$);

– пол – у женщин отмечается уменьшение числа В-клеток CD3-CD19+ ($r_s = -0,57$);

– стадия заболевания – с увеличением стадии снижается число НКТ-клеток CD3+CD16+CD56+ ($r_s = -0,59$), однако возрастает цитотоксический потенциал CD16-клеток – active CD16 ($r_s = 0,37$);

– G – при низкодифференцированной аденокарциноме желудка уменьшается цитотоксический потенциал CD16-клеток – CD16ЦТП ($r_s = -0,48$) и Т-регуляторных клеток – CD8+CD11b-CD28- ($r_s = -0,45$);

– ИМТ – с увеличением ИМТ уменьшается содержание CD3+CD4+ ($r_s = -0,53$), Т-регуляторных клеток с фенотипом CD8+CD11b-CD28- ($r_s = -0,40$);

– тип Lauren – при диффузном типе уменьшается цитотоксический потенциал CD16-клеток – ЦТП CD16 ($r_s = -0,55$).

– Статус MSI не показал корреляции ни с одним из показателей иммунокомпетентных клеток.

Группа II – Корреляционный анализ Спирмена показал значимые корреляции ($p < 0,05$), однако сила взаимосвязи их была умеренная:

– пол – у женщин отмечается увеличение числа цитотоксического потенциала CD16-клеток – CD16ЦТП ($r_s = 0,66$) и уменьшение числа Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4+CD25+CD127- ($r_s = -0,66$);

– G – при низкодифференцированной аденокарциноме желудка увеличивается цитотоксический потенциал CD16-клеток – CD16ЦТП ($r_s = 0,69$);

– ИМТ – с увеличением ИМТ увеличивается число НКТ-клеток с фенотипом CD3+CD16+CD56+ ($r_s = 0,67$), Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4+CD25+CD127- ($r_s = 0,54$); Наблюдается высокая отрицательная корреляция между ИМТ и содержанием CD3-CD19+В-клеток ($r_s = -0,82$);

– тип Lauren – при диффузном типе увеличивается цитотоксический потенциал CD16-клеток – CD16ЦТП ($r_s = 0,63$).

Рассмотрим корреляцию типа Lauren и цитотоксического потенциала CD16-клеток – CD16ЦТП более подробно. В I группе отмечено повышение CD16ЦТП при кишечном типе в отличие от диффузного – 72,9-41,6 ($p=0,004$), а во II группе CD16ЦТП статистически значимо уменьшалось у кишечного типа в отличие от диффузного и смешанного типов – 93,2-73,2 ($p=0,028$); 90,3-73,2 ($p=0,036$) (Рисунок 6).

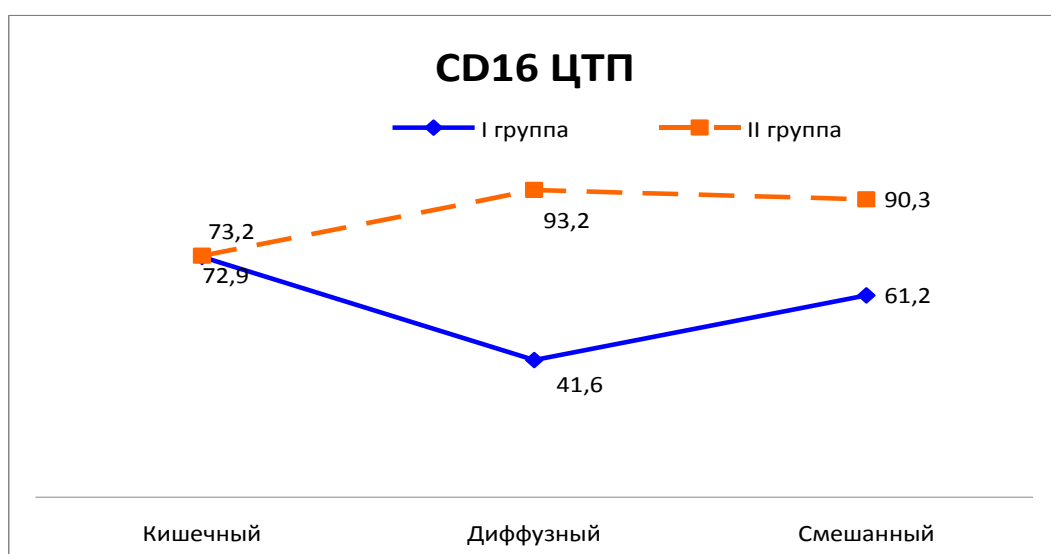


Рисунок 6 – Показатель CD16ЦТП в зависимости от типа Lauren

В то же время, такие неблагоприятные факторы прогноза, как G3 и диффузный тип Lauren при подгрупповом анализе показали уменьшение функциональной активности НК-клеток у пациентов I группы и увеличение у пациентов II. А также выявлено, что у пациентов, страдающих ожирением 1 и 2 ст. в обеих группах идет снижение функциональной активности клеток-эффекторов и субпопуляций регуляторных Т-клеток, при этом у пациентов с IV ст. отмечается рост числа НКТ и В-лимфоцитов.

3.5 Отдаленные результаты в зависимости от клинических показателей у больных раком желудка

Медиана наблюдения за больными составила 18,5 месяца [15,2; 20,4]. В I группе – 18,3 месяца [15,2; 19,2], во II – 19,5 месяца [8,7; 22,7]. За время наблюдения умерло 28,9% (13/45) – 12% (3/25) – в I группе и 50% (10/20) – во II (p=0,007). Прогрессирование заболевания зарегистрировано у 29 (62,2%) пациентов, у 9 (36%) – I группы и 20 пациентов (100%) II группы (Таблица 11).

Таблица 11 – Отдаленные результаты больных раком желудка

Статус больных	Хирургическая группа (I) (n=25)		Химиотерапевтическая группа (II) (n=20)		Всего	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Пациенты живы без прогрессирования заболевания	16	64,0	0	0,0*	16	35,6
Пациенты живы с прогрессированием заболевания	6	24,0	10	50,0	16	35,6
Летальность	3	12,0	10	50,0*	13	28,9

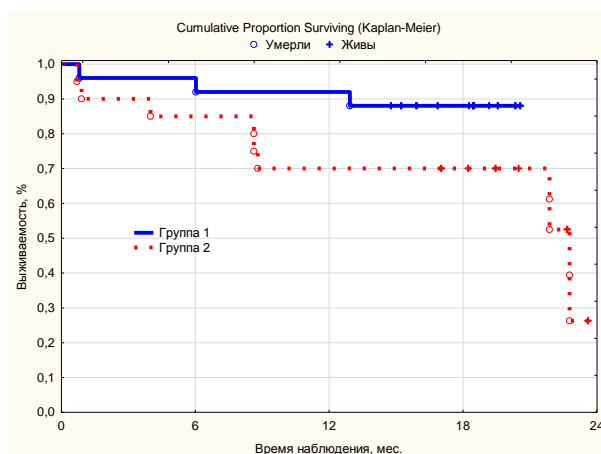
*статистически значимые различия между группами, p<0,001, p<0,007

Общая 1-летняя выживаемость пациентов I группы составила 92,0±5,4%; II группы – 70,0±10,2%. 1-летняя выживаемость без прогрессирования для I и II групп составила 64,0±9,6% и 10,0±6,7%, соответственно (Таблица 12 и Рисунок 7).

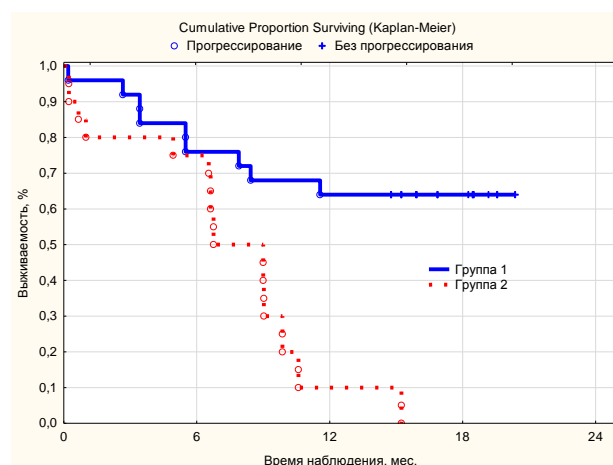
Таблица 12 – Отдаленные результаты лечения

Отдаленные результаты	Хирургическая группа (I)		Химиотерапевтическая группа (II)		p	Всего	
	(n=25)		(n=20)			(n=45)	
	абс.	%	абс.	%		абс.	%
Смерть	3	12,0	10	50,0	0,007	13	28,9
Прогрессирование	9	36,0	20	100	0,001	29	64,4
Общая выживаемость (%±δ)							
6 месяцев	96,0±3,9		85,0±8,0		0,188	91,1±4,2	
1-летняя	92,0±5,4		70,0±10,2			82,2±5,7	
1,5-летняя	88,0±6,5		70,0±10,2			80,0±6,0	
Медиана, мес	не достигнута		22,0			22,5	

Выживаемость без прогрессирования (%±δ)				
6 месяцев	76,0±8,5	75,0±9,7	0,001	75,6±6,4
1-летняя	64,0±9,6	10,0±6,7		40,0±7,3
1,5-летняя	64,0±9,6	–		35,0±7,2
Медиана, мес	не достигнута	6,8		9,5



Общая выживаемость



Выживаемость без прогрессирования

Рисунок 7 – Общая выживаемость и выживаемость без прогрессирования у больных I и II групп

Далее проведен подгрупповой анализ влияния факторов на выживаемость пациентов РЖ. В I группе однофакторный регрессионный анализ не выявил значимых факторов (Таблица 13).

Таблица 13 – Однофакторный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП I группы от клинических показателей (n=25)

Фактор	ОВ				ВБП			
	p	HR	95% ДИ		p	HR	95% ДИ	
Возраст	0,103	1,14	0,97	1,34	0,384	1,04	0,95	1,13
Пол	0,324	0,30	0,03	3,30	0,167	0,39	0,11	1,48
Возрастная группа	–	–	–	–	0,621	1,49	0,31	7,17
ИМТ	0,617	0,73	0,21	2,53	0,924	0,97	0,49	1,93
Стадия	0,228	0,41	0,09	1,76	0,350	1,76	0,54	5,77
Lauren	0,794	0,77	0,11	5,50	0,906	0,94	0,34	2,62
G	0,811	0,83	0,18	3,84	0,559	0,78	0,34	1,78

Для пациентов II группы значимым фактором для ВБП явился возраст больных (Таблица 14).

Таблица 14 – Однофакторный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП II группы от клинических показателей (n=20)

Фактор	ОВ				ВБП			
	p	HR	95% CI		p	HR	95% CI	
Возраст	0,443	1,02	0,97	1,07	0,012	1,06	1,01	1,12
Пол	0,828	0,87	0,25	3,02	0,970	0,98	0,38	2,51
Возрастная группа	0,243	1,61	0,73	3,56	0,029	2,38	1,09	5,19
ИМТ	0,504	0,78	0,37	1,63	0,336	0,76	0,44	1,32
Lauren	0,322	0,55	0,17	1,78	0,245	0,60	0,25	1,42
G	0,412	1,65	0,50	5,50	0,740	0,89	0,45	1,77

Факторы, значимые при однофакторном анализе, включены в многофакторный регрессионный анализ, выполненный методом пошагового исключения.

3.6 Прогностическое значение линейной структуры лимфоцитов периферической крови, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка

В первой группе пациентов, подвергнутых хирургическому вмешательству, за время наблюдения прогрессирование заболевания зафиксировано у 9 (36%) из 25 больных. У всех 20 (100%) пациентов второй группы, получающих химиотерапевтическое лечение, отмечено прогрессирование заболевания.

Для пациентов с прогрессированием заболевания I и II групп, характерным оказалось более низкое содержание CD3+ CD19- Т-клеток по сравнению с пациентами без прогрессирования болезни 73,3% – 72,5% – 83,2%, соответственно.

Только для пациентов второй группы, где отмечалось прогрессирование в 100% случаев, медиана НК-клеток в 2 раза превышала показатели пациентов

I группы независимо от клинического течения и составила 21,3% (II группа с прогрессированием), 10,60% и 11,8% (I группа с и без прогрессирования) (Таблица 15).

Таблица 15 – Сравнение показателей системного клеточного иммунитета больных раком желудка в группах до начала лечения в зависимости от прогрессирования

Показатели клеточного иммунитета в крови	I – с прогрессированием (n=9)		I – без прогрессирования (n=16)		p	II – с прогрессированием (n=20)	
	ме-диана	квартили	ме-диана	квартили		ме-диана	квартили
CD3+CD19-	73,30	72,60-74,30	83,20	58,90-85,05	0,320	72,50	64,15-81,80
CD3-CD19+	1,60	1,30-7,90	1,60	1,25-1,90	0,477	1,00	0,60-1,50
CD3-CD16+CD56+	10,60	7,30-15,40	11,80	7,20-27,50	0,629	21,30	9,40-30,40
CD3+CD4+	35,60	25,00-46,60	40,85	29,80-43,95	0,670	37,30	31,95-49,10
CD3+CD8+	32,80	20,50-53,80	33,75	25,60-40,85	0,932	24,70	20,45-33,60
CD16+Perforin+	12,00	11,30-12,10	15,25	8,20-27,20	0,551	19,05	14,60-27,20
CD16ЦТП	70,30	48,40-81,90	66,70	42,05-75,50	0,887	81,90	63,00-90,30
CD8+Perforin+	14,60	13,40-18,70	19,75	16,90-25,30	0,222	23,50	12,80-27,30
CD8ЦТП	52,30	28,80-55,60	57,50	45,30-70,85	0,349	64,30	52,00-72,65
CD3+CD16+CD56+	10,30	7,30-24,60	16,75	11,00-26,10	0,156	11,10	8,65-18,35
CD4+CD25+CD127-	7,00	6,20-7,60	8,70	7,50-11,60	0,073	6,85	5,35-8,40
CD8+CD11b-CD28-	11,80	10,80-13,70	7,50	3,30-12,55	0,065	11,30	7,70-13,20

Таким образом, процент Т- и В-клеток у пациентов I и II групп вне зависимости от наличия прогрессирования, но при значительных расхождениях уровня НК-клеток, где наибольшее значение зафиксировано у пациентов II группы с прогрессированием заболевания, прогнозировать развитие прогрессирования по исходным показателям представляется сложным.

Медиана CD3+CD4+ Т-клеток у всех пациентов соответствовала норме, однако у пациентов II группы отмечалось снижение числа CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов в структуре Т-клеток у больных без

прогрессирования и с прогрессированием заболевания в I группе и больных II группы – 32,80% – 33,75% – 24,70%.

Уровень Т-клеток с внутриклеточным белком перфорином- CD16+Perforin+ повышен у пациентов II группы – 19,05% по сравнению с пациентами I группы с прогрессированием – 12,0%; I группы без прогрессирования – 15,25%. Аналогичная закономерность наблюдалась и у функциональной активности CD16-клеток у пациентов II группы – 81,9% по сравнению с пациентами I группы с прогрессированием – 70,3%; I группы без прогрессирования – 66,7%. Уровень Т-клеток с внутриклеточным белком перфорином – CD8+Perforin+ и функциональная активность CD8-клеток повышены у пациентов II группы – 23,50%, 64,30% по сравнению с пациентами I группы с прогрессированием – 14,60%, 52,30%; I группы без прогрессирования – 19,75%, 57,50%.

Соответственно, у пациентов II группы, спрессированных на фоне проводимого лечения, отмечается снижение уровня ЦТЛ, в частности, CD8+ Т-клеток и повышение уровня CD16+ и CD8+ Т-клеток и их функциональной активности по сравнению с пациентами I группы.

Таким образом, у пациентов с ранними формами РЖ без признаков прогрессирования, отмечается повышение уровня НКТ-клеток по сравнению с пациентами I и II групп с прогрессированием заболевания.

Медиана наблюдения больных составила 18,5 месяцев. Среди пациентов, получающих хирургическое лечение (I группа), за период наблюдения умерли 12% (3/25) больных. В группе пациентов, получающих химиотерапевтическое лечение (II группа) – 50% (10/10).

У всех пациентов I группы и пациентов в динамическом наблюдении показатели «линейных» – Т-, В-, НК-клеток находились в пределах нормы. Только для умерших больных химиотерапевтической группы оказалось характерным относительное снижение числа CD3+ Т-клеток – 65,55% ($p=0,044$) и резкое повышение уровня НК-клеток до 27,4%, т.е. нарушение популяционной структуры лимфоцитов (Таблицы 16, 17).

Таблица 16 – Показатели системного клеточного иммунитета больных раком желудка в зависимости от выживаемости в I группе до начала лечения (n=25)

Показатели клеточного иммунитета в крови	I – умершие (n=3)		I – под наблюдением (n=22)		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD3+CD19-	72,60	68,90-76,00	74,30	71,40-84,80	0,529
CD3-CD19+	1,40	1,30-10,10	1,60	1,20-2,20	0,736
CD3-CD16+CD56+	12,60	5,80-27,30	11,20	7,30-25,00	0,899
CD3+CD4+	39,60	22,60-61,70	39,70	29,60-45,50	0,966
CD3+CD8+	26,60	20,50-53,80	32,80	23,00-41,20	0,834
CD16+Perforin+	8,50	5,90-23,90	12,10	10,40-18,70	0,476
CD16ЦТП	48,40	25,40-82,40	67,00	42,50-75,50	0,645
CD8+Perforin+	14,60	6,90-18,70	19,30	15,90-25,30	0,167
CD8ЦТП	28,80	27,50-58,40	55,60	47,70-66,70	0,335
CD3+CD16+CD56+	15,90	5,30-50,80	14,80	8,70-25,10	1,000
CD4+CD25+CD127-	5,50	5,20-7,50	8,10	7,00-10,00	0,059
CD8+CD11b-CD28-	10,80	9,40-13,70	8,50	6,20-15,30	0,586

Таблица 17 – Показатели системного клеточного иммунитета больных раком желудка в зависимости от выживаемости во II группе до начала лечения (n=20)

Показатели клеточного иммунитета в крови	II – умершие (n=10)		II – под наблюдением (n=10)		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD3+CD19-	65,55	57,30-77,70	78,60	69,60-84,00	0,044
CD3-CD19+	1,40	1,00-2,10	0,65	0,60-1,00	0,073
CD3-CD16+CD56+	27,40	9,40-34,40	15,00	9,30-22,40	0,103
CD3+CD4+	37,30	29,80-51,60	37,00	34,10-46,60	0,969
CD3+CD8+	21,70	20,40-28,10	30,55	24,70-40,90	0,120
CD16+Perforin+	27,20	14,60-41,30	16,80	13,30-20,40	0,063
CD16ЦТП	81,90	80,50-90,10	74,60	60,90-90,30	0,519
CD8+Perforin+	23,50	15,10-27,80	23,50	10,50-27,30	0,519
CD8ЦТП	65,16	58,30-68,90	63,75	45,70-78,40	0,675

CD3+CD16+CD56+	9,20	8,50-11,80	14,05	10,80-20,00	0,184
CD4+CD25+CD127-	6,00	3,80-8,40	7,20	6,20-9,60	0,305
CD8+CD11b-CD28-	10,80	6,80-13,20	11,30	10,20-12,10	0,909

Медиана лимфоцитов с фенотипами CD3+CD4+ и CD3+CD8+Т-клеток у всех пациентов соответствовала нормальному диапазону значений. Однако, отмечается тенденция к снижению уровня лимфоцитов CD8+Т-клеток для умерших пациентов I и II групп – 32,80% и 30,55% против 26,6% и 21,7%, соответственно.

Наиболее низкие показатели Т-клеток с внутриклеточным белком перфорином и, как следствие, низкий уровень цитотоксического потенциала эффекторных клеток отмечается у умерших пациентов I группы, в то же время, их высокий уровень оказался характерным для умерших пациентов II группы – CD16+Perforin+ и CD16ЦТП – 8,50%, 48,40% против 27,20%, 81,90%, соответственно. Количество и функциональная активность CD8+ клеток-эффекторов у исследуемых больных были резко снижены только у умерших больных I группы по сравнению со II группой – 14,6% – 23,5%, 28,80% – 65,16%, соответственно.

Таким образом, у умерших больных с локальными формами РЖ отмечается снижение эффекторных клеток с фенотипами CD16+ и CD8+, а также тенденция к снижению уровня цитотоксических лимфоцитов CD8+Т-клеток у умерших пациентов.

В процессе анализа, различий уровня Т-регуляторных клеток с фенотипами CD3+CD16+CD56+, CD4+CD25+CD127- и CD8+CD11b-CD28- у умерших и выживших пациентов I и II групп не найдено.

Для определения независимых прогностических признаков, влияющих на БРВ и ОВ, нами был выполнен последовательный регрессионный анализ Кокса. В него были включены все переменные из однофакторного анализа с

уровнем $p < 0,05$. Значения показателей взяты в виде их абсолютных величин (Таблица 18).

Таблица 18 – Однофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП от показателей системного клеточного иммунитета больных I группы раком желудка до начала лечения (n=25)

Показатели клеточного иммунитета в крови	ОВ				ВБП			
	p	HR	95% ДИ		p	HR	95% ДИ	
CD3+ CD19-	0,893	0,99	0,91	1,09	0,939	1,00	0,95	1,05
CD3-CD19+	0,304	1,20	0,85	1,69	0,063	1,25	0,99	1,59
CD3-CD16+CD56+	0,807	0,99	0,90	1,09	0,259	0,96	0,90	1,03
CD3+CD4+	0,651	1,02	0,93	1,13	0,942	1,00	0,94	1,06
CD3+CD8+	0,985	1,00	0,92	1,08	0,257	1,03	0,98	1,07
CD16+Perforin+	0,548	0,96	0,83	1,10	0,228	0,95	0,87	1,03
CD16ЦТП	0,417	0,98	0,94	1,03	0,976	1,00	0,97	1,03
CD8+Perforin+	0,181	0,89	0,76	1,05	0,472	0,97	0,90	1,05
CD8ЦТП	0,158	0,96	0,90	1,02	0,269	0,98	0,95	1,01
CD3+CD16+CD 56+	0,265	1,06	0,96	1,17	0,844	0,99	0,92	1,07
CD4+CD25+CD127-	0,128	0,70	0,44	1,11	0,159	0,84	0,67	1,07
CD8+CD11b-CD28-	0,642	1,05	0,84	1,32	0,111	1,11	0,98	1,26

Из таблицы 18 видно, что ни один из исследуемых показателей статистически значимо не влияет на показатели общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования больных ранними и местно-распространенными формами РЖ.

Однако, во II группе выявлено статистически значимое негативное влияние высокого содержания CD3-CD16+CD56+NK- клеток, CD16+Perforin+ Т-клеток и напротив, позитивное влияние CD3+ CD19- Тклеток на ОВ и отрицательное влияние CD3-CD16+CD56+NK клеток и цитотоксического потенциала CD8 клеток (CD8ЦТП) на ВБП (Таблица 19).

Таблица 19 – Однофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП от показателей системного клеточного иммунитета больных II группы раком желудка до начала лечения (n=20)

Показатели клеточного иммунитета в крови	ОВ				ВБП			
	р	HR	95% ДИ		р	HR	95% ДИ	
CD3+CD19-	0,007	0,91	0,85	0,97	0,051	0,96	0,92	1,00
CD3-CD19+	0,684	1,09	0,72	1,65	0,661	1,08	0,76	1,54
CD3-CD16+CD56+	0,007	1,09	1,02	1,16	0,023	1,05	1,01	1,10
CD3+CD4+	0,973	1,00	0,94	1,06	0,597	0,99	0,94	1,04
CD3+CD8+	0,119	0,91	0,81	1,02	0,786	1,01	0,95	1,08
CD16+Perforin+	0,016	1,07	1,01	1,13	0,372	1,02	0,98	1,06
CD16ЦТП	0,438	1,02	0,97	1,07	0,715	0,99	0,96	1,03
CD8+Perforin+	0,373	1,05	0,95	1,15	0,054	1,08	1,00	1,16
CD8ЦТП	0,449	1,02	0,97	1,08	0,018	1,06	1,01	1,11
CD3+CD16+CD56+	0,131	0,88	0,74	1,04	0,938	1,00	0,91	1,09
CD4+CD25+CD127-	0,155	0,78	0,55	1,10	0,972	1,00	0,79	1,27
CD8+CD11b-CD28-	0,444	1,04	0,94	1,16	0,861	0,99	0,91	1,08

Помимо определения влияния показателей системного иммунитета больных РЖ на общую выживаемость и выживаемость без прогрессирования, нами был выполнен последовательный регрессионный анализ Кокса зависимости показателей выживаемости от индексов системного воспаления.

Также, мы использовали как сами лабораторные показатели, так и разделение их на нормальные/ненормальные относительно референсных значений нормы (нейтрофилы $2-6,85 \times 10^9/\text{л}$; лимфоциты $1,10-3,20 \times 10^9/\text{л}$, тромбоциты $180-320 \times 10^9/\text{л}$), как вычисляемую величину индексов НЛИ и ТЛИ, так и их разделение на 3 диапазона значений, которые выделяли с учетом 25-75 квартилей:

Для оценки прогностической ценности индексов на выживаемость, мы использовали:

– НЛИ<1,43 – низкий, НЛИ=1,43-3,05 – нормальный и НЛИ>3,05 – высокий уровень

– ТЛИ<111,6 – низкий, ТЛИ=111,6-208,7 – нормальный и ТЛИ>208,7 – высокий уровень.

Для определения показателей клинических маркеров воспаления, влияющих на БРВ и ОВ, нами был выполнен последовательный регрессионный анализ Кокса. В него были включены все переменные из однофакторного анализа с уровнем $p < 0,05$. Значения показателей взяты в виде их абсолютных величин (Таблицы 20, 21).

Таблица 20 – Однофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП от показателей системного воспаления больных I группы раком желудка до начала лечения (n=25)

Показатели клинических маркеров воспаления		ОВ				ВБП			
		р	HR	95% ДИ		р	HR	95% ДИ	
Показатели периферической крови ($10^9/л$)	нейтрофилы	0,201	1,29	0,87	1,91	0,059	1,23	0,99	1,51
	тромбоциты	0,918	1,00	0,99	1,01	0,059	0,99	0,98	1,00
	лимфоциты	0,811	0,85	0,22	3,22	0,089	1,73	0,92	3,27
Относительные индексы	НЛИ	0,191	1,50	0,82	2,75	0,566	1,10	0,79	1,54
	ТЛИ	0,771	1,00	0,99	1,01	0,120	0,99	0,97	1,00
	НЛИ по диапазонам	0,229	3,34	0,47	23,89	0,880	1,06	0,47	2,39
	ТЛИ по диапазонам	0,588	0,61	0,10	3,63	0,013	0,21	0,06	0,72

Из таблицы 20 следует, что уровень ТЛИ влияет на выживаемость без прогрессирования и является фактором благоприятного прогноза для больных с ранними и местно-распространенными формами рака желудка (Рисунок 8).

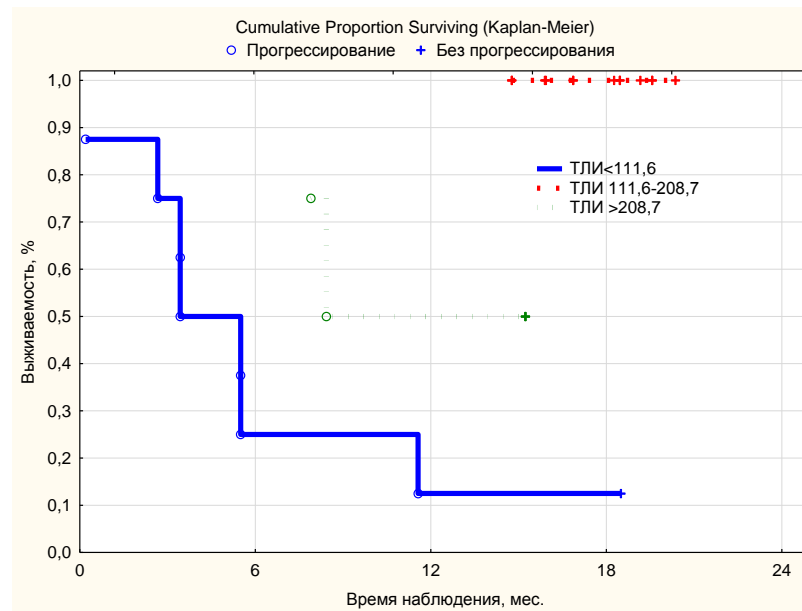


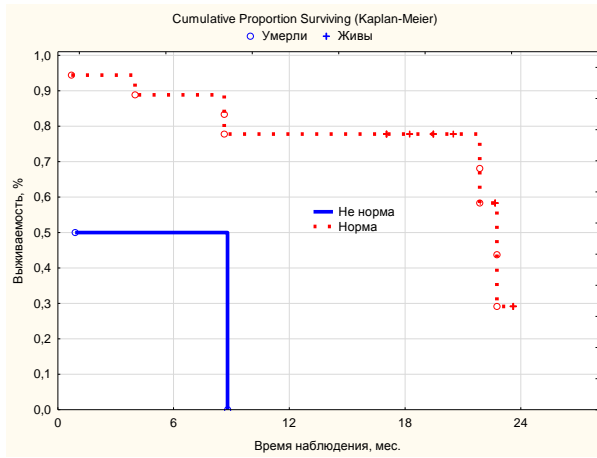
Рисунок 8 – Влияние тромбоцитарно- лимфоцитарного индекса на выживаемость без прогрессирования у больных I группы

Таблица 21 – Однофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП от показателей системного воспаления больных II группы раком желудка до начала лечения (n=20)

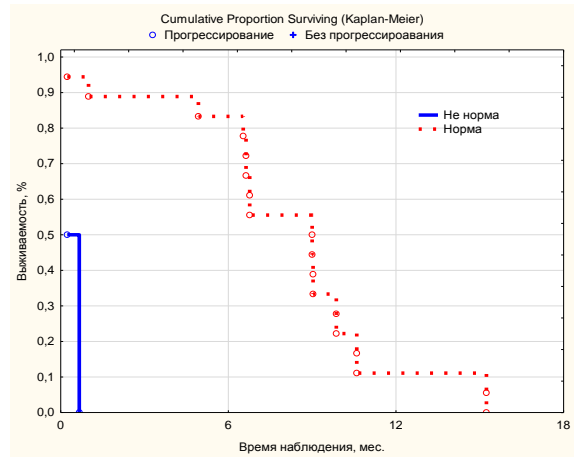
Показатели клинических маркеров воспаления		ОВ				ВБП			
		p	HR	95%ДИ		p	HR	95% ДИ	
Показатели периферической крови ($10^9/л$)	нейтрофилы	0,008	1,33	1,08	1,65	0,010	1,34	1,07	1,67
	тромбоциты	0,006	1,01	1,00	1,02	0,0006	1,01	1,01	1,02
	лимфоциты	0,051	1,72	1,00	2,95	0,946	0,98	0,62	1,56
Относительные индексы	НЛИ	0,343	1,52	0,64	3,60	0,005	2,80	1,36	5,75
	ТЛИ	0,809	1,00	0,99	1,01	0,054	1,01	1,00	1,01
	НЛИ по диапазонам	0,611	0,70	0,18	2,75	0,300	1,90	0,56	6,41
	ТЛИ по диапазонам	0,377	0,59	0,19	1,89	0,136	2,00	0,80	4,97

Таблица 21 иллюстрирует влияние нейтрофилов и тромбоцитов как факторов неблагоприятного прогноза на ОВ и ВБП, однако величина HR была не высокой.

В то же время отмечено, что при повышении уровня НЛИ ухудшается показатель ВБП у больных МРЖ (Рисунки 9-11).

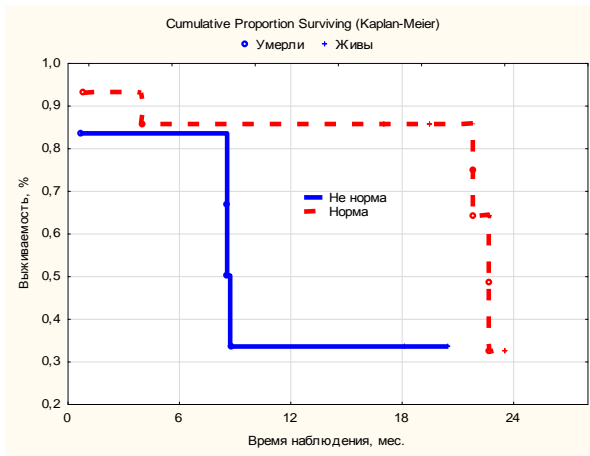


А

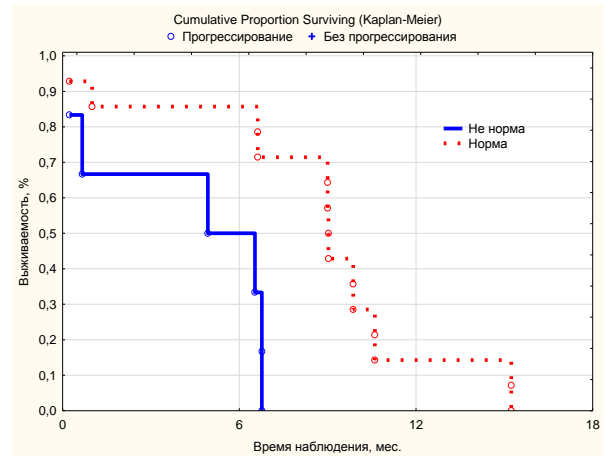


Б

Рисунок 9 – Влияние уровня нейтрофилов (норма/не норма) на показатели выживаемости: А – ОВ; Б – ВБП у больных II группы



А



Б

Рисунок 10 – Влияние уровня тромбоцитов (норма/не норма) на показатели выживаемости: А – ОВ; Б – ВБП у больных II группы

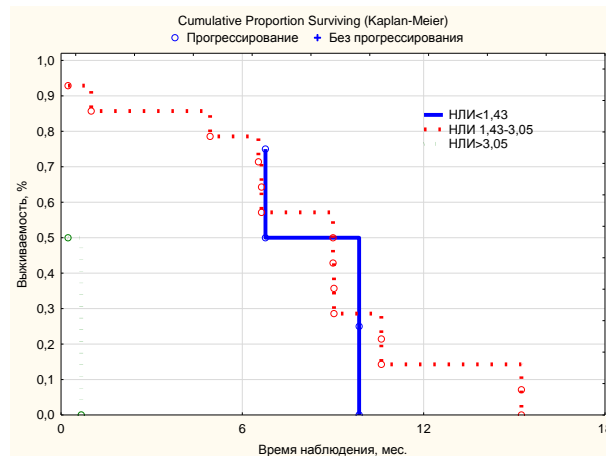


Рисунок 11 – Влияние нейтрофильно-лимфоцитарного индекса на ВБП у больных II группы

Факторы, значимые при однофакторном анализе, включены в многофакторный регрессионный анализ, выполненный методом пошагового исключения.

Проведение многофакторного подгруппового анализа для пациентов I группы невозможно, так как зависимость ВБП и ОВ от показателей системного иммунитета, факторов воспаления и клинических признаков не выявлена (Таблицы 14, 18, 20).

Однако, у пациентов с мРЖ обнаружена взаимосвязь CD3+CD19- Т-клеток и уровня тромбоцитов с ОВ и возраста больных, уровня нейтрофилов и тромбоцитов с ВБП (Таблицы 22, 23).

Таблица 22 – Многофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ от показателей системного клеточного иммунитета, факторов воспаления и клинических признаков у больных II группы раком желудка до начала лечения (n=20)

	В	Стд. ошибка	Вальд	р	HR	95% ДИ	
CD3+CD19-	-0,100	0,042	5,597	0,018	0,905	0,833	0,983
Тромбоциты	0,008	0,003	5,383	0,020	1,008	1,001	1,014

Таблица 23 – Многофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ВБП от показателей системного клеточного иммунитета, факторов воспаления и клинических признаков у больных II группы раком желудка до начала лечения (n=20)

	В	Стд. Ошибка	Вальд	р	HR	95% ДИ	
Возраст	0,100	0,041	5,899	0,015	1,106	1,020	1,199
Нейтрофилы	0,539	0,244	4,878	0,027	1,714	1,063	2,764
Тромбоциты	0,017	0,006	8,841	0,003	1,017	1,006	1,029

Для общей выживаемости получилась значимая ($\chi^2=8,29$, $p=0,001$) модель, включающая 2 независимых прогностических фактора.

Соответственно, увеличение уровня CD3+CD19- Т-клеток в периферической крови больных мРЖ увеличивает ОВ, напротив рост уровня тромбоцитов ухудшает прогноз.

Для выживаемости без прогрессирования получилась значимая (Хи-квадрат=11,8, $p=0,003$) модель, включающая 2 независимых фактора.

Из этого следует, что увеличение возраста, уровня нейтрофилов и тромбоцитов являются факторами неблагоприятного прогноза для ВБП.

Таким образом, для пациентов с метастатическим раком желудка характерно повышение уровня NK-клеток и CD16+ эффекторных Т-лимфоцитов с их цитотоксическим потенциалом, тогда как у больных с ранними и местнораспространенными формами РЖ отмечается увеличение уровня В-клеток и НКТ-клеток. В то же время, у больных II группы с прогрессированием заболевания отмечается снижение уровня ЦТЛ за счет CD8+ Т-клеток, тогда как наибольший уровень Т-клеток отмечается у больных под наблюдением I группы. Помимо этого, у пациентов II группы с летальным исходом в течение времени наблюдения отмечается нарушение линейной структуры лимфоцитов со снижением Т-клеток и ростом NK-клеток, а у пациентов I группы напротив, при равнозначных показателях субпопуляций линейной структуры отмечается лишь снижение эффекторных Т-лимфоцитов.

В итоге, увеличение уровня Т-клеток в периферической крови является фактором благоприятного прогноза для общей выживаемости, тогда как возраст, уровень нейтрофилов и тромбоцитов являются негативными прогностическими факторами для выживаемости без прогрессирования больных мРЖ.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ, У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

В данной работе были изучены образцы опухолевой ткани 45 больных РЖ. Дизайн исследования был аналогичен анализу периферической крови пациенток РЖ. При этом, медиана опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов составила 4,3% (1,9-12,1%), медиана абсолютного числа лимфоцитов в исследуемых образцах составила 428 (168,0-1068,0) клеток.

4.1 Анализ линейной структуры лимфоцитов опухолевой ткани, эффektorных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка

Аналогично исследованиям циркулирующих лимфоцитов периферической крови, исследование линейной структуры лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, проводили с помощью метода многопараметровой проточной цитометрии. Независимо от относительного содержания TILs в исследуемых образцах, иммунофенотип лимфоцитов, инфильтрирующих опухолевую ткань, был изучен у всех 45 пациентов раком желудка (Таблица 24).

Таблица 24 – Показатели локального иммунитета у больных раком желудка до начала лечения

Показатели клеточного иммунитета в ткани	Хирургическая группа (I) (n=25)		Химиотерапевтическая группа (II) (n=20)		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD45+CD14-TILs	6,8	1,9-14,0	3,4	1,9-10,5	0,001
CD3+ CD19-TILs	76,6	65,3-85,9	86,3	72,2-89,9	0,112
CD3-CD19+TILs	6,0	1,6-25,6	4,2	1,7-17,7	0,343
CD3-CD16+CD56+TILs	3,2	1,4-5,2	6,9	3,2-9,8	0,019
CD3+CD4+TILs	37,4	27,8-49,6	37,0	26,6-55,6	0,954
CD3+CD8+TILs	30,6	22,4-43,2	39,0	27,2-54,7	0,204

CD16+Perforin+TILs	0,5	0,0-1,2	4,3	1,9-6,0	0,002
CD16ЦТПТILs	17,9	0,0-30,8	42,3	15,3-56,3	0,181
CD8+Perforin+TILs	1,8	0,7-3,1	7,7	3,0-28,6	0,002
CD8ЦТПТILs	4,6	2,6-9,2	16,7	5,7-65,1	0,034
CD3+CD16+CD56+TILs	5,1	2,3-7,5	11,2	6,1-13,8	0,002
CD4+CD25+CD127-TILs	15,4	6,6-20,9	9,7	4,7-16,2	0,228
CD8+CD11b-CD28-TILs	53,8	43,2-60,3	41,9	33,3-69,6	0,262

Прежде всего оценивали количество линейных (Т-В-НК) популяций лимфоцитов опухолевой ткани больных РЖ.

Анализ структуры TILs больных РЖ показал, что медиана процентного содержания степени инфильтрации лимфоцитами (CD45+CD14-TILs) статистически значимо выше у больных I группы чем у пациентов II группы – 6,8% – 3,4%, ($p=0,000$). При этом, процентное содержание Т-клеток (CD3+ CD19-TILs) выше у пациентов II группы в сравнении с I – 86,3% против 76,6%, однако различие статистически не значимо.

Медиана процентного содержания В-клеток (CD3-CD19+TILs) выше у пациентов I группы чем у больных II группы (6,0% против 4,2%). Медиана НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) статистически значимо выше у пациентов II против I групп составив 6,9-3,2%, ($p=0,019$).

Таким образом, у больных с ранними и местно-распространенными формами по сравнению с метастатическими формами РЖ отмечается увеличение степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами и В-клеток, тогда как у пациентов мРЖ увеличивается процентное содержание Т-клеток и НК-клеток.

В субпопуляционной структуре Т-клеточного звена иммунитета было выявлено, что уровень специфических цитотоксических Т-клеток с фенотипом CD3+CD4+TILs оказался равнозначным у пациентов I и II групп (37,4-37,0%), а значение CD8+ ЦТЛ (CD3+CD8+ TILs) выше у пациентов с мРЖ (30,6% – 39,0%). Вместе с повышенным уровнем НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) у пациентов,

получающих химиотерапевтическое лечение, статистически значимо выше оказалось и содержание эффекторных лимфоцитов CD16 (CD16+Perforin+TILs) 0,5% – 4,3%, ($p=0,000$) и их цитотоксического потенциала, 17,9% – 42,3%. Также, статистически значимым оказалось и содержание эффекторных лимфоцитов CD8+ (CD8+Perforin+TILs) 1,8% против 7,7%, ($p=0,002$) и их цитотоксического потенциала 16,7% и 4,6%, ($p=0,034$).

Соответственно, у больных II группы отмечается повышение уровня цитотоксических CD8 лимфоцитов и содержания CD8+ эффекторных лимфоцитов и их цитотоксического потенциала.

Были проанализированы 3 основные минорные популяции регуляторных клеток лимфоидной дифференцировки, это НКТ-клетки с фенотипом CD3+CD16+CD56+TILs, регуляторные Т-клетки с фенотипом CD4+CD25+CD127-TILs и CD8+ CD11b-CD28-TILs. Отмечено, что для пациентов с мРЖ характерно статистически значимо более высокое процентное содержание НКТ клеток по сравнению с I группой – 11,2% – 5,1% ($p=0,000$).

При исследовании регуляторных Т-клеток с фенотипом CD4+ и CD8+, напротив, высокие показатели были характерны для больных с локальными и местно-распространенными формами РЖ – 15,4% – 9,7%; 53,8% – 41,9%, хотя различия были статистически незначимы.

Из этого следует, что повышение уровня НКТ-клеток в опухолевой ткани свойственно для больных II группы.

4.2 Анализ линейной структуры лимфоцитов опухолевой ткани, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка (в зависимости от стадии заболевания)

При подгрупповом анализе пациентов РЖ в соответствии со стадией заболевания было показано, что медиана процентного содержания степени инфильтрации опухоли (CD45+CD14-TILs) статистически значимо выше у пациентов с I-II стадией заболевания, чем у пациентов с III и IV стадиями заболевания – 12,10% и 1,90% ($p=0,001$); 12,10% и 3,40% ($p=0,008$).

Медиана процентного содержания В-клеток (CD3-CD19+ TILs) выше у пациентов с ранними формами РЖ, чем у больных с местно-распространенными и метастатическими формами РЖ – 16,50% – 3,50%, 16,50% – 4,20%, соответственно.

Также выявлено повышение числа НК-клеток (CD3-CD16+CD56+ TILs) по мере прогрессирования заболевания: с 2,40% при I-II стадиях до 3,80% при III, и до 6,90% при IV стадии болезни (p=0,002) (Таблица 25).

Таблица 25 – Показатели локального иммунитета у больных раком желудка в зависимости от стадии заболевания до начала лечения

Показатели клеточного иммунитета в ткани	I-II (n=11)		III (n=14)		IV (n=20)		p		
	ме-диа-на	квар-тили	ме-диа-на	квар-тили	ме-диа-на	квар-тили	I-II/III	I-II/IV	III-IV
CD45+CD14-TILs	12,10	9,70-19,20	1,90	1,10-6,50	3,40	1,85-10,50	0,001	0,008	0,177
CD3+CD19-TILs	74,40	64,00-89,90	78,30	65,30-85,90	86,25	72,20-89,85	0,603	0,256	0,146
CD3-CD19+TILs	16,50	4,40-27,40	3,50	0,70-25,60	4,20	1,65-17,70	0,261	0,086	0,986
CD3-CD16+CD56+TILs	2,40	1,20-3,10	3,80	3,20-7,80	6,90	3,15-9,80	0,075	0,002	0,318
CD3+CD4+TILs	31,80	25,30-38,40	44,55	33,0-64,00	36,95	26,60-55,55	0,035	0,207	0,335
CD3+CD8+TILs	47,90	20,70-49,90	26,70	22,40-33,90	39,00	27,15-54,70	0,261	0,885	0,071
CD16+Perforin+TILs	0,50	0,20-0,70	0,65	0,00-1,50	4,25	1,90-6,00	0,848	0,001	0,002
CD16ЦПТILs	17,90	15,40-26,90	19,35	0,00-62,90	42,30	15,30-53,60	0,565	0,066	0,636
CD8+Perforin+TILs	1,80	1,40-6,10	0,70	0,60-2,30	7,65	3,00-28,60	0,228	0,038	0,005
CD8ЦПТILs	6,40	3,70-33,50	3,00	2,10-9,20	16,70	5,65-65,05	0,228	0,193	0,034
CD3+CD16+CD56+TILs	5,10	2,30-6,30	5,6	2,30-8,70	11,15	6,10-13,80	0,443	0,000	0,003
CD4+CD25+CD127-TILs	11,20	5,80-17,90	17,80	8,40-20,90	9,65	4,70-16,15	0,372	0,788	0,098
CD8+CD11b-CD28-TILs	49,90	25,40-60,30	53,80	46,10-75,30	41,90	33,30-69,60	0,338	0,982	0,083

Соответственно, представленные результаты полностью согласовываются с результатами подгруппового анализа «линейных» популяций представленными выше.

Структура ЦТЛ с фенотипом CD3+CD8+ соответствовала динамике показателей CD45+CD14-TILs и достигала своего наибольшего значения при раннем РЖ, что составило 47,90% – 26,70% – 39,0%. Процентное содержание лимфоцитов CD4+ (CD3+CD4+TILs) статистически значимо выше при III стадии по сравнению с I-II стадиями – 44,55% против 31,80%, ($p=0,035$). Анализ цитотоксического потенциала клеток-эффекторов показал, что медиана уровня CD16 (CD16+Perforin+ TILs), а также их функциональная активность (CD16ЦТП) статистически значимо выше по мере увеличения стадии заболевания и составляет 0,50% – 0,65% – 4,25% ($p=0,001$; $p=0,025$) и 17,90% – 19,35% – 42,30%, соответственно.

Аналогичная закономерность выявлена для клеток-эффекторов CD8. Медиана процентного содержания CD8 (CD8+Perforin+ TILs) у пациентов с IV стадией заболевания оказалась выше, чем у пациентов с III – 7,65% – 0,70%, ($p=0,005$) и I-II стадиями – 7,65% – 1,80%, ($p=0,038$). Следует отметить, что цитотоксический потенциал CD8 клеток (CD8ЦТП) коррелирует с медианой уровня CD8+Perforin+TILs и при IV-III стадиях, составляя 16,70% – 3,00% ($p=0,03$), а при III – I-II стадиях – 3,00% – 6,40% ($p=0,228$).

Были проанализированы 3 основные минорные популяции регуляторных клеток лимфоидной дифференцировки, это НКТ-клетки (CD3+CD16+CD56+ TILs), регуляторные Т-клетки (CD4+CD25+CD127-TILs), (CD8+CD11b-CD28-TILs). Отмечено, что для пациентов с мРЖ характерно статистически значимо более высокое содержание НКТ-клеток (CD3+CD16+CD56+ TILs) – 5,10% – 5,60% – 11,15% ($p=0,0001$; $p=0,003$). Медианы процентного содержания регуляторных Т-клеток – CD4+CD25+CD127-TILs, CD8+CD11b-CD28-TILs оказались без статистически значимых различий, при этом наименьшее значение отмечено при мРЖ – 9,65% и 41,90%, а наибольшее при местно-распространенных формах РЖ – 17,80% – 53,80% соответственно.

Из этого следует, что у больных мРЖ характерно повышение уровня NKT-клеток в опухолевой ткани, а повышение уровня T-регуляторных CD4+ и CD8+ лимфоцитов свойственно пациентам с местно-распространенными формами рака желудка.

4.3 Клинико-иммунологический анализ иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у больных раком желудка

Нами были исследованы взаимосвязи таких клинических признаков, как возраст пациента (как по годам, так и по группам: до 45 лет, 46-60 лет, старше 60 лет), стадия заболевания, степень дифференции (G), индекс массы тела, тип по Lauren и статус MSI с исследуемыми иммунологическими показателями иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль.

При рассмотрении значимых величин коэффициента корреляции Спирмена ($p < 0,05$) TILs и клинических факторов прогноза, было выявлено следующее:

Группа I – Корреляционный анализ Спирмена показал значимые корреляции ($p < 0,05$), однако сила взаимосвязи их была умеренная:

- пол: у женщин отмечается увеличение числа CD3+CD16+CD56+ TILs ($r_s = 0,41$), CD16+Perforin+ TILs ($r_s = 0,47$), CD16ЦТП TILs ($r_s = 0,47$);

- стадия заболевания: с увеличением стадии снижается % TILs ($r_s = -0,64$), однако растет число CD3+CD4+TILs ($r_s = 0,50$);

- G: с уменьшением степени дифференцировки рака желудка увеличивается число регуляторных T-клеток CD4+CD25+CD127-TILs ($r_s = -0,52$);

- ИМТ: с увеличением ИМТ растет содержание CD3-CD16+CD56+TILs ($r_s = 0,42$), CD3+CD16+CD56+TILs ($r_s = 0,48$) и CD3+CD4+ TILs ($r_s = 0,58$);

- тип Lauren: при диффузном типе увеличивается содержание CD4+CD25+CD127-TILs ($r_s = -0,53$).

Возраст, Статус MSI не показали корреляцию ни с одним из показателей опухоли инфильтрирующих лимфоцитов.

Группа II – Корреляционный анализ Спирмена показал значимые корреляции ($p < 0,05$), однако сила их взаимосвязи была умеренная:

– возраст: с увеличением возраста больных мРЖ уменьшается содержание CD45+CD14-TILs ($r_s=-0,58$) и CD4+CD25+CD127-TILs ($r_s=-0,56$), однако возрастает CD3-CD16+CD56+TILs ($r_s=0,52$), CD3-CD19+TILs ($r_s=0,44$), CD8+Perforin+TILs ($r_s=0,48$);

– пол: у женщин отмечается уменьшение числа CD3+ CD19-TILs ($r_s =-0,52$) и увеличение CD16+Perforin+TILs ($r_s =0,54$);

– G: при низкодифференцированной аденокарциноме желудка увеличивается CD16ЦТП TILs ($r_s =-0,48$), CD4+CD25+CD127-TILs ($r_s=0,55$);

– ИМТ: с увеличением ИМТ увеличивается число CD3+CD8+ ($r_s=0,52$);

– тип Lauren: при диффузном типе при увеличении % TILs ($r_s=-0,46$), CD45+CD14-TILs ($r_s=-0,55$), уменьшается CD8+Perforin+TILs ($r_s=0,53$).

Статус MSI не показал корреляцию ни с одним из показателей опухоли инфильтрирующих лимфоцитов.

Соответственно, низкодифференцированная аденокарцинома характеризуется увеличением числа T-регуляторных клеток в обеих группах, в то же время с увеличением стадии заболевания уменьшается общее содержание TILs в микроокружении опухоли.

4.4 Прогностическое значение линейной структуры лимфоцитов опухолевой ткани, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов у больных раком желудка

Были проанализированы показатели локального иммунитета пациентов, получающих хирургическое и химиотерапевтическое лечение в зависимости от прогноза течения заболевания. В первой группе пациентов, получающих хирургическое лечение, прогрессирование заболевания зафиксировано у 9 (36%) из 25 больных. У всех 20 (100%) пациентов второй группы, получающих химиотерапевтическое лечение, отмечено прогрессирование заболевания.

Прежде всего, следует отметить, что содержание T-клеток (CD3+CD19-TILs) у пациентов с прогрессированием I группы (9) оказалось статистически значимо ниже по сравнению с пациентами без признаков прогрессирования

болезни (16) – 72,70% против 85,60%, ($p=0,029$). Уровень В-лимфоцитов (CD3-CD19+TILs) был сопоставим в обеих группах пациентов. Процентное содержание НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) у пациентов I группы с прогрессированием заболевания статистически значимо выше, чем у пациентов без признаков прогрессирования – 3,80% против 2,80%, ($p=0,033$), где максимальное значение варьирует в диапазоне 10,90% против 4,20%. Однако, содержание Т-клеток (CD3+CD19-TILs) у пациентов с мРЖ статистически значимо выше, чем у пациентов с ранними и местно-распространенными формами РЖ с прогрессированием заболевания, 72,70% против 86,25%, ($p=0,008$).

При сопоставлении I и II групп с прогрессированием заболевания отмечено, что инфильтрация опухолевой ткани лимфоцитами (CD45+CD14-TILs) для пациентов обеих групп оказалось равнозначной – 3,40%, а в группе без прогрессирования в 3 раза выше – 10,90% (Таблица 26).

Таблица 26 – Показатели клеточного иммунитета у больных раком желудка в зависимости от прогрессирования до начала лечения

Показатели клеточного иммунитета в ткани	I – с прогрессированием (n=9)		I – без прогрессирования (n=16)		p	II – с прогрессированием (n=20)	
	медиана	квартили	медиана	квартили		медиана	квартили
CD45+CD14-TILs	3,40	1,40-6,50	10,90	1,90-19,05	0,148	3,40	1,85-10,50
CD3+ CD19-TILs	72,70	57,80-76,60	85,60	68,75-88,40	0,029	86,25	72,20-89,85
CD3-CD19+TILs	4,40	2,60-36,30	6,00	1,15-24,20	0,552	4,20	1,65-17,70
CD3-CD16+CD56+TILs	3,80	3,50-10,90	2,80	1,10-4,20	0,033	6,90	3,15-9,80
CD3+CD4+TILs	34,30	24,70-39,50	38,40	32,40-50,60	0,479	36,95	26,60-55,55
CD3+CD8+TILs	26,70	22,00-30,60	33,90	22,55-49,75	0,074	39,00	27,15-54,70
CD16+Perforin+TILs	0,10	0,00-1,50	0,60	0,10-1,20	0,671	4,25	1,90-6,00
CD16ЦТТТILs	30,80	0,00-50,00	17,60	7,70-25,00	0,294	42,30	15,30-56,30

CD8+Perforin+TILs	2,30	0,70-7,70	1,60	0,70-2,10	0,610	7,65	3,00-28,60
CD8ЦТПТILs	9,20	2,10-15,70	4,15	2,80-6,40	0,533	16,70	5,65-65,05
CD3+CD16+CD56+TILs	8,70	3,40-9,90	4,20	2,30-5,60	0,057	11,15	6,10-13,80
CD4+CD25+CD127-TILs	8,40	6,00-16,40	16,65	10,20-20,90	0,270	9,65	4,70-16,15
CD8+CD11b-CD28-TILs	43,20	29,20-53,80	56,45	46,20-70,15	0,044	41,90	33,30-69,60

Таким образом, при прогрессировании заболевания у больных I группы отмечается снижение уровня Т-клеток и повышение НК-клеток, при этом наибольшее значение Т-клеток зарегистрировано у больных с прогрессированием заболевания II группы. В то же время, у пациентов I группы без прогрессирования заболевания высокий уровень CD3+ Т-клеток сочетался с высокой степенью инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами.

Медиана CD8 клеток (CD3+CD8+TILs) у пациентов I группы была равнозначной, однако у пациентов II группы отмечалось статистически значимое повышение уровня цитотоксических лимфоцитов CD8 (CD3+CD8+TILs) по сравнению с I группой больных с прогрессированием заболевания – 26,70% против 39,00%, ($p=0,045$).

Уровень эффекторных клеток CD16 (CD16+Perforin+TILs) статистически значимо повышался у пациентов II группы – 4,25% по сравнению с пациентами I группы с прогрессированием – 0,10%, ($p=0,003$); I группы без прогрессирования – 0,60%. Уровень эффекторных клеток CD8 (CD8+Perforin+TILs) также повышался у пациентов II группы – 7,65% по сравнению с пациентами I группы с прогрессированием – 2,30%; I группы без прогрессирования – 1,60%. Аналогичная динамика отмечалась и у функциональной активности эффекторных клеток (CD16ЦТПТILs) – наибольшее их значение зафиксировано во II группе по сравнению с пациентами I группы с прогрессированием и без прогрессирования –

42,30% – 30,80% – 16,70%, и CD8ЦТП TILs- 17,60% – 9,20% – 4,15%, соответственно.

Следовательно, у пациентов с мРЖ с прогрессированием заболевания отмечается повышение уровня цитотоксических CD8+ лимфоцитов и эффекторных клеток с их функциональной активностью.

Медиана показателей уровня регуляторных Т-клеток с фенотипами CD4+CD25+CD127-TILs и CD8+CD11b-CD28-TILs выше у пациентов I группы без признаков прогрессирования по сравнению с больными с прогрессированием заболевания – 16,65% против 8,40%; 43,20% против 56,45%, ($p=0,044$), соответственно. Однако медиана НКТ-клеток (CD3+CD16+CD56+TILs) у пациентов II группы оказалась выше чем у пациентов I группы с прогрессированием и без признаков прогрессирования – 16,15% – 8,70% – 4,20%, соответственно. Значит, что уровень НКТ-клеток выше у больных с прогрессированием заболевания мРЖ, тогда как регуляторные CD4+ и CD8+ Т-клетки выше у больных I группы без признаков прогрессирования.

При медиане наблюдения 18,5 месяцев в I группе умерли 12% (3/25) больных, во II – 50% (10/10), соответственно.

У умерших пациентов I группы отмечено самое низкое процентное содержание Т-клеток (CD3+CD19-TILs) – 38,90% по сравнению с наблюдающимися пациентами с ранними и местно-распространенными формами РЖ – 76,60% и пациентами с мРЖ – 87,35% и 84,90%, соответственно. Содержание В-клеток (CD3-CD19+TILs) у умерших пациентов I группы выше по сравнению с пациентами I группы в процессе наблюдения и умершими пациентами II группы, – 14,20% – 5,20% – 4,30%. Напротив, число НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) выше у пациентов II группы по сравнению с I, как у умерших так и у живых пациентов, что составляет – 6,90% – 2,40% – 3,20%, соответственно. При этом, число НК-клеток равнозначно в двух подгруппах II группы (Таблицы 27, 28).

Таблица 27 – Показатели локального иммунитета у больных раком желудка до начала лечения в зависимости от выживаемости в I группе (n=25)

Показатели клеточного иммунитета в ткани	I – умершие (n=3)		I – под наблюдением (n=22)		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD45+CD14-TILs	9,50	2,20-22,70	6,65	1,40-14,00	0,645
CD3+ CD19-TILs	38,90	37,00-80,00	76,60	65,30-86,90	0,086
CD3-CD19+TILs	14,20	1,00-57,80	5,20	1,60-25,60	0,586
CD3-CD16+CD56+TILs	2,40	1,00-7,80	3,20	1,40-5,20	0,769
CD3+CD4+TILs	26,50	18,90-65,70	37,90	31,80-49,60	0,586
CD3+CD8+TILs	16,40	8,40-22,00	32,35	22,70-47,90	0,010
CD16+Perforin+TILs	0,80	0,00-2,00	0,50	0,00-1,20	0,769
CD16ЦПТILs	30,80	0,00-50,00	17,75	0,00-28,60	0,706
CD8+Perforin+TILs	2,30	0,00-6,10	1,60	0,70-3,10	0,933
CD8ЦПТILs	9,20	0,00-33,50	4,15	2,60-6,40	0,738
CD3+CD16+CD56+TILs	3,40	0,60-5,80	5,10	2,30-7,50	0,530
CD4+CD25+CD127-TILs	5,80	0,60-16,40	15,40	8,40-20,90	0,157
CD8+CD11b-CD28-TILs	25,40	16,70-29,20	54,70	46,10-60,30	0,013

Таблица 28 – Показатели локального иммунитета у больных раком желудка до начала лечения в зависимости от выживаемости во II группе (n=20)

Показатели клеточного иммунитета в ткани	II – умершие (n=10)		II – под наблюдением (n=10)		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD45+CD14-TILs	3,90	1,60-21,90	2,30	2,00-10,50	0,791
CD3+CD19-TILs	87,35	70,00-92,00	84,90	72,20-86,60	0,623
CD3-CD19+TILs	4,30	3,10-5,60	4,20	0,70-17,70	0,791
CD3-CD16+CD56+TILs	6,90	3,60-10,10	6,90	2,70-9,50	0,969
CD3+CD4+TILs	29,10	18,20-57,40	42,00	26,60-42,30	0,733
CD3+CD8+TILs	40,50	27,80-75,20	37,00	26,50-46,60	0,570
CD16+Perforin+TILs	3,60	1,20-7,45	4,60	3,90-5,30	0,722
CD16ЦПТILs	17,75	0,00-50,00	55,70	25,10-56,30	0,198
CD8+Perforin+TILs	24,20	9,50-28,60	5,30	1,50-5,80	0,096

CD8ЦТПТILs	14,00	0,00-70,20	19,40	11,50-19,70	0,596
CD3+CD16+CD56+TILs	13,80	12,00-20,40	7,65	4,40-10,30	0,007
CD4+CD25+CD127-TILs	8,65	6,10-16,90	10,15	1,50-16,10	0,677
CD8+CD11b-CD28-TILs	41,35	9,60-47,20	54,20	33,30-69,60	0,142

Таким образом, отмечается увеличение содержания Т-клеток и НК-клеток в опухолевой ткани больных мРЖ, а содержание В-клеток превалирует у умерших пациентов I группы.

Процентное содержание ЦТЛ CD8+ (CD3+CD8+TILs) у умерших пациентов I группы статистически значимо ниже по сравнению с пациентами в процессе наблюдения – 16,40% против 32,35%, (p=0,010). В то же время, процентное содержание Т-хелперов CD4+ (CD3+CD4+TILs) также ниже у умерших пациентов I и II групп по сравнению с оставшимися под наблюдением 26,50% против 37,90%; 29,10% против 42,00%, соответственно. Анализ цитотоксического потенциала клеток-эффекторов показал, что медиана уровня CD16 (CD16+Perforin+TILs) и CD8+ (CD8+Perforin+TILs), а также их функциональная активность (CD16ЦТП), (CD8ЦТП) у умерших пациентов I группы выше чем у оставшихся под наблюдением – 0,80% и 0,50%; 30,80% и 17,75%; 2,30% и 1,60%; 9,20% и 4,15%, а в группе с мРЖ напротив их содержание выше у больных под наблюдением – 4,60% и 3,60%; 55,70% и 17,75%; 24,20% и 5,30%; 19,40% и 14,00%, соответственно.

Из этого следует, что у умерших пациентов I группы самое низкое содержание цитотоксических лимфоцитов CD8+ и эффекторных Т-клеток, а наименьшие значения CD4+ клеток отмечаются у умерших пациентов I и II групп.

При анализе регуляторных Т-клеток отмечено, что для умерших пациентов I группы характерно низкое содержание CD8+ регуляторных клеток (CD8+CD11b-CD28-TILs) по сравнению с пациентами в процессе наблюдения, 25,40% против 54,70%, (p=0,013). Медианы содержания НКТ-клеток (CD3+CD16+CD56+TILs), CD4-регуляторных клеток (CD4+CD25+CD127-TILs) коррелировали с CD8-регуляторными клетками (CD8+CD11b-CD28-TILs). В то

же время, медиана содержания НКТ лимфоцитов у умерших пациентов II группы статистически значимо выше в сравнении с пациентами в процессе наблюдения, 13,80% против 7,65%, ($p=0,007$).

Таким образом, у пациентов под наблюдением с ранними и местно-распространенными формами РЖ отмечается повышение Т-регуляторных клеток, тогда как в группе с мРЖ прослеживается аналогичная тенденция, за исключение уровня НКТ-клеток, где наивысшее значение зафиксировано у умерших больных II группы.

Для определения независимых прогностических признаков, влияющих на БРВ и ОВ, нами был выполнен последовательный регрессионный анализ Кокса. В него были включены все переменные из однофакторного анализа с уровнем $p<0,05$. Значения показателей взяты в виде их абсолютных величин.

При выполнении подгруппового анализа у пациентов I группы обнаружена взаимосвязь ЦТЛ CD8 (CD3+CD8+TILs), регуляторных CD8 клеток (CD8+CD11b-CD28-TILs) с общей выживаемостью, НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) с выживаемостью без прогрессирования и Т-клеток (CD3+CD19-TILs) с ОВ и ВБП (Таблица 29).

Таблица 29 – Однофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП от показателей локального иммунитета I группы у больных раком желудка до начала лечения ($n=25$)

Показатели клеточного иммунитета в ткани	ОВ				ВБП			
	р	HR	95%ДИ		р	HR	95% ДИ	
CD45+CD14-TILs	0,977	1,001	0,920	1,089	0,208	0,945	0,865	1,032
CD3+CD19-TILs	0,021	0,894	0,813	0,983	0,003	0,915	0,862	0,971
CD3-CD19+TILs	0,154	1,055	0,980	1,135	0,197	1,033	0,983	1,086
CD3-CD16+CD56+TILs	0,730	0,945	0,685	1,304	0,011	1,195	1,042	1,369
CD3+CD4+TILs	0,721	0,984	0,899	1,077	0,395	0,977	0,926	1,031
CD3+CD8+TILs	0,026	0,782	0,631	0,970	0,086	0,940	0,876	1,009
CD16+Perforin+TILs	0,984	1,010	0,380	2,681	0,394	0,726	0,348	1,516
CD16ЦТПТILs	1,000	1,000	0,961	1,040	0,169	1,015	0,994	1,036

CD8+Perforin+TILs	0,766	0,961	0,742	1,246	0,772	1,015	0,917	1,123
CD8ЦТПТILs	0,764	1,009	0,954	1,067	0,333	1,014	0,985	1,044
CD3+CD16+CD56+TILs	0,346	0,816	0,536	1,244	0,066	1,152	0,991	1,340
CD4+CD25+CD127-TILs	0,155	0,882	0,742	1,049	0,237	0,946	0,863	1,037
CD8+CD11b-CD28-TILs	0,018	0,935	0,885	0,989	0,064	0,973	0,945	1,002

Для пациентов II группы отмечено влияние НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs), NKT-клеток (CD3+CD16+CD56+TILs) на общую выживаемость; степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами (CD45+CD14-TILs), Т-клеток (CD3+CD19-TILs), В-клеток (CD3-CD19+TILs) на выживаемость без прогрессирования (Таблица 30).

Таблица 30 – Однофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП от показателей локального иммунитета II группы у больных раком желудка до начала лечения (n=20)

Показатели клеточного иммунитета в ткани	ОВ				ВБП			
	р	HR	95% ДИ		р	HR	95% ДИ	
CD45+CD14-TILs	0,484	1,001	0,998	1,004	0,041	1,003	1,000	1,006
CD3+ CD19-TILs	0,215	0,961	0,903	1,023	0,041	0,952	0,908	0,998
CD3-CD19+TILs	0,646	1,017	0,945	1,095	0,045	1,058	1,001	1,117
CD3-CD16+CD56+TILs	0,037	1,202	1,011	1,429	0,053	1,130	0,998	1,280
CD3+CD4+TILs	0,160	0,969	0,927	1,013	0,276	0,985	0,959	1,012
CD3+CD8+TILs	0,108	1,026	0,994	1,058	0,544	1,007	0,985	1,029
CD16+Perforin+TILs	0,858	0,972	0,712	1,326	0,191	0,829	0,626	1,098
CD16ЦТПТILs	0,497	0,991	0,967	1,016	0,551	,994	0,973	1,014
CD8+Perforin+TILs	0,586	1,008	0,980	1,036	0,314	1,013	0,988	1,038
CD8ЦТПТILs	0,132	1,016	0,995	1,037	0,125	1,013	0,996	1,030
CD3+CD16+CD56+TILs	0,027	1,112	1,012	1,221	0,293	1,065	0,947	1,198
CD4+CD25+CD127-TILs	0,962	1,002	0,914	1,099	0,08	0,931	0,859	1,009
CD8+CD11b-CD28-TILs	0,290	0,983	0,953	1,014	0,591	0,994	0,973	1,016

Факторы, значимые при однофакторном анализе, включены в многофакторный регрессионный анализ, выполненный методом пошагового исключения.

Выполнение многофакторного регрессионного анализа Кокса для общей выживаемости I группы не позволило построить значимую математическую модель с независимыми факторами.

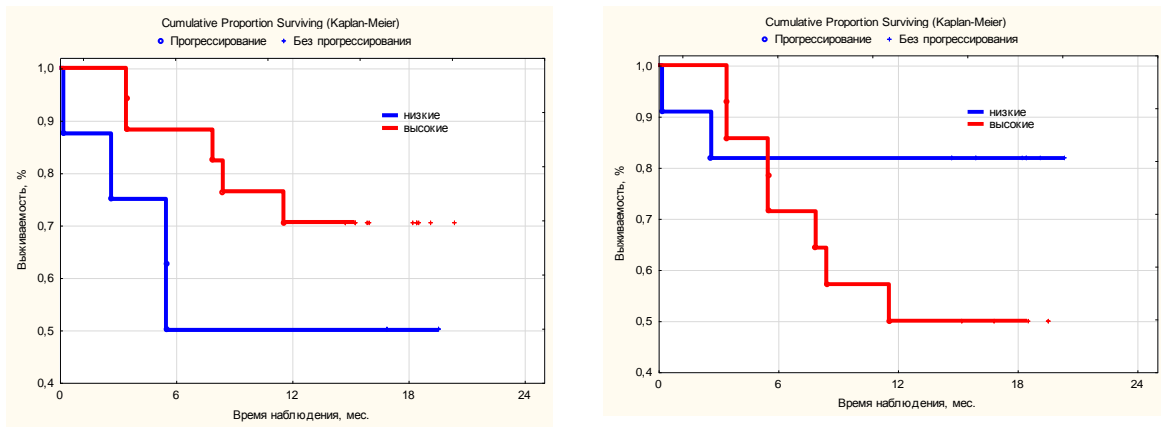
Однако, для выживаемости без прогрессирования I группы получилась значимая ($\chi^2=19,5$, $p=0,00001$) модель, включающая 2 независимых фактора (Таблица 31).

Таблица 31 – Многофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ВБП от показателей локального иммунитета I группы у больных раком желудка до начала лечения (n=25)

	В	Стд. ошибка	Вальд	р	HR	95% ДИ	
CD3+ CD19-TILs	-0,145	0,052	7,883	0,005	0,865	0,782	0,957
CD3-CD16+ CD56+ TILs	0,324	0,123	6,981	0,008	1,382	1,087	1,758

Из таблицы следует, что увеличение процентного содержания Т-клеток с фенотипом CD3+CD19-TILs является благоприятным фактором прогноза для ВБП у больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ, а увеличение уровня НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs), напротив негативно влияет на показатель выживаемости без прогрессирования.

С помощью ROC-кривых найдены пороговые значения, соответствующие оптимальному соотношению чувствительности и специфичности в определении вероятности прогрессирования. Для Т-клеток (CD3+CD19-TILs) пороговое значение – 70%, для НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) – 3% (Рисунок 12).



CD3+CD19-TILs

CD3-CD16+CD56+TILs

Рисунок 12 – ВВП в зависимости от уровня Т-клеток (CD3+CD19-TILs) и НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) у больных I группы раком желудка

Различия между кривыми статистически незначимы (log-rank test) ввиду небольшого объема групп сравнения, однако видно, что высокие показатели 5/17-29,4% Т-клеток (CD3+CD19-TILs) (>70%) снижают вероятность прогрессирования и, следовательно, улучшают показатели ВВП, а высокие значения 7/14 – 50,0% НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) (>3%) – ухудшают ВВП у больных с ранними и местно-распространенными формами рака желудка.

Аналогичным образом исследовалась зависимость ОВ и ВВП от показателей локального иммунитета II группы у больных раком желудка. Для пациентов II группы, выполнение многофакторного регрессионного анализа Кокса для общей выживаемости позволило построить значимую математическую модель ($\chi^2=9,553$, $p=0,008$), где увеличение процентного содержания НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) и НКТ-клеток (CD3+CD16+CD56+TILs) является неблагоприятными факторами прогноза для ОВ больных метастатическим РЖ (Таблица 32).

Таблица 32 – Многофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ от показателей локального иммунитета II группы у больных раком желудка до начала лечения (n=20)

	В	Стд. ошибка	Вальд	р	HR	95% ДИ	
CD3-CD16+ CD56+ TILs	0,222	0,115	3,739	0,053	1,249	0,997	1,564
CD3+CD16+CD56+TILs	0,120	0,048	6,153	0,013	1,127	1,025	1,239

С помощью ROC-кривых найдено пороговое значение только для НКТ-клеток (CD3+CD16+CD56+TILs) – 11%, соответствующее оптимальному соотношению чувствительности и специфичности в определении вероятности умереть (Рисунок 13).

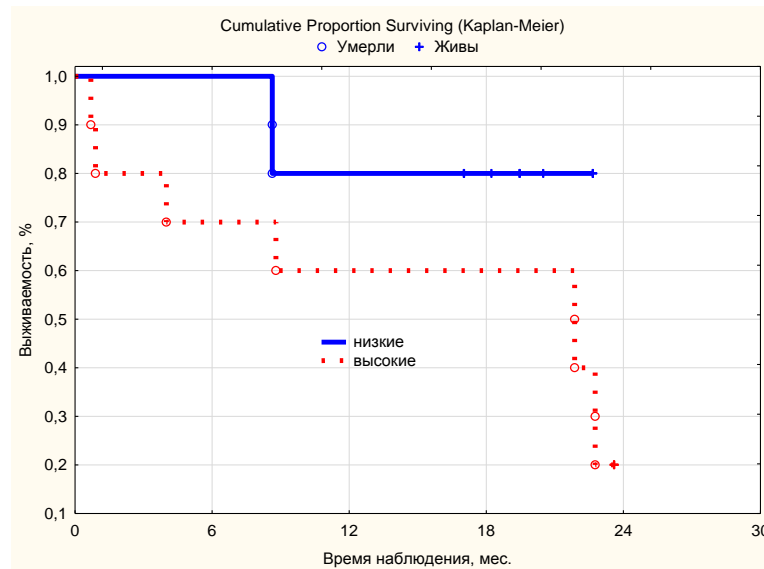


Рисунок 13 – ОВ в зависимости от уровня НКТ-клеток (CD3+CD16+CD56+TILs) у больных II группы раком желудка

Различия между кривыми также статистически незначимы.

Для выживаемости без прогрессирования II группы получилась значимая ($\chi^2=14,8$, $p=0,001$) модель, включающая 2 независимых фактора (Таблица 33).

Таблица 33 – Многофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ВБП от показателей локального иммунитета и клинических показателей II группы у больных раком желудка до начала лечения (n=20)

	В	Стд.Ошибка	Вальд	р	HR	95% ДИ	
CD45+CD14-TILs	0,005	0,002	8,747	0,003	1,005	1,002	1,008
Возраст	0,094	0,032	8,476	0,004	1,098	1,031	1,170

Так как во II группе прогрессирование наступило у всех 20 больных (100%), построение ROC-кривых невозможно. Однако, таблица демонстрирует, что увеличение степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами (CD45+CD14-TILs) и увеличение возраста пациентов оказывают отрицательное влияние на ВБП у больных мРЖ.

Таким образом, у больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ отмечается увеличение степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами, уровня В-клеток и Т-регуляторных клеток с фенотипами CD4+ и CD8+, а у пациентов с метастатическим РЖ напротив, увеличивается процентное содержание Т-клеток, NK-клеток, NKT клеток, цитотоксических CD8+ лимфоцитов и эффекторных лимфоцитов и их цитотоксического потенциала. У больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ увеличение процентного содержания Т-клеток является фактором благоприятного прогноза, напротив увеличение уровня NK-клеток отрицательно влияет на показатель выживаемости без прогрессирования.

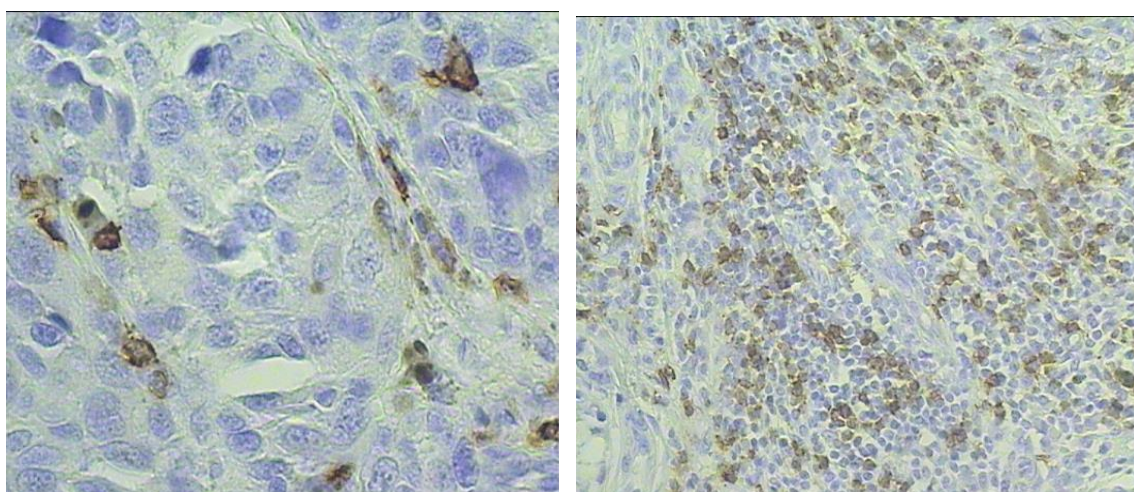
Для пациентов с метастатическим РЖ увеличение процентного содержания NK-клеток и NKT-клеток негативно влияют на показатель общей выживаемости. Увеличение возраста пациентов и степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами увеличивают вероятность прогрессирования у больных метастатическим раком желудка.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ, МЕТОДОМ ИММУНОГИСТОХИМИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

В данной работе были изучены образцы опухолевой ткани 45 больных РЖ. Забор гистологического материала осуществлялся перед началом лечения. Методом иммуногистохимии исследовались интратуморальные (iTILs) и стромальные (sTILs) субпопуляции лимфоцитов CD4+TILs; CD8+TILs, соотношения CD4+/CD8+TILs.

5.1 Анализ CD8+TILs, CD4+TILs и соотношения CD4+/CD8+TILs в лимфоидном инфильтрате у больных раком желудка

В нашем исследовании наличие CD8+TILs отмечалось в 23 (51,1%) исследуемых образцах гистологического материала как стромально, так и интратуморально. В 9 образцах (20%) не обнаружено CD8+ Т-лимфоцитов ни в стромальном, ни в интратуморальном пространстве, интратуморально не обнаружено в 11(24,4%), стромально – в 22 случаях (48,8%) (Таблица 34, Рисунок 14).



А

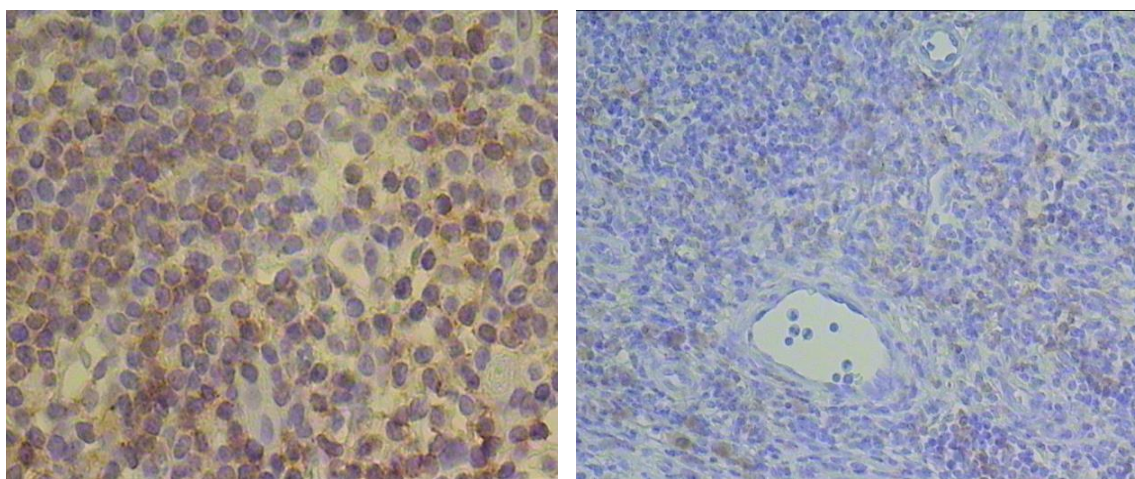
Б

Рисунок 14 – Иммуногистохимический анализ степени инфильтрации CD8+ Т-лимфоцитами в лимфоидном инфильтрате рака желудка: А – интратуморальная инфильтрация опухоли (x40); Б – перитуморальная инфильтрация опухоли (x20)

Инtratуморальная инфильтрация опухоли CD8+TILs во всех случаях преобладала над стромальной инфильтрацией. В 27 (79,4%) случаях отмечалась диффузная инtratуморальная лимфоидная инфильтрация CD8+TILs, в 7(20,5%) случаях – в виде отдельных очаговых скоплений лимфоидных клеток. Стромальная инфильтрация опухоли была представлена преимущественно незначительными скоплениями CD8+TILs (2-3 клетки), расположенными в соединительнотканых прослойках между гнездами клеток железистых клеток желудка, внутри гнезд клеток опухоли отмечались редкие единичные CD8+TILs.

Из рисунка 14 следует, что более высокие показатели CD8TILs коррелировали с выраженной общей лимфоцитарной инфильтрацией опухоли.

В то же время, наличие CD4TILs отмечалось в 25 (55,5%) исследуемых образцах гистологического материала как стромально, так и инtratуморально. В 22 образцах (48,8%) не обнаружено CD3+CD4+TILs ни в стромальном, ни в инtratуморальном пространстве, инtratуморально не обнаружено в 14 (31,1%), стромально – в 20 случаях (44,4%) (Таблица 34, Рисунок 15).



А

Б

Рисунок 15 – Иммуногистохимический анализ степени инфильтрации CD4+ Т-лимфоцитами в лимфоидном инфильтрате рака желудка: А – инtratуморальная инфильтрация опухоли (x20); Б – инtratуморальная инфильтрация опухоли (x10)

Инtratуморальная инфильтрация опухоли CD4+TILs имела диффузно-очаговый характер и во всех случаях преобладала над стромальной инфильтрацией. Инtratуморальная инфильтрация опухоли была представлена преимущественно незначительными скоплениями CD4+TILs (2-3 клетки), расположенными в соединительнотканых прослойках между гнездами железистых клеток желудка, внутри гнезд клеток опухоли отмечались редкие единичные CD4+TILs.

Таблица 34 – Анализ содержания CD8+TILs, CD4+TILs в лимфоидном инфильтрате у больных раком желудка до начала лечения (n=45)

Показатели клеточного иммунитета в ткани	Распределение TILs	Наличие TILs	Число больных (n=45)	%
CD4+TILs (кл/п.зр.)	CD4+iTILs	–	14	31,1
	CD4+sTILs	–	20	44,4
	CD4+iTILs, CD4+sTILs	+	25	55,5
	CD4+iTILs, CD4+sTILs	–	22	48,8
CD8+TILs (кл/п.зр.)	CD8+iTILs	–	11	24,4
	CD8+sTILs	–	22	48,8
	CD8+iTILs, CD8+sTILs	+	23	51,1
	CD8+iTILs, CD8+sTILs	–	9	20
«+» – наличие экспрессии; «–» – отсутствие экспрессии				

Однако, наличие соотношения CD4+/CD8+TILs отмечалось в 31(68,8%) исследуемых образцах гистологического материала как стромально, так и инtratуморально. В 14 образцах (31,1%) не обнаружено CD4+/CD8+TILs ни в стромальном, ни в инtratуморальном пространстве, инtratуморально не обнаружено в 9 (20%), стромально – в 14 случаях (31,1%), соответственно.

При проведении подгруппового анализа выявлено, что число CD4+sTILs, CD8+sTILs, CD4+/CD8+sTILs статистически значимо выше в I группе по сравнению со II, у пациентов которой данные субпопуляции sTILs не встречались (медианы, 21,9 против 0, p=0,0003; 38,0 против 0, p=0,000004; CD4+/CD8+,

$p=0,00001$ соответственно). Достоверная связь наименьшего значения CD4+iTILs и CD8+iTILs реже отмечалась у пациентов с метастатическим РЖ ($p=0,02$, $r_s=0,70$; $p=0,0027$, $r_s=0,65$) по сравнению с локализованными стадиями заболевания (Таблица 35).

Таблица 35 – Показатели опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) у больных I и II групп раком желудка до начала лечения (n=45)

Показатели клеточного иммунитета в ткани		Хирургическая группа (I) (n=25)		Химиотерапевтическая группа (II) (n=20)		p	Всего	
		медиана	квартили	медиана	квартили		медиана	квартили
CD4+ TILs (кл/п.зр.)	CD4+TILs	22,2	10,5-38,5	0,4	0-1,1	0,001	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	0,003	0,2	0-21,9
CD8+ TILs (кл/п.зр.)	CD8+TILs	53,5	39,1-106,9	3,0	0-9,0	0,002	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	0,004	1,3	0-38,0
CD4+/CD8+ TILs	CD4+/CD8+TILs	0,35	0,19-0,54	0,04	0-0,32	0,001	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

При проведении анализа соотношения интралимфоцитарного и стромального расположения иммунных клеток в опухолевой ткани отмечено, что для больных I группы характерно преобладание содержания CD4+sTILs, CD8+sTILs – 80% и 52%, соответственно. А у больных II группы наблюдается преобладание содержания CD4+iTILs, CD8+iTILs – 40% и 60%, соответственно или различие интралимфоцитарного и стромального компонентов для CD4+TILs, CD8+TILs не более 10%, (55% и 35%, соответственно) (Таблица 36, Рисунок 16).

Таблица 36 – Соотношение компонентов TILs (iTILs, sTILs) у больных I и II групп раком желудка до начала лечения (n=45)

Показатели клеточного иммунитета в ткани		Хирургическая группа (I) (n=25)		Химиотерапевтическая группа (II) (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

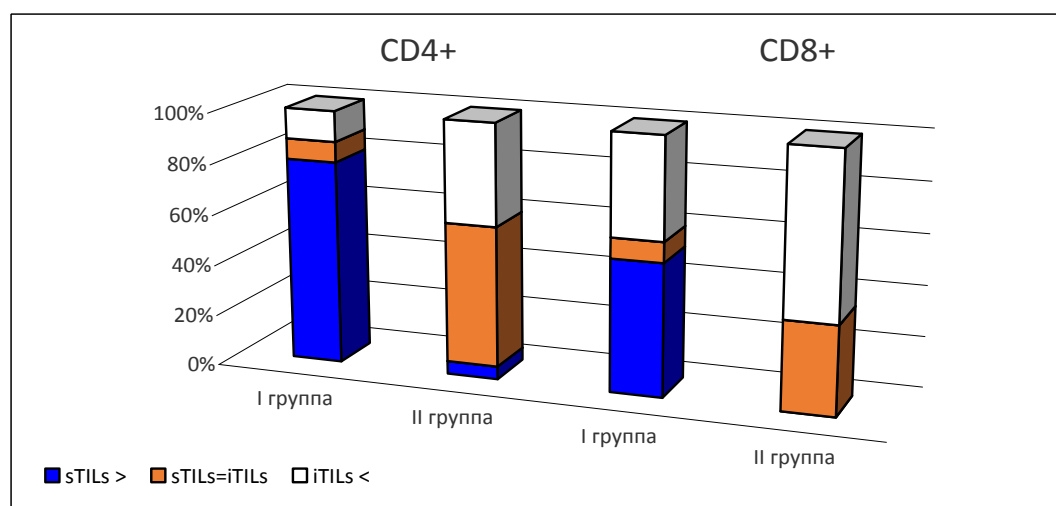


Рисунок 16 – Соотношение интратуморального и перитуморального распределения CD4+TILs, CD8+TILs и CD4+ / CD8+TILs

Для соотношения CD4+ / CD8+TILs отмечена аналогичная закономерность. Для больных I группы характерно преобладание CD4+ / CD8+sTILs – 60,0% и 15,0%, равнозначное число (+/-10%) iTILs и sTILs отмечено у больных II группы – 45,0% и 12,0%.

Таким образом, снижение содержания интратуморальных и отсутствие стромальных CD4+TILs, CD8+TILs, CD4+ / CD8+TILs характерно для пациентов с

метастатическим раком желудка. Кроме этого, для больных II группы распределение TILs в опухоли между sTILs и iTILs было равномерным.

5.2 Анализ CD8+TILs, CD4+TILs и соотношения CD4+/CD8+TILs

в лимфоидном инфильтрате у больных раком желудка

(в зависимости от стадии заболевания)

При подгрупповом анализе пациентов РЖ в соответствии со стадией заболевания было выявлено, что содержание CD4+TILs, CD4+ sTILs, CD8+iTILs, CD8+sTILs, CD8+TILs, CD4+/CD8+sTILs и CD4+/CD8+TILs статистически значимо снижается по мере увеличения стадии заболевания, с I-II к IV стадией (Таблица 37).

Таблица 37 – Показатели CD8+TILs, CD4+TILs и соотношение CD4+/CD8+TILs в зависимости от стадии заболевания у больных раком желудка до начала лечения (n=45)

Показатели клеточного иммунитета в ткани		I-II (n=11)		III (n=14)		IV (n=20)		p		
		ме- диа- на	квар- тили	ме- диа- на	квар- тили	ме- диа- на	квар- тили	I-II / III	I-II / IV	III-IV
CD4+ TILs (кл/п.зр.)	CD4+ iTILs	1,10	0,20- 15,70	0,90	0,40- 2,1	0,20	0- 1,05	0,563	0,037	0,079
	CD4+ sTILs	21,90	13,10- 27,80	10,10	6,00- 26,5	0,00	0- 0,00	0,335	0,004	0,001
	CD4+ TILs	22,50	20,50- 44,60	13,15	8,90- 38,5	0,40	0- 1,05	0,146	0,001	0,002
CD8+ TILs (кл/п.зр.)	CD8+ iTILs	28,30	24,10- 49,80	9,90	1,10- 37,3	2,95	0- 9,00	0,146	0,032	0,038
	CD8+ sTILs	26,80	7,60- 44,00	40,90	11,70- 58,5	0,00	0- 0,00	0,721	0,004	0,001
	CD8+ TILs	64,80	49,80- 117,40	46,30	16,60- 106,9	2,95	0- 9,00	0,285	0,004	0,005
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	0,092
	CD4+/ CD8+sTILs	0,50	0,38- 1,22	0,45	0,00- 0,5	0,00	0- 0,00	0,116	0,04	0,002
	CD4+/ CD8+TILs	0,35	0,32- 0,61	0,29	0,19- 0,5	0,04	0- 0,32	0,528	0,024	0,034

Однако, при оценке соотношения зависимости расположения iTILs и sTILs CD4+TILs, CD8+TILs и CD4+/CD8+TILs в обеих группах достоверных различий не найдено (Таблицы 38, 39).

Таблица 38 – Показатели CD4+TILs, CD8+TILs и соотношение CD4+/CD8+TILs в зависимости от расположения лимфоцитов у больных I группы раком желудка до начала лечения (n=25)

Показатели клеточного иммунитета в ткани	iTILs		sTILs		TILs		p		
	ме-диа-на	квар-тили	ме-диа-на	квар-тили	ме-диа-на	квар-тили	iTILs-sTILs	iTILs-TILs	sTILs-TILs
CD4+ TILs (кл/п.зр.)	1,10	0,40-7,40	21,90	7,70-26,50	22,50	10,50-38,50	0,007	0,002	0,009
CD8+ TILs (кл/п.зр.)	24,10	4,90-37,30	38,00	11,70-54,90	53,50	39,10-106,90	0,236	0,009	0,006
CD4+/CD8+ TILs	0,06	0,01-0,59	0,48	0,20-0,61	0,35	0,19-0,54	0,072	0,048	0,040

Таблица 39 – Показатели CD8+TILs, CD4+TILs и соотношение CD4+/CD8+TILs в зависимости от расположения лимфоцитов у больных II группы раком желудка до начала лечения (n=20)

Показатели клеточного иммунитета в ткани	iTILs		sTILs		TILs		p		
	ме-диа-на	квар-тили	ме-диа-на	квар-тили	ме-диа-на	квар-тили	iTILs-sTILs	iTILs-TILs	sTILs-TILs
CD4+ TILs (кл/п.зр.)	0,20	0,00-1,05	0,00	0,00-0,00	0,40	0,00-1,05	0,066	0,109	0,003
CD8+ TILs (кл/п.зр.)	2,95	0,00-9,00	0,00	0,00-0,00	2,95	0,00-9,00	0,001	0,109	0,001
CD4+/CD8+ TILs	0,04	0,00-0,27	0,00	0,00-0,00	0,04	0,00-0,32	0,11	0,109	0,11

Соответственно, отмечено влияние стадии заболевания на субпопуляции Т-хелперов и ЦТЛ в опухолевой ткани, определяемых методом иммуногистохимии. Именно, уменьшение их содержания как в интратуморальном пространстве так и

в строме опухоли по мере увеличения стадии заболевания. В то же время, достоверных различий между содержанием iTILs, sTILs и TILs не найдено.

5.3 Клинико-иммуногистохимический анализ лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль у больных раком желудка

Нами были исследованы взаимосвязи таких клинических признаков, как возраст пациента (как по годам, так и по группам: до 45 лет, 46-60 лет, старше 60 лет), стадия заболевания, степень дифференции (G), индекс массы тела, тип по Lauren и статус MSI с исследуемыми иммунологическими показателями иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль.

При рассмотрении значимых величин коэффициента корреляции Спирмена ($p < 0,05$) TILs и клинических факторов прогноза, было выявлено следующее:

Группа I – Корреляционный анализ Спирмена показал значимые корреляции ($p < 0,05$), однако сила взаимосвязи их была умеренная:

- возраст – с увеличением возраста больных увеличивается содержание CD8+ iTILs ($r_s = 0,44$);

- ИМТ – с увеличением ИМТ растет содержание CD4+iTILs, CD4+sTILs, CD4+TILs ($r_s = 0,55$; $r_s = 0,53$; $r_s = 0,60$) и CD8+iTILs, CD8+sTILs, CD8+TILs, ($r_s = 0,43$; $r_s = 0,48$; $r_s = 0,47$).

Пол, стадия заболевания, степень дифференцировки, тип по Lauren и статус MSI не показали корреляцию ни с одним из показателей опухоли инфильтрирующих лимфоцитов.

Группа II – Корреляционный анализ Спирмена показал отсутствие значимых корреляций показателей опухоли инфильтрирующих лимфоцитов с клиническими признаками.

Соответственно, при увеличении возраста больных растет содержание интратуморальных цитотоксических лимфоцитов у больных ранним и местно-распространенным РЖ. В то же время, взаимосвязи Т-хелперов и ЦТЛ в опухолевой ткани с клиническими признаками у больных мРЖ не найдено.

5.4 Сравнение метода проточной цитометрии и иммуногистохимического анализа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль у больных раком желудка

Проведен анализ конкордантности двух методов исследования по определению CD3+CD4+TILs и CD3+CD8+TILs методом проточной цитометрии и CD4+TILs, CD8+TILs методом иммуногистохимии у больных раком желудка. Для CD4+iTILs и CD3+CD4+TILs найдена значимая отрицательная корреляция ($r_s=-0,138$; $p=0,365$). Для CD8+iTILs и CD3+CD8+TILs корреляция была не значимой (Таблица 40).

Таблица 40 – Корреляция показателей CD4+TILs, CD8+TILs и CD3+CD4+TILs и CD3+CD8+TILs, определенных методом проточной цитометрии и иммуногистохимии до начала лечения у больных раком желудка (n=45)

Показатели клеточного иммунитета в ткани		r_s – коэффициент корреляции	p
CD3+CD4+TILs	CD4+iTILs	-0,324	0,029
	CD4+sTILs	-0,004	0,974
	CD4+TILs	-0,202	0,183
CD3+CD8+TILs	CD8+iTILs	-0,138	0,365
	CD8+sTILs	-0,276	0,066
	CD8+TILs	-0,119	0,437

Таким образом, измерение CD3+CD4+TILs методом проточной цитометрии и CD4+iTILs методом иммуногистохимии имеет разнонаправленный характер.

5.5 Прогностическое значение содержания CD4+TILs, CD8+TILs и соотношения CD4+/CD8+TILs в лимфоидном инфильтрате у больных раком желудка

Были проанализированы ИГХ показатели пациентов, получающих хирургическое и химиотерапевтическое лечение в зависимости от прогноза течения заболевания. В I группе пациентов, получающих хирургическое лечение, прогрессирование заболевания зафиксировано у 9 (36%) из 25 больных. Прогрессирование заболевания у пациентов II группы, получающих химиотерапевтическое лечение, отмечено в 100% случаях (Таблица 41).

Таблица 41 – Показатели CD4+TILs, CD8+TILs и соотношение CD4+/CD8+TILs до начала лечения в зависимости от прогрессирования у больных раком желудка (n=45)

Показатели клеточного иммунитета в ткани		I – с прогрессированием (n=9)		I – без прогрессирования (n=16)		p	II – с прогрессированием (n=20)	
		медиана	квартили	медиана	квартили		медиана	квартили
CD4+ TILs (кл/п.зр.)	CD4+iTILs	1,20	0,20-13,50	0,60	0,40-5,7	0,977	0,20	0-1,05
	CD4+sTILs	7,70	6,00-26,30	21,90	10,10-27,8	0,319	0,00	0-0,00
	CD4+TILs	15,80	8,90-39,80	22,50	13,10-38,5	0,496	0,40	0-1,05
CD8+ TILs (кл/п.зр.)	CD8+iTILs	10,10	1,10-18,50	28,30	4,90-43,5	0,363	2,95	0-9,00
	CD8+sTILs	38,00	26,80-54,90	29,25	9,65-58,5	0,887	0,00	0-0,00
	CD8+TILs	53,50	39,10-73,40	59,60	38,10-112,2	0,571	2,95	0-9,00
CD4+/CD8+ TILs	CD4+/ CD8+iTILs	0,73	0,01-1,09	0,05	0,01-0,2	0,292	0,04	0-0,27
	CD4+/ CD8+sTILs	0,20	0,00-0,48	0,51	0,45-0,9	0,035	0,00	0-0,00
	CD4+/ CD8+TILs	0,23	0,18-0,54	0,36	0,25-0,6	0,379	0,04	0-0,32

Из таблицы видно, что при прогрессировании заболевания у больных I группы отмечается статистически значимое увеличение соотношения стромальных CD4+ TILs к CD8+ TILs, 0,20 кл/п.з против 0,51 кл/п.з, (p=0,035).

За время наблюдения 18,5 месяцев [15,2; 20,4], в I группе умерли 12% (3/25) больных, во II – 50% (10/10), соответственно (Таблицы 42, 43).

Таблица 42 – Показатели локального иммунитета до начала лечения в зависимости от выживаемости в I группе больных раком желудка (n=25)

Показатели клеточного иммунитета в ткани		I – умершие (n=3)		I – под наблюдением (n=22)		p
		медиана	квартили	медиана	квартили	
CD4+ TILs (кл/п.зр.)	CD4+iTILs	0,20	0,00-1,1	1,20	0,40-13,5	0,165
	CD4+sTILs	22,80	6,00-38,7	21,90	7,70-26,5	0,644
	CD4+TILs	23,00	6,00-39,8	22,20	10,50-38,5	0,967
CD8+ TILs (кл/п.зр.)	CD8+iTILs	38,00	9,70-124,0	21,30	1,10-37,3	0,224
	CD8+sTILs	43,80	26,80-100,8	36,85	7,60-54,9	0,377
	CD8+TILs	64,80	53,50-225,0	51,10	35,70-106,9	0,295
CD4+/ CD8+ TILs	CD4+/CD8+iTILs	0,01	0,00-0,0	0,07	0,01-0,6	0,085
	CD4+/CD8+sTILs	0,38	0,00-0,9	0,49	0,20-0,6	0,613
	CD4+/CD8+TILs	0,18	0,00-0,4	0,36	0,23-0,6	0,121

Таблица 43 – Показатели локального иммунитета до начала лечения в зависимости от выживаемости в II группе больных раком желудка (n=20)

Показатели клеточного иммунитета в ткани		II – умершие (n=10)		II – под наблюдением (n=10)		p
		медиана	квартили	медиана	квартили	
CD4+ TILs (кл/п.зр.)	CD4+iTILs	0,25	0,50	0,20	0,00-4,20	0,633
	CD4+sTILs	0,00	0,00	0,00	0,00-0,20	0,078
	CD4+TILs	0,25	0,50	0,40	0,00-4,20	0,633
CD8+ TILs (кл/п.зр.)	CD8+iTILs	0,60	4,20	4,60	1,70-9,00	0,152
	CD8+sTILs	0,00	0,00	0,00	0,00-1,30	0,078
	CD8+TILs	0,60	4,20	5,90	1,70-9,00	0,152
CD4+/ CD8+ TILs	CD4+/ CD8+iTILs	0,02	0,38	0,04	0,00-0,16	0,662
	CD4+/ CD8+sTILs	0,00	0,00	0,00	0,00-0,15	0,078
	CD4+/ CD8+TILs	0,02	0,38	0,05	0,00-0,25	0,662

Таким образом, различий в содержании исследуемых показателей у умерших больных и пациентов под наблюдением в I и II группах не найдено.

Для определения независимых прогностических признаков, влияющих на БРВ и ОВ, нами был выполнен последовательный регрессионный анализ Кокса. В него были включены все переменные из однофакторного анализа с уровнем $p < 0,05$. Значения показателей взяты в виде их абсолютных величин.

При выполнении подгруппового анализа у пациентов I и II групп обнаружена взаимосвязь соотношения CD4+/CD8+iTILs с выживаемостью без прогрессирования у больных ранними и местно-распространенными формами рака желудка (Таблицы 44, 45).

Таблица 44 – Однофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП от показателей локального иммунитета I группы у больных раком желудка до начала лечения (n=25)

Показатели клеточного иммунитета в ткани		ОВ				ВБП			
		p	HR	95% ДИ		p	HR	95% ДИ	
CD4+ TILs	CD4+TILs	0,902	1,00	0,94	1,06	0,540	0,99	0,95	1,03
	CD4+iTILs	0,477	0,51	0,08	3,24	0,789	1,01	0,92	1,12
	CD4+sTILs	0,780	1,01	0,95	1,06	0,478	0,98	0,94	1,03
CD8+ TILs	CD8+TILs	0,116	1,02	1,00	1,04	0,921	1,00	0,99	1,01
	CD8+iTILs	0,149	1,02	0,99	1,05	0,665	0,99	0,97	1,02
	CD8+sTILs	0,383	1,01	0,99	1,03	0,818	1,00	0,99	1,02
CD4+/ CD8+ TILs	CD4+/ CD8+TILs	0,195	0,02	0,00	7,17	0,793	0,77	0,11	5,42
	CD4+/ CD8+iTILs	0,324	0,00	0,00	406676,00	0,035	3,26	1,09	9,78
	CD4+/ CD8+sTILs	0,726	0,60	0,03	10,70	0,141	0,23	0,03	1,62

Из таблицы видно, что CD4+/CD8+iTILs являются фактором неблагоприятного исхода для выживаемости без прогрессирования у больных ранним и местно-распространенным РЖ (HR=3,264; 95% ДИ 1,09-9,78, $p=0,035$).

Таблица 45 – Однофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП от показателей локального иммунитета II группы у больных раком желудка до начала лечения (n=20)

Показатели клеточного иммунитета в ткани		ОВ				ВБП			
		р	HR	95% ДИ		р	HR	95% ДИ	
CD4+ TILs	CD4+TILs	0,473	0,80	0,44	1,46	0,161	1,12	0,95	1,32
	CD4+iTILs	0,518	0,82	0,44	1,51	0,158	1,27	0,91	1,76
	CD4+sTILs					0,311	1,16	0,87	1,55
CD8+ TILs	CD8+TILs	0,469	0,95	0,84	1,09	0,185	1,03	0,99	1,07
	CD8+iTILs	0,538	0,96	0,84	1,09	0,147	1,05	0,98	1,12
	CD8+sTILs					0,384	1,06	0,93	1,20
CD4+/ CD8+ TILs	CD4+/ CD8+TILs	0,681	2,22	0,05	98,18	0,363	3,51	0,24	52,28
	CD4+/ CD8+iTILs	0,557	3,03	0,07	122,84	0,377	3,35	0,23	48,75
	CD4+/ CD8+sTILs					0,975	0,91	0,00	287,59

Выполнение многофакторного регрессионного анализа Кокса для общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования обеих групп не выполнимо.

Соответственно, повышение соотношения CD4+/CD8+iTILs явилось неблагоприятным прогностическим фактором в отношении ВБП у больных I группы.

В то же время, увеличение соотношения CD4+sTILs/CD8+sTILs и уровня CD4+/CD8+iTILs явилось неблагоприятным прогностическим фактором для больных с прогрессированием заболевания и в отношении ВБП у больных I группы, соответственно.

ГЛАВА 6. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ДО И В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

У 20 пациентов химиотерапевтической группы, представленных метастатическим РЖ, был выполнен двукратный анализ показателей клеточного состава периферической крови и опухолевой ткани. У 15 больных исследование проведено в динамике до начала лечения и после 3-4 курсов ПХТ (во время первого контрольного обследования).

6.1 Динамика показателей иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови в процессе лечения у больных метастатическим раком желудка

При изучении «линейной» структуры системного иммунитета периферической крови до и в процессе химиотерапии достоверных различий не найдено. Медиана уровня CD3+CD19-Т-клеток до и в процессе х/т равнозначна 75,4-77,9%. Медиана CD3-CD16+CD56+ NK-клеток снижалась, но различие не было статистически значимым – 20,2% против 13,8%. Напротив, у медианы CD3-CD19+ В-клеток отмечена тенденция к росту – 0,7% против 1,3% (Таблица 46).

Таблица 46 – Показатели системного клеточного иммунитета до и в процессе лечения у больных II группы раком желудка (n=20)

Показатели клеточного иммунитета в крови	До химиотерапии		В процессе химиотерапии		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD3+CD19-	75,4	66,9-81,8	77,9	65,6-85,2	0,090
CD3-CD19+	0,7	0,6-1,5	1,3	0,6-2,6	0,053
CD3-CD16+CD56+	20,2	9,4-24,6	13,8	9,3-26,2	0,864
CD3+CD4+	37,2	29,8-51,6	39,7	34,8-47,3	0,233
CD3+CD8+	24,7	20,4-36,2	31,4	28,3-35,7	0,140
CD16+Perforin+	17,7	14,6-27,2	14,1	5,9-20,2	0,031
CD16ЦТП	81,9	60,9-93,2	64,3	49,2-83,4	0,009

CD8+Perforin+	22,9	10,5-27,3	17,1	11,5-26,8	0,691
CD8ЦТП	64,3	45,7-66,0	49,3	41,8-70,9	0,112
CD3+CD16+CD56+	11,4	8,8-20,0	16,2	11,7-18,7	0,069
CD4+CD25+CD127-	6,2	5,2-8,4	47,0	32,3-62,5	0,007
CD8+CD11b-CD28-	12,1	10,2-17,6	18,4	11,7-45,6	0,031

При анализе субпопуляций Т-клеток и функциональной активности клеток-эффекторов периферической крови статистически значимым явилось снижение перфоринового потенциала CD16+ клеток (CD16+Perforin+), 17,7% против 14,1%, ($p=0,031$) и цитотоксического потенциала CD16+ клеток (CD16ЦТП), 81,9% против 64,3%, ($p=0,009$). Также, отмечено снижение перфоринового потенциала CD8+Т-клеток (CD8+Perforin+), 22,9% против 17,1% и цитотоксического потенциала CD8+ Т-клеток, 64,3% против 49,3%, однако различия статистически не значимы. Напротив, показатели Т-хелперов CD4+ и цитотоксических CD8+ лимфоцитов имели незначительную тенденцию к увеличению своего значения, 37,2% против 39,7% и 24,7% против 31,4%, соответственно.

При оценке регуляторных минорных популяций лимфоцитов периферической крови, медиана Т-регуляторных клеток с фенотипами CD4+CD25+CD127- и CD8+CD11b-CD28- возросла в процессе химиотерапии и составила 6,2% против 47,0%, ($p=0,00007$); 12,1% против 18,4%, ($p=0,031$), соответственно. Однако, медиана CD3+CD16+CD56+ НКТ-клеток существенно не изменялась, 11,4% против 16,2%.

Из этого следует, что процентное содержание эффекторных CD16+ клеток и их цитотоксического потенциала до начала химиотерапии было выше чем в процессе лечения. Однако, после проведения 3-4 курсов химиотерапии отмечается статистически значимое повышение процента Т-регуляторных клеток с фенотипами CD4+CD25+CD127- и CD8+CD11b-CD28.

Далее выполнен анализ величины изменения в % (дельта) у 15 пациентов до и в процессе лечения.

Формула вычисления: Дельта= (после-до)/до*100

При оценке «линейной» структуры системного иммунитета периферической крови у больных мРЖ отмечено увеличение уровня Т-клеток (CD3+CD19-), В-клеток (CD3-CD19+) и НК-клеток (CD3-CD16+CD56+) на 4,2%, 85,7% и 3,2%, соответственно. При этом, наиболее выражено было увеличение Т-клеток (CD3+CD19-) в процессе химиотерапии (Таблица 47).

Таблица 47 – Величина изменения показателей системного иммунитета до и в процессе химиотерапии у больных раком желудка (n=15)

Показатели клеточного иммунитета в крови	Медиана	Квартили
CD3+CD19-	4,2	0,3-8,3
CD3-CD19+	85,7	-40,0-586,7
CD3-CD16+CD56+	3,2	-35,7-29,7
CD3+CD4+	16,4	-14,5-29,4
CD3+CD8+	14,6	3,0-39,2
CD16+Perforin+	-30,9	-69,5-20,1
CD16ЦТП	-21,5	-47,2 - -7,6
CD8+Perforin+	-1,8	-30,8-34,9
CD8ЦТП	-9,6	-23,3-9,9
CD3+CD16+CD56+	44,3	2,6-50,0
CD4+CD25+CD127-	740,3	344,2-754,5

При анализе цитотоксических лимфоцитов и эффекторных клеток с их функциональной активностью периферической крови у больных мРЖ отмечается рост показателей Т-клеток с фенотипами CD3+CD4+ и CD3+CD8+ на 16,4% и 14,6% соответственно, и снижение перфоринового потенциала клеток и их функциональной активности (CD16+Perforin+; CD16ЦТП), (CD8+Perforin+; CD8ЦТП) на 30,9%, 21,5% и 1,8%, 9,6% соответственно. При этом, тенденция к росту в процессе химиотерапии найдена только у CD3+CD8+ цитотоксических лимфоцитов.

При оценке регуляторных минорных популяций лимфоцитов периферической крови у больных мРЖ отмечается рост НКТ-клеток (CD3+CD16+CD56+), Т-регуляторных клеток с фенотипами (CD4+CD25+CD127-) и (CD8+CD11b-CD28-) на 44,3%, 740,3% и 39,4%, соответственно. При этом,

тенденция к снижению в процессе химиотерапии найдена только у Т-регуляторных клеток с фенотипом CD8+CD11b-CD28-.

Из этого следует, что процентное содержание Т-клеток, цитотоксических CD8 лимфоцитов, НКТ-клеток и CD4+ Т-регуляторных клеток растет в процессе химиотерапии.

Для оценки возможности предсказать раннее прогрессирование у пациентов II группы по показателям крови уже до начала лечения, мы сравнили результаты исследования системного клеточного иммунитета в подгруппах, где прогрессирование заболевания зарегистрировано в сроки до 6 месяцев и позднее (Таблица 48).

Таблица 48 – Различия показателей крови до начала лечения в зависимости от риска прогрессирования в ранние сроки во II группе (до 6 месяцев, n=5/ после 6 месяцев, n=15)

Показатели клеточного иммунитета в крови до лечения	Прогрессирование до 6 месяцев (n=5)		Прогрессирование после 6 месяцев (n=15)		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD3+CD19-	64,1	63,6-64,2	75,4	66,9-81,8	0,168
CD3-CD19+	1,3	1,1-1,6	0,7	0,6-1,5	0,081
CD3-CD16+CD56+	30,6	30,2-31,1	20,2	9,4-24,6	0,168
CD3+CD4+	37,4	35,0-40,4	37,2	29,8-51,6	1,000
CD3+CD8+	24,2	20,5-24,9	24,7	20,4-36,2	0,553
CD16+Perforin+	26,9	24,3-30,0	17,7	14,6-27,2	0,306
CD16ЦТП	84,1	81,3-88,1	81,9	60,9-93,2	0,933
CD8+Perforin+	25,2	24,1-29,0	22,9	10,5-27,3	0,230
CD8ЦТП	76,4	68,9-78,4	64,3	45,7-66,0	0,142
CD3+CD16+CD56+	8,5	7,6-10,8	11,4	8,8-20,0	0,306
CD4+CD25+CD127-	8,1	6,5-8,4	6,2	5,2-8,4	0,800
CD8+CD11b-CD28-	5,1	2,3-8,6	12,1	10,2-17,6	0,019

Из таблицы 48 видно, что среди «линейной» субпопуляции лимфоцитов, цитотоксических лимфоцитов, эффекторных Т-клеток и их цитотоксического потенциала, а также Т-регуляторных клеток статистически значимые различия исходных показателей в зависимости от сроков прогрессирования наблюдаются у CD8 Т-регуляторных клеток. Медиана уровня CD8 Т-регуляторных клеток с фенотипом CD8+CD11b-CD28- у пациентов с «поздним» прогрессированием оказалась статистически значимо выше, чем у пациентов с прогрессированием до 6 месяцев, 12,1% против 5,1%, ($p=0,019$). Таким образом, высокий уровень CD8 Т-регуляторных клеток с фенотипом CD8+CD11b-CD28- до начала лечения является прогностическим фактором благоприятного прогноза.

Характер изменения показателей в процессе ХТ также может быть информативен для предсказания раннего прогрессирования, поэтому мы сравнили величину данного изменения в зависимости от сроков прогрессирования.

Однако у пациентов, обследованных в динамике раннее прогрессирование не отмечено (до 6 месяцев). Поэтому для анализа динамики показателей, мы выбрали границу сроков прогрессирования в 9 месяцев (Таблица 49).

Таблица 49 – Динамика показателей (до-после лечения) в зависимости от риска прогрессирования (в сроки – до 9 месяцев включительно, $n=7$ / после 9 месяцев, $n=8$) во II группе

Динамика показателей клеточного иммунитета в крови	Прогрессирование ≤ 9 месяцев ($n=7$)		Прогрессирование после 9 месяцев ($n=8$)		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD3+CD19-	8,3	-13,0-18	2,4	0,4-4,6	0,685
CD3-CD19+	283,3	83,3-587	22,9	-63,2-426,2	0,183
CD3-CD16+CD56+	-35,7	-64,2-30	10,2	-1,0-32,0	0,073
CD3+CD4+	27,2	-24,2-29	4,7	-10,8-27,7	0,862
CD3+CD8+	11,7	-12,7-26	26,9	8,8-42,6	0,073
CD16+Perforin+	-69,5	-72,9--31	9,1	-34,3-29,2	0,013
CD16ЦТП	-21,5	-82,0--8	-16,2	-35,4-2,2	0,862
CD8+Perforin+	-1,8	-46,8-10	11,4	-21,5-50,2	0,272

CD8ЦТП	-9,6	-28,3--9	-1,2	-17,8-14,8	0,385
CD3+CD16+CD56+	44,3	-35,5-49	34,5	10,8-72,4	0,183
CD4+CD25+CD127-	750,0	740,3-1021	494,1	342,9-699,3	0,073
CD8+CD11b-CD28-	0,6	-3,3-66	141,0	-22,0-273,1	0,385

Таблица 49 иллюстрирует, что среди «линейной» структуры лимфоцитов медиана Т- и В-клеток растет у больных с прогрессированием до и после 9 месяцев, 8,3% против 2,4%; 283,3% против 22,9%, соответственно. Уровень НК-клеток снижается у больных мРЖ с прогрессированием до 9 месяцев, и обратно увеличивается при прогрессировании после 9 месяцев (-35,7% против 10,2%). Медианы CD4+ и CD8+ цитотоксических лимфоцитов до и в процессе терапии росли у пациентов с мРЖ при прогрессировании до и после 9 месяцев, 27,2% против 4,2%; 11,7% против 26,9%, соответственно. Медианы эффекторных CD16 и CD8 клеток снижались у больных с прогрессированием заболевания до 9 месяцев и обратно росли при прогрессировании после 9 месяцев, - 69,5% против 9,1%, - 1,8% против 11,4% соответственно. Значения их цитотоксического потенциала снижались в обеих случаях, -21,5% против - 16,2%, - 9,6% против - 1,2%, соответственно. При этом статистически значимо изменялся процент в зависимости от времени прогрессирования (до и после 9 месяцев) эффекторные CD16 клетки с фенотипом CD16+Perforin+, - 69,5% против 9,1%, соответственно. Дельты значений Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4+ и CD8+, а также НКТ-клеток росли и составили 750,0% против 494,1%, 0,6% против 141,0% и 44,3% против 34,5%, соответственно. Из этого следует, что увеличение уровня эффекторных CD16-клеток с фенотипом CD16+Perforin+ в процессе химиотерапии ассоциировано с улучшением выживаемости без прогрессирования.

Таким образом, больным мРЖ до начала лечения характерно повышение уровня эффекторных CD16+ Т-клеток и их цитотоксического потенциала, тогда как 3-4 курса химиотерапии увеличивает уровень CD4+ и CD8+ Т-регуляторных клеток. В то же время, уровень CD8+ Т-регуляторных клеток является

прогностическим фактором благоприятного прогноза для ВБП. У пациентов с высоким уровнем CD8⁺ Т-регуляторных клеток до начала лечения статистически значимо выше вероятность пережить ВБП – 6 месяцев. Однако, увеличение уровня эффекторных CD16-клеток в процессе химиотерапии увеличивает вероятность пережить ВБП – 9 месяцев.

Также, для оценки возможности предсказать раннее прогрессирование у пациентов II группы по показателям системного воспаления в периферической крови уже до начала лечения, мы сравнили результаты исследования системного клеточного иммунитета в подгруппах, где прогрессирование заболевания зарегистрировано в сроки до 6 мес. и позднее. У двух больных среди динамики показателей нейтрофильно-лимфоцитарного и тромбоцитарно-лимфоцитарного индексов у больных мРЖ вероятность предсказать раннее прогрессирование отсутствует.

6.2 Динамика показателей иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, в процессе лечения у больных метастатическим раком желудка

При изучении «линейной» структуры локального иммунитета достоверных различий не найдено. Медиана уровня Т-клеток (CD3+CD19-TILs) и НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) до и в процессе ХТ равнозначна составив 86,6% против 84,0%; 6,9% против 6,1% соответственно. Напротив, медиана В-клеток (CD3-CD19+ TIL) снижается после 3-4 курсов ХТ, 4,2% против 0,0%, однако различие статистически не значимо. При этом, степень инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами (CD45+CD14-TILs) снижалась в процессе лечения, 161,0% против 83,0%.

При анализе субпопуляций Т-клеток и функциональной активности клеток-эффекторов опухолевой ткани статистически значимым явилось повышение CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+TILs), 3,1% против 5,4%, ($p=0,009$) и цитотоксического потенциала эффекторных CD16-клеток (CD16ЦТТILs), 55,7% против 64,7%, ($p=0,012$) в процессе химиотерапии. Также,

отмечено повышение перфоринового потенциала CD8+Т клеток (CD8+Perforin+TILs), 9,5% против 38,5% и цитотоксического потенциала CD8+ Т-клеток, 19,4% против 67,5%, однако различия не значимы. Напротив, показатели CD3+CD4+ TILs снижались в процессе лечения, 42,0% против 24,4%.

При оценке регуляторных минорных популяций в опухолевой ткани, уровень Т-регуляторных клеток существенно не изменялся (Таблица 51).

Таблица 51 – Показатели локального иммунитета до и в процессе лечения у больных II группы раком желудка (n=20)

Показатели клеточного иммунитета в ткани	До химиотерапии		В процессе химиотерапии		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD45+CD14-TILs	161,0	59,0-178,0	83,0	45,0-220,0	0,778
CD3+ CD19-TILs	86,6	72,2-92,0	84,0	78,9-91,2	0,683
CD3-CD19+TILs	4,2	0,7-17,7	0,0	0,0-3,0	0,096
CD3-CD16+CD56+TILs	6,9	2,7-10,1	6,1	2,4-13,6	0,826
CD3+CD4+TILs	42,0	26,6-64,6	24,4	14,4-45,0	0,096
CD3+CD8+TILs	3,1	1,5-3,9	5,4	1,7-9,5	0,009
CD16+Perforin+TILs	5,0	3,9-7,1	6,2	3,6-12,5	0,074
CD16ЦПТILs	55,7	25,1-56,8	64,7	52,1-78,3	0,012
CD8+Perforin+TILs	9,5	5,3-49,6	38,5	7,2-46,5	0,059
CD8ЦПТILs	19,4	11,5-86,7	67,5	26,6-81,2	0,099
CD3+CD16+CD56+TILs	10,3	5,9-13,7	11,1	9,5-19,4	0,221
CD4+CD25+CD127-TILs	8,6	3,3-16,2	11,5	5,2-15,6	0,638
CD8+CD11b-CD28-TILs	47,9	33,3-69,6	43,1	38,1-50,0	0,638

Из этого следует, что цитотоксический потенциал CD16+ TILs и CD3+CD8+ TILs клеток статистически значимо повышается в процессе химиотерапии у больных МРЖ.

Далее выполнен анализ величины изменения в % (дельта) у 15 пациентов до и в процессе лечения.

Формула вычисления: Дельта= (после-до)/до*100

При оценке «линейной» структуры локального иммунитета у больных мРЖ отмечено снижение степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами (CD45+CD14-TILs), уровня Т-клеток (CD3+CD19-TILs) и В-клеток (CD3-CD19+TILs) на 18,6%, 1,1% и 100,0%, соответственно. При этом, только для уровня NK-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) характерна тенденция к возрастанию показателя на 4,3% в процессе химиотерапии.

При анализе цитотоксических лимфоцитов и эффекторных клеток с их функциональной активностью в опухолевой ткани у больных мРЖ отмечается рост показателей перфоринового потенциала CD16-клеток и их функциональной активности (CD16+Perforin+ TILs; CD8+Perforin+TILs; CD16ЦТП TILs), а также ЦТЛ с фенотипом CD3+CD8+ TILs на 9,0%, 35,8%, 10,9% и 44,2%, соответственно, и снижение Т-хелперов с фенотипом CD3+CD4+TILs и функциональной активности CD8+ клеток – CD16ЦТП TILs на 29,3% и 11,3%, соответственно.

При оценке регуляторных минорных популяций лимфоцитов опухолевой ткани у больных мРЖ отмечается рост NKT-клеток (CD3+CD16+CD56+TILs) и Т-регуляторных CD4+ клеток (CD4+CD25+CD127-TILs) на 2,9% и 78,8%, соответственно. Напротив, снижение в процессе химиотерапии найдено у Т-регуляторных CD8+ клеток с фенотипом CD8+CD11b-CD28-TILs на 10,1%.

Из этого следует, что процентное содержание NK-клеток, перфоринового потенциала Т-клеток и функциональной активности CD16-клеток, цитотоксических CD8 лимфоцитов, NKT-клеток и CD4 Т-регуляторных клеток в опухолевой ткани растет в процессе химиотерапии (Таблица 51).

Таблица 51 – Величина изменения показателей локального иммунитета до и в процессе химиотерапии у больных раком желудка (n=15)

Показатели клеточного иммунитета в ткани	Медиана	Квартили
CD45+CD14-TILs	-18,6	-63,0 – 400,0
CD3+ CD19-TILs	-1,1	-14,2 – 22,0
CD3-CD19+TILs	-100,0	-100,0 – -87,2
CD3-CD16+CD56+TILs	4,3	-69,5 – 68,1

CD3+CD4+TILs	-29,3	-44,6 – 36,9
CD3+CD8+TILs	44,2	-18,3 – 104,6
CD16+Perforin+TILs	9,0	-35,9 – 51,7
CD16ЦТТТILs	10,9	-7,5 – 18,1
CD8+Perforin+TILs	35,8	-12,8 – 66,7
CD8ЦТТТILs	-11,3	-45,2 – 35,0
CD3+CD16+CD56+TILs	2,9	-19,6 – 207,9
CD4+CD25+CD127-TILs	78,8	-46,8 – 190,7
CD8+CD11b-CD28-TILs	-10,1	-29,7 – 50,2

Для оценки возможности предсказать раннее прогрессирование у пациентов II группы уже до начала лечения, мы сравнили результаты исследования локального иммунитета в подгруппах, где прогрессирование заболевания зарегистрировано в сроки до 6 месяцев и позднее (Таблица 52).

Таблица 52 – Различия опухолевой ткани до начала лечения в зависимости от риска прогрессирования в ранние сроки во II группе больных раком желудка (до 6 месяцев, n=5/ после 6 месяцев, n=15)

Показатели клеточного иммунитета в ткани до лечения	Прогрессирование до 6 месяцев (n=5)		Прогрессирование после 6 месяцев (n=15)		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD45+CD14-TILs	3,5	3,3-7,3	2,3	1,7-10,5	0,662
CD3+CD19+TILs	85,9	73,6-87,0	86,6	72,2-92,0	1,000
CD3-CD19+TILs	3,1	2,6-5,3	4,2	0,7-17,7	0,540
CD3-CD16+CD56+TILs	6,0	3,6-7,3	6,9	2,7-10,1	0,725
CD3+CD4+TILs	30,0	22,6-53,7	42,0	26,6-64,6	0,662
CD3+CD8+TILs	46,6	46,3-67,5	30,7	20,0-54,7	0,096
CD16+Perforin+TILs	0,5	0,0-1,9	4,6	3,9-7,1	0,030
CD16ЦТТТILs	13,2	0,0-17,4	55,7	25,1-56,8	0,011
CD8+Perforin+TILs	4,1	0,0-22,4	9,5	5,3-49,6	0,161

CD8 ⁺ CD137 ⁺ TILs	5,4	0,0-59,9	19,4	11,5-86,7	0,334
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ TILs	20,4	16,9-22,0	10,3	5,9-13,7	0,054
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺ TILs	10,7	6,1-15,0	8,6	3,3-16,2	0,793
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD28 ⁻ TILs	41,2	31,1-52,9	42,3	33,3-69,6	0,553

Из таблицы видно, что среди «линейной» субпопуляции лимфоцитов, цитотоксических лимфоцитов, эффекторных клеток и их цитотоксического потенциала, а также Т-регуляторных клеток статистически значимые различия исходных показателей в зависимости от сроков прогрессирования наблюдаются у перфоринового потенциала CD16 эффекторных клеток и их функциональной активности. Медиана уровня CD16 эффекторных клеток с фенотипом CD16⁺Perforin⁺TILs и их цитотоксического потенциала у пациентов с прогрессированием заболевания после 6 мес. статистически значимо выше тех, у кого прогрессирование зарегистрировано до 6 месяцев, 0,5% против 4,6%, ($p=0,030$), 13,2% против 55,7% ($p=0,011$), соответственно.

Таким образом, низкий уровень перфоринового потенциала эффекторных CD16 клеток и их цитотоксического потенциала до начала химиотерапии являются неблагоприятным фактором и могут свидетельствовать о более высоком риске и вероятности прогрессирования до 6 месяцев.

Характер изменения показателей в процессе ХТ также может быть информативен для предсказания раннего прогрессирования, поэтому мы сравнили величину данного изменения в зависимости от сроков прогрессирования.

Динамика показателей после лечения оценена только у пациентов, прогрессирование заболевания у которых зарегистрировано после 6 месяцев. Поэтому для анализа дельты показателей, мы выбрали границу сроков прогрессирования в 9 месяцев (Таблица 53).

Таблица 53 – Дельты показателей (до-после лечения) в зависимости от риска прогрессирования (в сроки – до 9 месяцев включительно, n=7/ после 9 месяцев, n=8) во II группе больных раком желудка

Динамика показателей клеточного иммунитета в ткани	Прогрессирование ≤ 9 месяцев (n=6)		Прогрессирование после 9 месяцев (n=8)		p
	медиана	квартили	медиана	квартили	
CD45+CD14-TILs	-45,0	-63,0 – 494,1	116,8	-57,9 – 326,1	1,000
CD3+CD19-TILs	22,0	-1,1 – 44,1	-9,7	-19,1 – -2,7	0,012
CD3-CD19+TILs	-100,0	-100,0 – -87,2	-100,0	-100,0 – 424,2	0,810
CD3-CD16+CD56+TILs	-39,6	-69,5 – 23,6	36,2	-47,8 – 225,4	0,333
CD3+CD4+TILs	-29,3	-41,9 – 59,6	-32,3	-61,8 – 8,4	0,333
CD3+CD8+TILs	44,2	18,1 – 104,6	21,1	-37,5 – 193,4	0,651
CD16+Perforin+TILs	51,7	-100,0 – 76,1	-32,1	-35,9 – 50,0	0,378
CD16ЦТПТILs	-7,5	-100,0 – 12,3	18,1	9,6 – 56,6	0,031
CD8+Perforin+TILs	13,3	-100,0 – 43,1	51,3	11,5 – 218,1	0,138
CD8ЦТПТILs	-30,8	-100,0 – 8,1	35,0	-45,2 – 480,0	0,128
CD3+CD16+CD56+TILs	207,9	106,8 – 381,4	-13,8	-20,2 – -2,6	0,002
CD4+CD25+CD127-TILs	190,7	116,7 – 246,7	-25,2	-64,1 – 37,5	0,002
CD8+CD11b-CD28-TILs	-24,0	-29,7 – 3,9	50,2	-58,3 – 371,9	0,378

Таблица 53 иллюстрирует, что для пациентов с прогрессированием до 9 месяцев характерно снижение степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами, НК-клеток, перфоринового потенциала эффекторных CD8 клеток и цитотоксического потенциала CD16 и CD8-клеток, а также CD8+ Т-регуляторных клеток, и, напротив, увеличение Т-клеток, CD8+ ЦТЛ, перфоринового потенциала эффекторных CD16 клеток, НКТ-клеток и CD4+ Т-регуляторных клеток. Однако, у больных с прогрессированием после 9 месяцев отмечается повышение степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами, НК-клеток, перфоринового потенциала эффекторных CD8 клеток и цитотоксического потенциала CD16 и CD8-клеток и CD8+ Т-регуляторных клеток, а уровень Т-клеток, ЦТЛ CD8+

клеток, перфоринового потенциала эффекторных CD16 клеток, NKT-клеток и CD4+ Т-регуляторных клеток снижается.

Таким образом, у больных мРЖ с прогрессированием до 9 месяцев характерно статистически значимое увеличение Т-клеток, NKT-клеток и CD4+Т-регуляторных клеток. Напротив, повышение цитотоксического потенциала CD16 клеток является благоприятным прогностическим фактором и увеличивает вероятность достичь длительную ВБП.

Данные изменения показателей локального и системного иммунитета в динамике указывают на увеличение цитотоксических CD8+ лимфоцитов, NKT-клеток и CD4+Т-регуляторных клеток в периферической крови и опухолевой ткани в процессе лечения. Однако, высокий уровень CD8+ Т-регуляторных клеток в периферической крови и низкий уровень перфоринового потенциала эффекторных CD16 клеток и их цитотоксического потенциала в опухолевой ткани до начала лечения свидетельствуют о низком и высоком риске и вероятности прогрессирования до 6 месяцев соответственно. В то же время, повышение уровня эффекторных CD16-клеток в периферической крови и опухолевой ткани до и в процессе лечения является благоприятным прогностическим фактором и увеличивает вероятность прогрессирования после 9 месяцев. Напротив, увеличение Т-клеток, NKT-клеток и CD4+Т-регуляторных клеток в опухолевой ткани характерно для больных мРЖ с вероятностью прогрессирования до 9 месяцев.

ГЛАВА 7. КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, ФАКТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ, ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ, И КЛИНИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ ВЫЖИВАЕМОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Так как лечение и отдаленные результаты в I и II группе разные, мы провели анализ прогностических факторов отдельно для каждой группы. В анализ включены все значимые показатели иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови, факторов воспаления, иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, определенных методом проточной цитометрии и иммуногистохимии, и клинических показателей (возраст пациента (как по годам, так и по группам: до 45 лет, 46-60 лет, старше 60 лет), стадия заболевания, степень дифференции (G), индекс массы тела, тип по Lauren и статус MSI), полученные по результатам однофакторного анализа.

По данным однофакторного регрессионного анализа для общей выживаемости I группы из всех показателей системного и локального иммунитета, факторов воспаления, клинических характеристик больных достоверно значимыми оказались Т-клетки (CD3+CD19-TILs), цитотоксические CD8-лимфоциты (CD3+CD8+TILs) и Т-регуляторные клетки (CD8+CD11b-CD28-TILs) опухолевой ткани (Таблица 48).

При выполнении однофакторного регрессионного анализа для выживаемости без прогрессирования больных I группы из всех показателей системного и локального иммунитета, факторов воспаления, клинических характеристик больных достоверно значимыми оказались опухоль-инфильтрирующие лимфоциты с фенотипом CD3+CD19-TILs, NK-клетки с фенотипом CD3-CD16+CD56+TILs, определенных методом проточной цитометрии, соотношения CD3+CD4+/CD3+CD8+iTILs методом иммуногистохимии и тромбоцитарно-лимфоцитарный индекс в виде качественного показателя, разделенного по квартилям (Таблица 54, Рисунок 17).

Таблица 54 – Однофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП от показателей локального иммунитета, факторов воспаления I группы у больных раком желудка (n=25)

	ОВ				ВБП			
	р	HR	95% ДИ		р	HR	95% ДИ	
CD3+TILs	0,021	0,894	0,813	0,983	0,003	0,915	0,862	0,971
CD3+CD8+TILs	0,026	0,782	0,631	0,970				
CD3-CD16+CD56+TILs					0,011	1,195	1,042	1,369
CD8+CD11b-CD28-TILs	0,018	0,935	0,885	0,989				
ТЛИ по диапазонам					0,013	0,21	0,06	0,72
CD4+ / CD8+iTILs					0,035	3,26	1,09	9,78

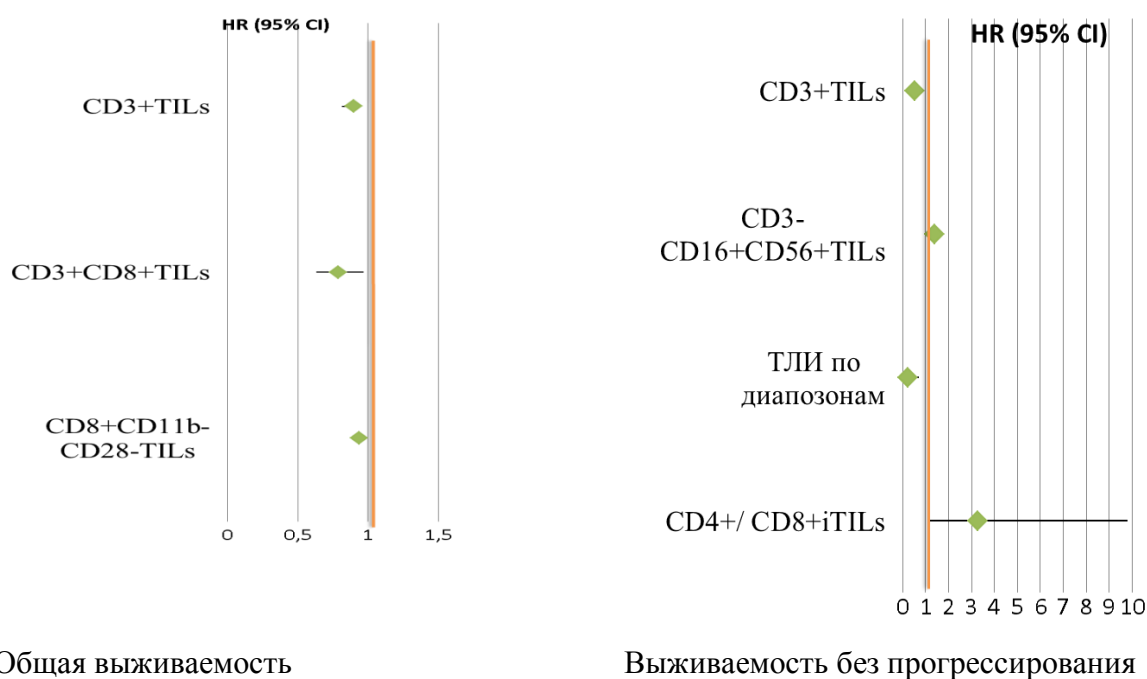


Рисунок 17 – Величина рисков, влияющих на ОВ и ВБП

По данным однофакторного регрессионного анализа для общей выживаемости II группы из всех показателей системного и локального иммунитета, факторов воспаления и клинических характеристик больных достоверно значимыми оказались уровни нейтрофилов, тромбоцитов, Т-клеток с фенотипом CD3+CD19- и NK-клеток с фенотипом CD3-CD16+CD56+ в

периферической крови, а также NK-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) и NKT-клеток (CD3+CD16+CD56+TILs) опухолевой ткани (Таблица 56).

При выполнении однофакторного регрессионного анализа для выживаемости без прогрессирования II группы из всех показателей системного и локального иммунитета, факторов воспаления и клинических характеристик больных достоверно значимыми оказались возраст пациентов, уровень нейтрофилов, тромбоцитов, НЛИ, NK-клетки с фенотипом CD3-CD16+CD56+ и цитотоксический потенциал клеток эффекторов CD8 (CD8ЦТП) периферической крови, а также степень инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами (CD45+CD14-TILs), Т-клетки (CD3+CD19-TILs), В-клетки (CD3-CD19+TILs) опухолевой ткани и возраст больных (Таблица 55, Рисунок 18).

Таблица 55 – Однофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ, ВБП от показателей системного и локального иммунитета, факторов воспаления и клинических признаков II группы у больных раком желудка (n=20)

	ОВ				ВБП			
	р	HR	95% ДИ		р	HR	95% ДИ	
CD3+CD19-	0,007	0,91	0,85	0,97				
CD3-CD16+CD56+	0,007	1,09	1,02	1,16	0,023	1,05	1,01	1,10
CD16ЦТП					0,018	1,06	1,01	1,11
CD45+CD14-TILs					0,041	1,003	1,000	1,006
CD3+ CD19-TILs					0,041	0,952	0,908	0,998
CD3-CD19+TILs					0,045	1,058	1,001	1,117
CD3-CD16+CD56+TILs	0,037	1,202	1,011	1,429				
CD3+CD16+CD56+TILs	0,027	1,112	1,012	1,221				
Возраст					0,012	1,06	1,01	1,12
Нейтрофилы (10 ⁹ /л)	0,008	1,33	1,08	1,65	0,010	1,34	1,07	1,67
Тромбоциты (10 ⁹ /л)	0,006	1,01	1,00	1,02	0,0006	1,01	1,01	1,02
НЛИ					0,005	2,80	1,36	5,75

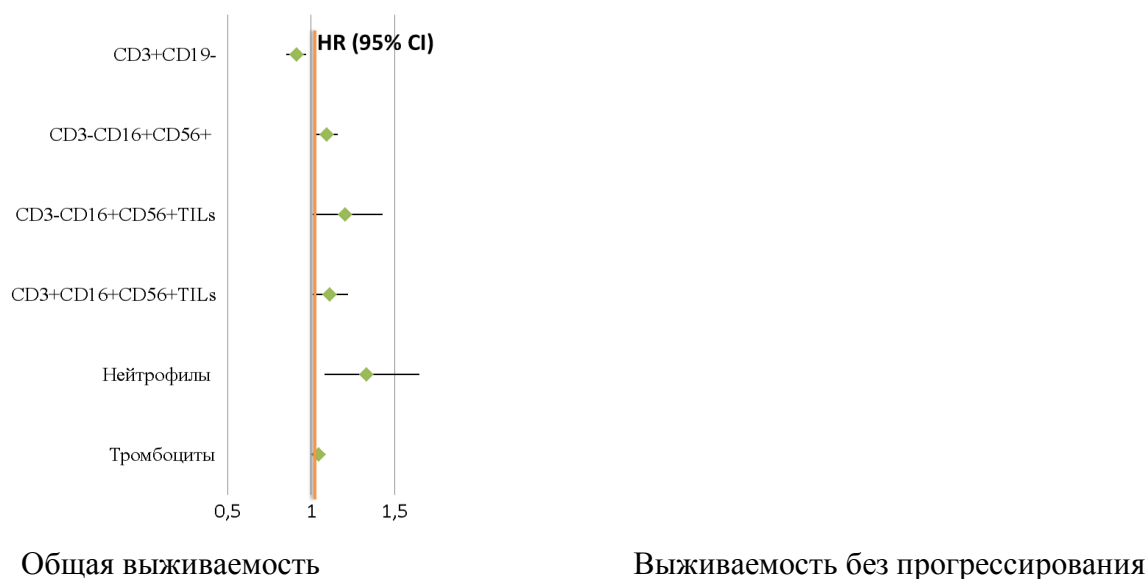


Рисунок 18 – Величина рисков, влияющих на ОВ и ВБП

Факторы, значимые при однофакторном анализе, включены в многофакторный регрессионный анализ, выполненный методом пошагового исключения.

Выполнение многофакторного регрессионного анализа Кокса для общей выживаемости I группы не позволило построить значимую математическую модель с независимыми факторами.

Для выживаемости без прогрессирования I группы построена значимая математическая модель с 2 независимыми факторами (Таблица 56).

Таблица 56 – Многофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ВБП от показателей системного и локального иммунитета, факторов воспаления и клинических признаков I группы у больных раком желудка

	В	Стд.ошибка	Вальд	р	HR	95% ДИ	
CD3+ CD19-TILs	-0,145	0,052	7,883	0,005	0,865	0,782	0,957
CD3-CD16+CD56+TILs	0,324	0,123	6,981	0,008	1,382	1,087	1,758

Из таблицы следует, что увеличение процентного содержания Т-клеток с фенотипом CD3+CD19-TILs является благоприятным фактором прогноза для ВБП у больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ, а увеличение уровня НК-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs), напротив негативно влияет на показатель выживаемости без прогрессирования.

Для общей выживаемости II группы получилась значимая модель ($p=0,001$), включающая 2 независимых фактора (Таблица 57).

Таблица 57 – Многофакторный регрессионный анализ Кокса зависимости ОВ от показателей системного и локального иммунитета, факторов воспаления и клинических признаков II группы у больных раком желудка ($n=20$)

	В	Стд.ошибка	Вальд	р	HR	95% ДИ	
Нейтрофилы	0,49	0,19	6,43	0,011	1,64	1,12	2,40
CD3-CD16+CD56+TILs	0,35	0,15	5,66	0,017	1,42	1,06	1,89

Таблица иллюстрирует, что увеличение уровня нейтрофилов в периферической крови, а также увеличение инфильтрации опухолевой ткани НК-клетками (CD3-CD16+CD56+TILs) является факторами неблагоприятного прогноза для ОВ у больных с метастатическим раком желудка.

При выполнении многофакторного регрессионного анализа Кокса для выживаемости без прогрессирования II группы получилась значимая модель, включающая 3 независимых фактора (Таблица 23).

Из таблицы следует, что увеличение возраста, уровня нейтрофилов и тромбоцитов ухудшают показатель выживаемости без прогрессирования у больных с метастатическими формами РЖ.

Соответственно, при комплексной оценке показателей системного и локального иммунитета, факторов воспаления и клинических характеристик у больных ранними и местно-распространенными формами рака желудка влияние на показатели общей выживаемости не найдено. Однако, отмечено позитивное влияние Т-клеток и негативное влияние НК-клеток на показатель выживаемости без прогрессирования больных I группы.

У больных с метастатическим раком желудка при комплексной оценке показателей системного и локального иммунитета, факторов воспаления и клинических характеристик выявлено, что увеличение уровня нейтрофилов является фактором неблагоприятного прогноза как для общей выживаемости, так и для выживаемости без прогрессирования. Кроме этого, увеличение инфильтрации опухолевой ткани НК-клетками (CD3-CD16+CD56+TILs) снижает показатель ОВ, а увеличение возраста и тромбоцитов – показатель ВБП.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведено проспективное исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухолевую ткань, у 45 больных ранним, местно-распространенным и метастатическим раком желудка до проведения хирургического этапа лечения или химиотерапии соответственно.

При сравнительном анализе лимфоцитов периферической крови больных I (I-III ст.) и II (IV ст.) групп различий между уровнем содержания зрелых Т-лимфоцитов с фенотипом CD3+CD19- и NK-лимфоцитов с фенотипом CD3-CD16+56+ не было выявлено – 74,3% [71,4-84,7%] и 72,5% [64,2-81,8%], 11,8% [7,3-25,0%] и 21,3% [9,4-30,4%], соответственно. Напротив, при анализе линейных показателей клеточного иммунитета отмечено статистически значимо высокие значения В-клеток у больных I группы в сравнении со II, 1,6% [1,3-2,2%] и 1,0 [0,6-1,5%], ($p=0,017$) соответственно. Однако, у пациентов РЖ в зависимости от стадии заболевания или наличия прогрессирования различий не найдено. Результаты согласуются с исследованием из Южной Кореи, где при анализе Т, В, и NK-клеток методом проточной цитометрии у 85 больных РЖ выявлена тенденция к снижению уровня В-клеток по мере увеличения стадии заболевания ($313 < 262 < 203 < 163$) [170]. Более ранние исследования, посвященные изучению роли лимфоцитов в противоопухолевом иммунитете, были преимущественно сосредоточены на Т-клетках. Тем не менее, сегодня все больше внимания уделяется и значению В-клеток. Например, исследование Yuki Murakami et al., выявило что 5-летняя ОВ при низком и высоком содержании В-клеток составляет 65,4% и 13,3%, ($p=0,0001$) соответственно [131]. Следовательно, повышение числа клеток В-клеточного звена иммунитета, возможно, связано с активацией гуморального иммунологического ответа на фоне сниженных специфических Т-клеточных реакций. При этом, уровень CD3+CD19- Т-клеток статистически значимо выше у больных мРЖ без прогрессирования по сравнению с умершими больными: 65,55% против 78,60%, ($p=0,044$). В то же время, отмечается, что

содержание Т-клеток является фактором благоприятного прогноза для ОБ больных мРЖ, HR=0,91; 95%ДИ 0,85-0,97, p=0,007. Напротив, увеличение НК-клеток ухудшает показатели ОБ и ВБП у больных мРЖ, HR=1,09; 95% ДИ 1,02-1,16, p=0,007; HR=1,05; 95% ДИ 1,01-1,10, p=0,023 соответственно. Аналогичные результаты получены при изучении 152 образцов периферической крови больных РЖ, где проводился факторный анализ двух групп: Т-клеток CD3+CD19- и НК-клеток CD3-CD16+CD56+ [42]. Исследование сопряженности 2-х групп с клиническими характеристиками РЖ показало, что у пациентов группы Т-клеток CD3+CD19- в сравнении с группой НК-клеток CD3+CD16+CD56+ значимо чаще наблюдается инвазия опухоли в пределах слизистой (T1), 32,6% против 14,3% (p=0,03) и чаще диагностируется I стадия заболевания, 36,8% против 19%, (p=0,01). В то же время при исследовании гистологического типа РЖ в указанной группе больных реже встречается умеренно дифференцированная аденокарцинома, 18,4% против 39,7%, (p=0,004). У пациентов группы НК-клеток CD3+CD16+CD56+ чаще наблюдаются метастазы в лимфатические узлы второго порядка, 38% против 17,6%, (p=0,02) и отдаленные метастазы, 19,5% против 4%, (p=0,03) в сравнении с противоположной группой [42]. И в нашем исследовании с повышением значения НК-клеток наблюдается большая глубина инвазии опухоли, более частое метастатическое поражение лимфатических узлов второго порядка и отдаленное метастазирование.

С одной стороны, приведенные выше данные позволяют предположить, что существуют процессы взаиморегуляции между указанными направлениями дифференцировки предшественников Т- и НК-клеток. Возможно, указанный баланс является одним из механизмов процессов адаптации при развитии стресс-реакции. С другой стороны, такая сопряженность может говорить об обратном: указанные клетки близки по происхождению, но их лимфопоэз идет независимо, поэтому факторы, вызывающие лимфопению Т-клеток, не влияют на НК-клетки, которых продуцируется «нормальное» количество, и их становится «относительно» больше (и наоборот).

Важнейшим показателем состояния клеточного звена иммунной системы является анализ субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в структуре Т-клеток. Среди всех Т-клеток на долю CD4⁺ лимфоцитов приходится 2/3, причем, как правило, все CD4⁺ лимфоциты являются CD3⁺Т-клетками. На долю CD8⁺ лимфоцитов приходится 1/3 среди Т-клеток. Об обеспечении специфической иммунологической реакции по эффекторному типу CD8⁺ Т-клеток в генерации иммунного ответа онкологических больных, включая рак желудка, неоднократно указывалось в многочисленных публикациях [18; 32; 102]. Значения Т-хелперов и ЦТЛ у больных в обеих группах не различались, но содержание ЦТЛ по мере увеличения стадии заболевания статистически значимо уменьшалось, 39,9% при I-II – 24,7% при IV ст., ($p=0,016$). Эти данные согласуются с исследованием Weon-Seon H., где показатели ЦТЛ также снижались по мере увеличения стадии заболевания (736<473<522<400) [170].

В работе были изучены основные субпопуляции эффекторных лимфоцитов, содержащих перфорин — CD8⁺Perforin⁺ лимфоциты и CD16⁺Perforin⁺ клетки и их цитотоксические потенциалы. Оказалось, что количество клеток-эффекторов CD16⁺ Т-клеток с экспрессией внутриклеточного перфорина и их цитотоксический потенциал у больных мРЖ статистически значимо выше показателей в I группе, и составляет 12,1% против 19,1% ($p=0,016$); 66,7% против 81,9%, ($p=0,010$) соответственно. В тоже время оказалось, что количество клеток-эффекторов CD16⁺Т-клеток и CD8⁺ЦТП увеличивается по мере увеличения стадии заболевания, составив 10,4% при I-II ст. и 19,1% при IV ст., $p=0,030$; 42,9% и 64,3%, $p=0,044$ соответственно. При этом, отмечено негативное влияние CD16⁺Т-клеток на ОВ, HR-1,07; 95% ДИ 1,01-1,13, $p=0,016$ и CD16⁺ЦТП⁺ Т-клеток на ВБП, HR-1,06; 95% ДИ 1,01-1,11, $p=0,018$ у больных мРЖ. В то же время, в исследовании периферической крови 77 женщин больных раком молочной железы и 25 здоровых женщин (контрольная группа) при оценке содержания перфорина в CD16 и CD8 лимфоцитах было установлено, что количество CD8⁺Perforin⁺-лимфоцитов и их цитотоксический потенциал статистически значимо превышает показатели доноров и составляет $17,5\pm 0,7$

против $12,1 \pm 1,2$ и $52,0 \pm 1,4$ против $36,5 \pm 2,5$ соответственно. Цитотоксический потенциал CD16⁺-лимфоцитов не отличался от показателей доноров ($82,0 \pm 1,6$ против $75,9 \pm 1,5$) [12].

Соответственно, цитотоксический потенциал CD8⁺-лимфоцитов превышает показатели доноров и увеличивается по мере увеличения стадии заболевания. Ранее было показано, что наличие высокого содержания перфорин-позитивных клеток в структуре CD8⁺-лимфоцитов можно рассматривать как фактор неблагоприятного прогноза основного заболевания [6; 23]. Таким образом, с целью дальнейшей оценки влияния основных субпопуляции эффекторных лимфоцитов, содержащих перфорин – CD8⁺Perforin⁺ и CD16⁺Perforin⁺-лимфоцитов на течение рака желудка необходимо проводить индивидуальный мониторинг состояния иммунной системы больных РЖ.

Функция регуляторных Т-клеток заключается в регулировании ответа на антигены и подавлении иммунитета к онкологическому процессу [23]. Тем не менее, роль Tregs в противоопухолевом иммунитете все еще является спорной. Например, при раке яичников, ассоциированных с вирусом папилломы человека (ВПЧ), высокое содержание Tregs в опухолевой ткани ассоциировался с ухудшением ОВ [169]. В то же время, при колоректальном раке и лимфомах, повышение уровня Tregs являлось положительным прогностическим фактором [34; 123]. Эти результаты подразумевают, что роль Tregs может варьироваться в зависимости от органной принадлежности опухолевого процесса.

При сравнении Т-регуляторных клеток с фенотипами CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD4⁺CD25⁺CD127⁻ и CD8⁺CD11b⁻CD28⁻ в I и II группах различий не найдено, однако у больных I-II ст. зарегистрировано наибольшее значение CD3⁺CD16⁺CD56⁺НКТ-клеток по сравнению с III и IV ст., $25,1\%$ против $10,7\%$, $p=0,002$; $25,1\%$ против $11,1\%$, $p=0,003$, соответственно.

В последнее время значительное внимание уделяют исследованиям НКТ-клеток. Эта популяция Т-клеток благодаря своей аутореактивности и способности быстро продуцировать достаточное количество различных цитокинов (Th1, Th2, Th3 и/или Th17) обеспечивает связь между врожденным и адаптивным звеньями

иммунитета и играет уникальную роль в противоопухолевом и антивирусном иммунном ответе [96; 115; 122]. Имеются данные, что при раке легких и колоректальном раке, высокий уровень НКТ-клеток связан с улучшением показателей выживаемости больных [37; 138]. Тем не менее, исследования, посвященные функциональной активности НКТ-клеток, выявили, что при хроническом лимфолейкозе и раке яичников цитотоксичность и продукция цитокинов этими клетками нарушаются [37; 166]. В то же время в исследовании Liu-sheng P. et al., при оценке НКТ-клеток в периферической крови больных РЖ и контрольной группе достоверных различий не найдено, 5,17% [0,37-23,01%] против 5,55% [1,22-12,04%], $p > 0,05$ [140]. На наш взгляд, уровень экспрессии НКТ клеток в периферической крови у больных РЖ отражает степень иммунологических нарушений со стороны клеток супрессорного звена иммунитета.

Исследование иммунологической структуры лимфоидных клеток в периферической крови у больных раком желудка, показало, что в негативной регуляции иммунных реакций у больных мРЖ принимают участие НК-клетки, клетки эффекторы CD16, но не Т-клетки. Выявление функционально значимых клеток «линейного» ряда относительно показателей ОВ и ВБП можно рассматривать как иммунологические нарушения первого уровня, позволяющих проводить анализ маркеров, коррелирующих с клиническим течением и прогнозом онкологического заболевания.

Согласно последним данным зарубежной литературы НЛИ и ТЛИ могут являться информативными факторами прогноза течения рака желудка в связи с обнаруженным их влиянием на ОВ пациентов. Так, по данным M. Mori с соавторами, повышение значения НЛИ у пациентов с аденокарциномой желудка, получавших химиотерапию, является фактором неблагоприятного прогноза, влияющим как на ОВ, так и на БРВ [112]. Эти данные согласуются с результатами однофакторного анализа (ОФА), где НЛИ явился негативным фактором прогноза для ВБП у больных мРЖ, HR=2,80; 95% ДИ 1,36-5,75, $p=0,005$. При анализе ТЛИ было выявлено повышение его значения по мере прогрессирования заболевания.

Так, значение ТЛИ при I-II стадиях РЖ составило 113, при IV – 154, ($p=0,045$) (Таблица 10). Аналогичные данные были получены при анализе данных 723 пациентов с аденокарциномой желудка или желудочно-пищеводного соединения и показали, что именно повышенный показатель ТЛИ является достоверным фактором прогноза течения заболевания, оказывающим влияние, как на общую, так и на безрецидивную выживаемость [13]. Тем не менее, до сих пор не была проанализирована прогностическая ценность определения отношения нейтрофилов к лимфоцитам и тромбоцитов к лимфоцитам перед лечением (хирургическим или химиотерапевтическим) и корреляция данных соотношений с иммунологическим статусом пациента, что, безусловно, отражается на течении онкологических заболеваний.

Одновременно с проспективным исследованием иммунологических показателей периферической крови 45 больных раком желудка были исследованы иммунологические параметры лимфоцитов, инфильтрирующих опухолевую ткань этих же пациентов. Дизайн исследования TILs был аналогичен исследованиям периферической крови.

Однако в данном разделе исследования на первом этапе было проведено количественное изучение степени инфильтрации лимфоцитами опухоли с использованием метода проточной цитометрии по окрашиванию клеток моноклональными антителами к CD45+ антигену. В мировой научной литературе более 90-95% источников свидетельствуют о широком применении иммуногистохимического способа анализа TILs, что в определенном смысле оправдано, поскольку дает возможность анализировать парафиновые блоки опухолевой ткани ретроспективно. Однако этот подход не позволяет проводить многопараметровые исследования коэкспрессии антигенов/белков на/в клетке, необходимых для идентификации субпопуляционной структуры иммунокомпетентных клеток.

Хотелось бы отметить, что преимуществом проточной цитометрии является возможность изучения одновременно нескольких маркеров на мембране одной клетки с применением стратегии последовательного гейтирования. Нами были

изучены маркеры CD4, CD8, CD3 в пределах Т-клеток. Количественная оценка содержания Т-лимфоцитов проведена в гейте CD45⁺-лимфоцитов, присутствующих в ткани опухоли. Доминирующим типом интратуморальных лимфоцитов являются зрелые Т-клетки (CD3⁺). Иммунологический проточно-цитометрический анализ цитограмм SSC vs CD45⁺ образцов опухолевых клеток показал, что лимфоидные клетки с фенотипом CD45⁺ выявлялись в 100% случаев. При этом, медиана содержания TILs с фенотипом CD45⁺ от общего числа клеток в полученных суспензиях исследуемой группы 45 больных составила 4,3% [1,9-12,1%], медиана абсолютного числа CD45⁺ лимфоцитов в исследуемых образцах составила 428 (168,0-1068,0) клеток. При количественном изучении степени инфильтрации лимфоцитами опухоли выявлено статистически значимое увеличение инфильтрации TILs у больных I группы в сравнении с II группой, 6,8-3,4% (p=0,000). Это подтверждается результатами анализа в зависимости от стадии заболевания, где инфильтрации опухоли лимфоцитами статистически значимо выше при I-II ст. по сравнению с III и IV ст., составив 12,10% – 1,90% – 3,40%, (p=0,001, p=0,008). Напротив, увеличение степени инфильтрации опухоли лимфоцитами является фактором неблагоприятного прогноза у больных мРЖ, HR=1,005; 95% ДИ 1,002-1,008, p=0,003. Несмотря на многочисленные исследования роли инфильтрации лимфоцитами опухолевой ткани, свидетельствующие о позитивном прогностическом значении высокой степени инфильтрации лимфоцитами опухоли, причем независимо от нозологической формы злокачественного новообразования [144-146; 148], в нашем исследовании их истинное значение все еще остается спорным. При оценке количества линейных (Т-В-НК) популяций лимфоцитов опухолевой ткани больных РЖ обнаружено, что у больных мРЖ в структуре TILs значительно преобладают НК-клетки по сравнению с I группой, составив 6,9% против 3,2%, (p=0,019). Напротив, в своей работе Du Y. с соавторами указывает, что по мере увеличения распространенности процесса при РЖ, количество НК-клеток резко уменьшается [60]. В то же время, у больных I группы с прогрессированием медиана НК-клеток статистически значимо выше, чем у больных в процессе наблюдения, 3,80%

против 2,80%, ($p=0,033$). Увеличение уровня НК-клеток негативно влияет на показатель ВВП у больных I группы, $HR=1,382$; 95% ДИ 1,087-1,758, $p=0,008$, и показатель ОВ у больных II группы, $HR=1,249$; 95% ДИ 0,997-1,564, $p=0,053$. Однако, увеличение медианы Т-клеток статистически значимо ниже у больных I группы с прогрессированием заболевания в отличие от больных под наблюдением, 72,70% – 85,60%, ($p=0,002$). Это согласуется с тем, что увеличение значения Т-клеток позитивно влияет на ОВ больных I группы $HR=0,865$; 95% ДИ 0,782-0,957, $p=0,005$. В то же время, китайские исследователи методом проточной цитометрии анализировали Т- и НК-клетки у 65 больных раком желудка и у контрольной группы. Было отмечено увеличение содержания Т-клеток в опухолевой ткани по сравнению со здоровой, тогда как содержание НК-клеток ниже в опухолевой по сравнению со здоровой тканью. Также, наблюдается отрицательная взаимосвязь между процентом НК-клеток и неблагоприятными клиническими признаками рака желудка, такими как размер опухоли, опухолевая инвазия, поражение лимфатических узлов и наличие отдаленных метастазов [112]. Соответственно, низкое содержание НК-клеток в опухолевой ткани предсказывает более низкую частоту общей выживаемости больных и является полезным маркером в прогрессировании рака желудка. Далее была проанализирована структура звена иммунитета в ткани опухоли больных раком желудка. Оказалось, что содержание эффекторных лимфоцитов CD16 (CD16+Perforin+TILs) и CD8 (CD8+Perforin+TILs) и цитотоксического потенциала CD8+ клеток статистически значимо выше у больных мРЖ чем у больных I группы составив 0,5% – 4,3%, ($p=0,000$), 1,8% – 7,7%, ($p=0,002$) и 4,6% – 16,7%, ($p=0,034$) соответственно. При этом, отмечается статистически значимое увеличение данных показателей от I-II к III и к IV стадиям. Например, медиана CD16+Perforin+TILs увеличивается от I к IV ст. составив 0,50% – 4,25%, ($p=0,001$); от III к IV ст., 0,65% – 4,25%, ($p=0,002$). Аналогично и у CD8+Perforin+TILs – от I к IV ст. составив 1,80% – 7,65%, ($p=0,038$); от III к IV ст., 0,70% – 7,65%, ($p=0,005$) и CD8ЦТП+TILs – от III к IV ст., 3,00% – 16,70%, ($p=0,034$) соответственно. По мнению ряда авторов, инфильтрация опухоли CD16

лимфоцитами вариабельна и имеет различное клиническое значение при различных опухолях [56; 108]. Например, повышение числа CD16 и CD8 клеток, сопровождается низким риском прогрессирования при раке простаты и, напротив, имеет плохой прогноз для больных раком почки [54; 65]. Авторы другого исследования заявляют, что, несмотря на предикторную роль инфильтрации CD16 лимфоцитами опухолевой ткани рака молочной железы, сегодня эту популяцию эффекторных клеток можно рассматривать лишь как перспективу для дальнейших разработок их в качестве мишени [26].

Что касается ЦТЛ CD8 (CD3+CD8+TILs), то их процентное содержание у умерших пациентов I группы статистически значимо ниже по сравнению с пациентами в процессе наблюдения – 16,40% против 32,35%, ($p=0,010$). По данным ОФА, увеличение уровня цитотоксических CD8+ лимфоцитов улучшает ОВ у больных I группы, $HR=0,782$; 95% ДИ 0,631-0,970, $p=0,026$. Эти результаты согласуются с японским исследованием, где при анализе 28 образцов опухолевой ткани больных РЖ методом проточной цитометрии при увеличении уровня цитотоксических CD8+ лимфоцитов выявлено увеличение общей выживаемости ($p=0,005$) и отмечается тенденция к увеличению ВВП ($p=0,056$) [79].

Анализ изменений в субпопуляционной структуре Т-клеток можно считать иммунологическим нарушением структурной организации лимфоидных клеток второго уровня. Распределение отдельных популяций Т-лимфоцитов свидетельствует о специфичности иммунного ответа, а для их идентификации также необходимо проведение персонифицированного анализа иммунограмм пациентов. Таким образом, в опухолевой ткани больных метастатическим раком желудка преобладают клетки эффекторы CD16 и CD8, а также цитотоксический потенциал последних. Нарушения со стороны CD8 ЦТЛ в виде их снижения встречаются у умерших пациентов I группы по сравнению с пациентами в процессе наблюдения.

Среди Т-регуляторных клеток в опухолевой ткани больных раком желудка отмечено статистически значимое увеличение содержания НКТ-клеток во II группе по сравнению с I группой, 11,2% против 5,1%, ($p=0,0002$). В то же

время, отмечается статистически значимое увеличение данных показателей от I-II к III и к IV стадиям составив 5,10% при I-II стадиях и 11,15% при IV стадии, ($p=0,0008$) и 5,6% при III ст. к IV ст., ($p=0,003$) соответственно. Эти данные противоречат результатам, где у умерших больных II группы наблюдается статистически значимо низкое содержание НКТ-клеток по сравнению с больными в процессе наблюдения, 7,65% против 13,80%, ($p=0,007$). Отрицательная роль НКТ-клеток подтверждается у больных мРЖ, где увеличение их числа снижает ОВ больных, $HR=0,782$; 95% ДИ 0,631-0,970, $p=0,026$. В противовес, результаты 63 больных РЖ в исследовании Liu-sheng P. et al., показывают, что низкое содержание НКТ-клеток коррелирует с низкой ОВ и характерно для клинических особенностей III-IV ст. [112]. Напротив, Hennequin et al. показали, что низкая инфильтрация Tregs связана с лучшей безрецидивной выживаемостью у пациентов с ранними формами рака желудка [79]. Tregs клетки составляют важное звено иммунной системы, контролирующее ответы эффекторных клеток и обеспечивающее толерантность к собственным антигенам [48]. Соответственно, увеличение популяции регуляторных Т-клеток характерно для больных с большей распространенностью рака желудка..

Помимо этого, среди Т-регуляторных клеток отмечается статистически значимое снижение числа CD8+TILs с фенотипом CD8+CD11b-CD28-TILs у умерших больных I группы по сравнению с больными под наблюдением, 25,40% против 54,70%, ($p=0,013$). По данным ОФА, увеличение уровня CD8 Т-регуляторных лимфоцитов улучшает ОВ у больных I группы, $HR=0,935$; 95% ДИ 0,885-0,989, $p=0,018$. Можно предположить, что уменьшение уровня ЦТЛ CD8 (CD3+CD8+TILs) у умерших больных I группы и позитивное влияние на ОВ больных по данным ОФА обусловлено тенденцией CD8 Т-регуляторных лимфоцитов. Проведенный анализ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, осуществляющих регуляцию иммунных реакций на тканевом уровне показал негативное влияние степени инфильтрации опухоли лимфоцитами и содержания натуральных киллеров и минорных супрессорных/регуляторных лимфоцитов,

NKT-клеток на показатели выживаемости больных раком желудка. Нарушения со стороны T-клеток встречаются реже всего.

Соответственно, понимание клинической роли TILs позволило бы классифицировать пациентов по прогнозу и выявить случаи высокого риска с персонализацией подходов в лечении. Однако, перед использованием TILs в качестве прогностических биомаркеров необходимо стандартизировать предельные значения TILs. Таким образом, в отличие от предыдущих исследований с использованием одного маркера для определения определенного типа иммунных клеток с помощью иммуногистохимии с последующим ручным количественным определением положительных клеток, мы использовали проточную цитометрию для анализа популяций клеток на уровне отдельных клеток. Этот подход позволил идентифицировать клеточные линии или подгруппы путем одновременного использования нескольких моноклональных антител и объективного количественного определения с помощью автоматизированной системы. Из этого следует, что обзор популяций иммунных клеток из опухолевой ткани был возможен, и мы определили процент иммунных клеток среди общего числа исследованных клеток, а также долю каждой иммунной клетки среди их подмножеств иммунных клеток.

Злокачественная опухоль является крайне динамической системой, которую целесообразно рассматривать в комплексе со всеми клиническими и морфологическими составляющими, и формирующими ее микроокружение (клетки стромы, клетки системы иммунитета, кровеносные, лимфатические сосуды и экстрацеллюлярный матрикс), и определяющими общую реакцию организма пациента на развивающийся опухолевый процесс [28].

Так как применение проточной цитометрии возможно лишь при условии проведения исследования в суспензии клеток, дальнейшее отдельное изучение интратуморального и стромального компонентов становится невозможным. iTILs определяются как лимфоциты в опухолевых гнездах, имеющих межклеточные контакты без промежуточной стромы и непосредственно взаимодействующие с опухолевыми клетками, тогда как sTILs расположены в строме между

опухолевыми клетками и не имеют прямого контакта с последними. Поскольку оба варианта TILs локализованы в опухолевой ткани, они представляют собой истинные TILs.

Во многих исследованиях подтверждается прогностическая значимость TILs при раке желудка [76; 95; 105; 184,]. Например, Lee et al. обнаружили, что высокая инфильтрация опухолевой ткани CD8+ Т-клетками связана с улучшением прогноза заболевания [105], тогда как в исследовании Hass et al. корреляции между инфильтрацией CD8+ Т-клетками и клиническим исходом не было обнаружено [76]. Поэтому прогностическая роль TILs при раке желудка остается противоречивой. В то же время, исследования показали, что при оценке TILs следует учитывать состав и расположение иммунного инфильтрата. Так как неясно, имеется ли взаимосвязь между расположением TILs и прогнозом заболевания. Соответственно, несмотря на компонент субъективного анализа метода иммуногистохимического окрашивания, данный способ оценивает пространственное расположение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов.

В нашем исследовании, рассматривались CD4+TILs, CD8+TILs, CD4+/CD8+TILs и их интратуморальные и стромальные компоненты. Было отмечено, что число образцов CD4+sTILs, CD8+sTILs, CD4+/CD8+sTILs в I группе статистически значимо выше по сравнению со II (21,9 кл/п.зр. против 09 кл/п.зр., $p=0,0003$; 38,09 кл/п.зр. против 09 кл/п.зр., $p=0,000004$; 0,489 кл/п.зр. против 09 кл/п.зр., $p=0,00001$ соответственно). Напротив, значение CD4+iTILs и CD8+iTILs встречалось статистически значимо ниже у пациентов с метастатическим (1,1% против 0,2%, $p=0,02$; 24,1% против 3%, $p=0,0027$) по сравнению с локализованными стадиями рака желудка. В то же время, увеличение отношения CD4+/CD8+iTILs является фактором неблагоприятного исхода для выживаемости без прогрессирования у больных ранним и местно-распространенным РЖ, HR=3,264; 95% ДИ 1,09-9,78, $p=0,035$. Наши данные согласуются с метаанализом, включавшем 31 исследование, посвященных взаимосвязи плотности и распределения TILs к прогнозу при раке желудка. При анализе 484 образцов опухолевой ткани больных РЖ, выявлено позитивное

влияние CD8+sTILs на ОВ, HR=0,71; 95% ДИ, p=0,029. Также, в исследовании с включением более 1500 больных CD8+iTILs являются фактором благоприятного прогноза для ОВ, HR=0,73, 95% ДИ, p=0,001 и ВВП HR=0,57;95%ДИ,p=0,029, соответственно. При этом, статистически значимого влияния CD4+TILs вне зависимости от распределения на показатели выживаемости не найдено [183].

Таким образом, результаты метаанализа и проведенное нами наблюдение предоставляют убедительные доказательства того, что TILs могут служить надежным прогностическим маркером у пациентов раком желудка.

В нашем исследовании также представлено новое понимание механизмов, лежащих в основе дисфункции Т-клеток при проведении химиотерапии у больных раком желудка. Так, у 15 больных метастатическим раком желудка после проведения 3-4 курсов химиотерапии отмечалось снижение перфоринового потенциала CD16+ клеток (CD16+Perforin+), 17,7% против 14,1%, (p=0,031) и цитотоксического потенциала CD16+ -клеток (CD16ЦТП), 81,9% – 64,3%, (p=0,009). Напротив, содержание регуляторных минорных популяций лимфоцитов периферической крови с фенотипами CD4+CD25+CD127- и CD8+CD11b-CD28 статистически значимо увеличилось после 3-4 курсов химиотерапии составило 6,2% – 47,0%, (p=0,00007); 12,1% – 18,4%, (p=0,031) соответственно.

Однако результаты исследования He Q. et al. с включением 105 пациентов с местно-распространенным раком желудка разнонаправлены. Образцы крови собирали до и через 1 неделю после последнего введения химиотерапии. Процент CD3+CD8+ лимфоцитов увеличивался после химиотерапии, а содержание CD4+CD25+CD127-регуляторных Т-клеток снижалось (p=0,003 и p<0,001, соответственно). Повышение Т-лимфоцитов обусловлено активацией Т-клеточного иммунитета, но в нашем исследовании отмечалась лишь незначительная тенденция к их росту после 3-4 курсов химиотерапии, от 24,7% до 31,4%. Однако, при оценке величины изменения показателей системного иммунитета до и в процессе химиотерапии из «линейной» структуры периферической крови только у Т-клеток (CD3+CD19-) наблюдается тенденция к

их увеличению. К тому же, содержание CD3+CD8+ цитотоксических лимфоцитов и Tregs увеличивается в процессе химиотерапии. Кроме этого, у пациентов с высоким уровнем CD3+CD8+ ЦТЛ и низким уровнем CD4+ CD25+CD127-Tregs отмечено увеличение ОБ ($p=0,012\%$ и $p=0,048\%$ соответственно). По данным ряда исследований у пациентов с различными видами новообразований выявлена корреляция между CD3+CD19- Т-клетками и CD3+CD8+ ЦТЛ и благоприятным прогнозом [143; 155]. Однако, по данным He Q. et al., содержание CD3+CD19- Т-клеток и CD3+CD4+ЦТЛ после химиотерапии не изменилось и не коррелировало с клиническим течением заболевания, что согласуется с результатами нашего исследования [80].

Соответственно, корреляция между уровнем CD4+CD25+ CD127-Tregs и клиническим исходом указывает на их ключевую роль в прогнозе пациентов раком желудка и может служить биомаркером для выявления пациентов с наилучшим ответом на неоадьювантную химиотерапию.

Наиболее драматичная картина наблюдалась, когда мы сравнили результаты исследования системного клеточного иммунитета в подгруппах, где прогрессирование заболевания зарегистрировано в сроки до 6 месяцев и позднее. У больных мРЖ было выявлено, что высокий уровень CD8 Т-регуляторных клеток с фенотипом CD8+CD11b-CD28- до начала лечения является прогностическим фактором благоприятного прогноза, 12,1% против 5,1%, ($p=0,019$). Наши результаты согласуются с недавним исследованием субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных плоскоклеточным раком (ПКРШГ). При анализе 29 больных с ранними (I-II стадии, $n=16$) и поздними (III-IV стадии, $n=13$) стадиями ПКРГШ выявлено, что у больных с ранними стадиями ПКРГШ (группа А) наблюдалось статистически значимое повышение процента CD8+CD11b-CD28- лимфоцитов, 40,0% – 28,6% [9].

С учетом того, что характер изменения показателей в процессе ХТ также может быть информативен для предсказания раннего прогрессирования, мы сравнили величину данного изменения в зависимости от сроков прогрессирования с границей прогрессирования в 9 месяцев. В зависимости от времени

прогрессирования (до и после 9 месяцев) статистически значимо изменялись эффекторные CD16 клетки с фенотипом CD16+Perforin+, где снижение эффекторных CD16 клеток в процессе химиотерапии характерно больным с прогрессированием до 9 месяцев и наоборот, составив 69,5% против 9,1%, $p=0,013$. По результатам анализа Заботиной Т.Н. и др. при анализе 29 больных с ранними и поздними стадиями ПКРГШ у больных с I-II стадиями ПКРГШ отмечалось повышение содержания CD16 клеток по сравнению с III, IV ст., 22,1% против 18,0% [9]. Соответственно, увеличение уровня эффекторных CD16-клеток с фенотипом CD16+Perforin+ в процессе химиотерапии увеличивает выживаемость без прогрессирования.

Учитывая наши результаты и данные зарубежных исследователей, можно предположить, что в периферической крови больных раком желудка реализация эффекторных функций в процессе химиотерапии происходит за счет CD16-клеток, тем самым увеличивая вероятность пережить ВБП – 9 месяцев.

Несмотря на то, что больным мРЖ до начала лечения характерно повышение уровня эффекторных CD16+ Т-клеток и их цитотоксического потенциала, однако высокий уровень CD8 Т-регуляторных клеток до начала лечения статистически значимо увеличивает вероятность пережить ВБП – 6 месяцев.

Так как большинство исследований было сосредоточено на распределении субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитометрии в периферической крови, то лишь немногие наблюдения методом проточной цитометрии выявили распределение субпопуляций лимфоцитов в опухолевой ткани. Ряд исследований показали, что TILs имеют прогностическое значение у пациентов с различными онкологическими заболеваниями, включая рак молочной железы, меланому, рак легких, яичников, уротелиальной карциноме и др. [24; 38; 68; 69; 81; 168], а также, по данным нашего исследования, и при раке желудка. Кроме того, по данным ранних исследований, TILs связаны с ответом на химиотерапию и прогнозом заболевания [113].

Так, в нашем исследовании при оценке изменения субпопуляционного состава в опухолевой ткани до и в процессе химиотерапии выявлено статистически значимое увеличение процентного содержания цитотоксического потенциала эффекторных CD16+TILs и CD3+CD8+ TILs составив 3,1% против 5,4%, ($p=0,009$), 55,7% против 64,7%, ($p=0,012$) соответственно. Увеличение значения CD3+CD8+ TILs вместе с CD3+CD16+CD56+TILs, CD3+CD19-TILs после неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) наблюдается и у пациентов местно-распространенным раком молочной железы [132].

При этом, содержание CD16 эффекторных опухоль инфильтрирующих лимфоцитов и их цитотоксического потенциала до начала лечения у пациентов с прогрессирующим заболеванием после 6 месяцев статистически значимо выше тех, у кого прогрессирование зарегистрировано до 6 месяцев, 0,5% – 4,6%, ($p=0,030$), 13,2% – 55,7% ($p=0,011$) соответственно. Позже, при исследовании зависимости риска прогрессирования с границей в 9 месяцев от динамики показателей, нами впервые выявлено, что высокое процентное содержание CD3+CD19-TILs, CD3+CD16+CD56+TILs и CD3+CD8+TILs в опухолевой ткани больных мРЖ характерно для прогрессирования до 9 месяцев. Напротив увеличение содержания цитотоксического потенциала CD16-клеток отмечено у больных с благоприятным прогнозом и прогрессированием после 9 месяцев. Таким образом, высокий уровень цитотоксического потенциала эффекторных CD16+TILs до начала лечения и его повышение в процессе химиотерапии коррелирует с высокой ВВП. Однако, высокое процентное содержание Т-, НКТ- и Т-регуляторных CD4+TILs в опухолевой ткани больных мРЖ в динамике является факторами неблагоприятного прогноза с рисками прогрессирования до 9 месяцев. Далее, при сравнительном анализе изменений показателей локального и системного иммунитета в динамике выявлено увеличение цитотоксических CD8 лимфоцитов, НКТ-клеток и CD4-Т-регуляторных клеток в периферической крови и опухолевой ткани у больных мРЖ. По мнению ряда авторов, повышение уровня Tregs как в микроокружении опухоли, так и в периферической крови регистрируется у пациентов раком желудочно-кишечного тракта, раком молочной

железы, раком поджелудочной железы, гепатоцеллюлярным раком и т. д. [43; 66; 135].

Также, впервые выявлены предиктивные признаки иммунофенотипа лимфоцитов до начала лечения в соответствии с низким и высоким рисками вероятности прогрессирования до 6 месяцев. Так, высокий уровень CD8 Т-регуляторных клеток в периферической крови свидетельствуют о низком, напротив низкий уровень перфоринового потенциала эффекторных CD16 клеток и их цитотоксического потенциала в опухолевой ткани о высоком риске и вероятности прогрессирования до 6 месяцев соответственно. Кроме этого, наши результаты впервые выявили прогностические факторы динамики субпопуляций лимфоцитов в периферической крови и опухолевой ткани у больных раком желудка. Так, благоприятным прогностическим фактором с увеличением вероятности прогрессирования после 9 месяцев отмечено при повышении уровня эффекторных CD16-клеток в периферической крови и опухолевой ткани больных мРЖ. Напротив, у больных с вероятностью прогрессирования до 9 месяцев зафиксировано увеличение Т-клеток, НКТ-клеток и CD4+Т-регуляторных клеток в опухолевой ткани.

Несмотря на противоречивые мнения об изменениях в лимфоцитах периферической крови и в образцах опухолевой ткани при раке желудка, в недавнем японском исследовании 44 больных раком шейки матки при сравнительном анализе иммунных клеток в периферической крови и опухолевой ткани было выявлено, что количество CD3+CD19- Т-лимфоцитов значительно выше в опухолевой ткани, чем в периферической крови 68,58% – 55,59%, ($p < 0,001$). Тем не менее, наблюдалось значительное уменьшение популяции CD3+CD4+ Т-клеток в опухолевой ткани по сравнению с периферической кровью 54,04% против 45,85%, ($p < 0,013$), тогда как уровень CD3+CD8+ Т-клеток значительно увеличился в опухолевой ткани по сравнению с периферической кровью 32,37% против 44,92%, ($p < 0,001$). Более того, доля НК-клеток была значительно выше в опухолевой ткани, чем в периферической крови, 0,33% против 4,38%, ($p < 0,079$). При сравнении распределения различных подмножеств

лимфоцитов между рецидивирующими пациентами и пациентами без признаков прогрессирования в опухолевой ткани 35 больных, обнаружено, статистически значимое увеличение CD3+CD4+ TILs у больных без прогрессирования 48,07% против 33,12%, ($p=0,018$) и увеличение CD3+CD8 + TILs у рецидивирующих больных раком шейки матки 57,92% против 42,87%, ($p=0,015$). Однако, данные 44 больных по периферической крови явились достоверно не значимыми [175].

Соответственно, результаты показали, что распределение субпопуляций лимфоцитов в периферической крови не является оптимальным методом для прогноза заболевания, тогда как определение субпопуляций лимфоцитов в опухолевой ткани имеет прогностическую значимость. Полученные в данном исследовании результаты подтверждают, что наиболее полная информация о состоянии противоопухолевого иммунного ответа у онкологических пациентов может быть получена только при одновременном изучении иммунных клеток периферической крови и клеток, инфильтрирующих опухолевую ткань.

Так и в нашем исследовании, при комплексной оценке показателей системного и локального иммунитета, факторов воспаления, определенных методами проточной цитометрии и иммуногистохимии и клинических признаков больных ранними и местно-распространенными формами рака желудка отмечено влияние TILs на показатели выживаемости. Так, для ВВП благоприятным фактором прогноза является увеличение процентного содержания Т-клеток, HR=0,865; 95% ДИ 0,782-0,957, $p=0,005$ и напротив, негативным фактором прогноза является увеличение уровня NK-клеток HR=1,382; 95% ДИ 1,087-1,758, $p=0,008$ в опухолевой ткани больных раком желудка. Однако, для пациентов мРЖ кроме негативного влияния уровня NK-клеток в опухолевой ткани на ОВ, HR=1,420; 95% ДИ 1,06-1,89, $p=0,017$ отмечено, что увеличение уровня нейтрофилов, тромбоцитов и возраста больных также являются факторами неблагоприятного прогноза, но уже для ВВП. Согласно современным представлениям, тромбоцитоз рассматривается как паранеопластический синдром, часто сопровождающий опухолевый рост, и наблюдается у 10-57% онкологических больных [30; 174]. Такой тромбоцитоз ассоциирован с худшим

прогнозом при многих злокачественных новообразованиях, включая рак гортани, легкого, поджелудочной железы, желудка, пищевода, толстой кишки, почек, предстательной железы, шейки матки, эндометрия, яичников и злокачественной мезотелиомы [46; 64; 167; 173; 179]. Также, в последнее время стало известно, что нейтрофилы играют важную роль при злокачественных новообразованиях. Это частично объясняется признанием того, что развитие воспаления, с одной стороны, в организме связано с нейтрофилами, а с другой, является важной характеристикой многих злокачественных новообразований [3; 119]. Доказано, что увеличение числа нейтрофилов является неблагоприятным фактором прогноза при целом ряде злокачественных новообразований, в частности при бронхоальвеолярной карциноме [172], плоскоклеточной карциноме головы и шеи [160], а также меланоме [150].

Таким образом, на прогноз онкологических заболеваний оказывают влияние многие типы клеток организма, в том числе тромбоциты и нейтрофилы. Поэтому, многие доклинические и клинические исследования, посвященные этому направлению, активно продолжаются.

Также интересным явился тот факт, что соотношение CD4⁺/CD8⁺TILs исследуемое методом иммуногистохимии явился неблагоприятным прогностическим фактором в отношении выживаемости без прогрессирования у больных с ранними, и местно-распространенными формами рака желудка.

Одно из первых исследований, сопоставляющих метод проточной цитометрии и иммуногистохимии проведено на больных раком толстой кишки [57]. Известно, что у некоторых больных колоректальном раком отсутствуют антигены HLA-ABC, что объясняется нарушением надзора иммунной системы над опухолевым процессом. Ученые сравнили экспрессию HLA-ABC, HLA-DR, CD80 (B7-1) и CD54 (ICAM-1) в 20 опухолях, используя как традиционную иммуногистохимическую двухслойную технику, так и многопараметрическую проточную цитометрию, стробируя на маркер эпителиальных клеток. Микроскопия срезов показала, что около 5% каждого образца опухоли состояло из нормального эпителия. Однако, даже после коррекции, проточная цитометрия

превзошла иммуногистохимию в 33 из 80 случаев и показала, что опухоли, описанные иммуногистохимическим методом как HLA-ABC-отрицательные были на самом деле слабо положительными [57]. Соответственно, несмотря на высокую воспроизводимость проточной цитометрии и ее превосходство над иммуногистохимией, при выявлении антигенов/эпитопов, присутствующих в небольших количествах, эти два метода дополняют друг друга.

Полученные данные в результате нашего анализа представляют интерес с точки зрения системного подхода к исследованию функционирования иммунной системы. Использование факторного анализа позволило определить ассоциации различных клинических характеристик рака желудка с конкретными направлениями развития иммунного ответа. Несомненно, дальнейшие исследования приведут к лучшему пониманию клинической значимости субпопуляций лимфоцитов при раке желудка.

Таким образом, на основе полученных результатов исследования сегодня можно с уверенностью сказать, что рак желудка является иммунозависимым заболеванием. Даже на ранних стадиях заболевания нами зафиксирован целый ряд статистически достоверных нарушений в структуре циркулирующих лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов опухолевой ткани больных раком желудка. Анализ иммунных реакций организма, выяснение направлений генерации иммунного ответа на тканевом уровне в сочетании с клинико-лабораторными характеристиками больных раком желудка будет способствовать поиску индивидуальных решений для дальнейшего продвижения персонализированного лечения. Разумеется, что определение закономерностей изменения иммунологических показателей в зависимости от стадии и клинического течения, а также сравнение иммунофенотипов опухоли в процессе лечения онкологических больных является вызовом и задачей для будущих исследований, что, возможно, позволит усовершенствовать существующие методы лечения злокачественных новообразований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачественные новообразования желудка являются наиболее распространенными опухолями, занимая шестое место по распространенности во всем мире. Иммунологические нарушения структуры клеток лимфоидной дифференцировки у больных ранними, местно-распространенными и метастатическими формами рака желудка принципиально отличаются. Нами определены факторы благоприятного и неблагоприятного прогнозов среди показателей системного и локального иммунитета у больных раком желудка. Так, например, в опухолевой ткани больных метастатическим раком желудка в сравнении с ранним и местно-распространенным отмечается увеличение НК-лимфоцитов с фенотипом CD3-CD16+56+TILs, тогда как в периферической крови больных I группы – В-клеток с фенотипом CD3-CD19+. Также нами определены нарушения в структуре лимфоцитов системного и локального иммунитета в зависимости от прогрессирования заболевания, где у больных с ранними, местно-распространенными формами рака желудка с прогрессированием отмечено статистически значимое снижение CD3+CD19-TILs и увеличение CD3-CD16+CD56+TILs. Также, выявлено, что у больных мРЖ высок риск и вероятность прогрессирования до 6 месяцев при низком уровне цитотоксического и перфоринового потенциалов эффекторных CD16 клеток с фенотипами CD16ЦТП и CD16+Perforin+ в опухолевой ткани, CD8 Т-регуляторных клеток с фенотипом CD8+CD11b-CD28- в периферической крови до начала химиотерапии. В то же время, при оценке изменения состояния системного и локального иммунитета у больных мРЖ после 3-4 курсов химиотерапии выявлено, что в опухолевой ткани отмечалось повышение содержания цитотоксического потенциала CD16+клеток и цитотоксических лимфоцитов с фенотипами CD16ЦТП TILs и CD3+CD8+TILs. Интересным явился тот факт, что при снижении Т-клеток, НКТ-клеток и CD4 Т-регуляторных клеток в опухолевой ткани и увеличении эффекторных CD16-клеток в периферической крови увеличивалась вероятность достичь длительную ВБП (более 9 месяцев). Одновременно, вероятность умереть у больных ранними и местно-распространенными формами рака желудка возрастала при низком уровне

CD3+CD8+TILs и CD8+CD11b-CD28-TILs до начала лечения. У больных мРЖ вероятность умереть повышалась при низком уровне CD3+CD19- T-клеток в периферической крови и повышенном содержании CD3+CD16+CD56+TILs в опухолевой ткани. Помимо этого, при иммуногистохимическом анализе образцов ткани больных РЖ определено, что у больных ранними и местно-распространенными формами рака желудка стромальная субпопуляция лимфоцитов представлена CD4+sTILs, CD8+sTILs, тогда как у больных мРЖ инфильтрация представлена интратуморальной субпопуляцией лимфоцитов. Впервые нами при выполнении комплексной оценки показателей системного клеточного иммунитета, факторов воспаления, клинических признаков и показателей локального иммунитета, определенных методом проточной цитометрии и иммуногистохимии у больных раком желудка были найдены прогностические факторы, которые отражаются на клиническом течении заболевания. Так, ВБП у больных с ранними, местно-распространенными формами рака желудка и ОВ у больных с метастатическим раком желудка ухудшается при увеличении уровня CD3-CD16+CD56+TILs. Однако увеличение содержания CD3+CD19-TILs является благоприятным фактором прогноза для ВБП у больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ. Напротив, фактором неблагоприятного исхода для ВБП у больных ранним и местно-распространенным РЖ является увеличение соотношения CD4+/CD8+iTILs. Для больных мРЖ увеличение уровня нейтрофилов в периферической крови, а также увеличение инфильтрации опухолевой ткани NK-клетками (CD3-CD16+CD56+TILs) является факторами неблагоприятного прогноза для ОВ.

Полученные знания о функционировании различных клеток лимфоидной дифференцировки в периферической крови и в опухолевой ткани позволили установить направление генерации иммунных реакций у больных раком желудка на системном и тканевом уровне. Тем самым, эти данные в сочетании с клинико-морфологическими данными и их взаимосвязью с показателями выживаемости (ОВ, ВБП) послужили основой для определения прогностических и предиктивных факторов клинического течения и противоопухолевого контроля рака желудка.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены различия показателей системного иммунитета у больных с ранними, местно-распространенными (I группа) и метастатическими формами (II группа) рака желудка. В периферической крови больных ранней и местно-распространенной низкодифференцированной аденокарциномой диффузного типа отмечено уменьшение цитотоксического потенциала CD16-клеток по сравнению с больными мРЖ.

2. Содержание линейных популяций, субпопуляций Т-клеток и функциональной активности клеток-эффекторов, регуляторны популяций лимфоцитов периферической крови и TILs у больных обеих групп отличались. Так, в опухолевой ткани больных мРЖ отмечено увеличение НК (6,9% против 3,2%, $p=0,019$) и НКТ-клеток (11,2% против 5,1%, $p=0,0002$), в периферической крови больных с ранним и местно-распространенным раком желудка – В-клеток (1,6% против 1,0%, $p=0,017$).

3. С увеличением стадии заболевания (I – II/III – IV) уменьшалось общее содержание %TILs (12,10% – 1,90% – 3,40%) в опухолевой ткани и увеличивался перфориновый потенциал CD16+ клеток как в крови (10,4% – 12,5% – 19,1%), так и в ткани (0,50% – 0,65% – 4,25%). Выявлен разнонаправленный характер изменения НКТ-клеток: с увеличением их содержания в опухолевой ткани отмечено снижение в периферической крови (25,1% – 10,7% – 11,1%) у больных с ранними, местно-распространенными и метастатическими формами рака желудка.

4. В зависимости от прогрессирования заболевания определены нарушения в линейной структуре лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, где у больных с ранними, местно-распространенными формами рака желудка с прогрессированием отмечено статистически значимое снижение CD3+CD19-TILs (72,70% против 86,25%, $p=0,008$) и увеличение CD3-CD16+CD56+TILs (3,80% против 2,80%, $p=0,033$).

5. Найдены закономерности показателей системного и локального иммунитета у больных раком желудка, влияющие на вероятность умереть. Для

ранних и местно-распространенных форм рака желудка низкий уровень CD3+CD8+TILs (16,40% против 32,35%, $p=0,010$) и CD8+CD11b-CD28-TILs (25,40% против 54,70%, $p=0,013$). При мРЖ более низкий уровень CD3+CD19- T-клеток (65,55% против 78,60%, $p=0,044$) в периферической крови и повышенное содержания CD3+CD16+CD56+TILs (13,80% против 7,65%, $p=0,072$) в опухолевой ткани .

6. Методом иммуногистохимии определены факторы благоприятного прогноза в виде стромальных субпопуляций лимфоцитов TILs (CD4+sTILs, CD8+sTILs, CD4+/CD8+sTILs) у больных с ранними, местно-распространенными и неблагоприятного прогноза в виде интратуморальных субпопуляций лимфоцитов TILs (CD3+CD4+iTILs, CD3+CD8+iTILs) у больных с метастатическим раком желудка, соответственно.

7. В процессе химиотерапии выявлено статистически значимое повышение цитотоксического потенциала CD16+TILs (55,7 против 64,7, $p=0,012$) и CD3+CD8+TILs клеток (3,1 против 5,4, $p=0,009$), где увеличение первых (-7,5 против 18,1, $p=0,031$) и напротив, снижение Т-клеток (22,0 против -9,7, $p=0,012$), НКТ-клеток (207,9 против -13,8, $p=0,002$) и CD4 Т-регуляторных клеток (190,7 против -25,2, $p=0,002$) в опухолевой ткани и эффекторных CD16-клеток (-69,5% против 9,1%, $p=0,013$) в периферической крови ассоциировалось с увеличением ВВП (более 9 месяцев).

8. Увеличение уровня CD3-CD16+CD56+TILs ухудшает выживаемость без прогрессирования у больных с ранними, местно-распространенными формами рака желудка и общую выживаемость у больных с метастатическим раком желудка (HR=1,382; 95% ДИ 1,087-1,758, $p=0,08$).

Для больных с ранними и местно-распространенными формами РЖ благоприятным фактором прогноза для ВВП было увеличение содержания CD3+CD19-TILs (HR=0,865; 95% ДИ 0,782-0,957, $p=0,05$), а фактором неблагоприятного исхода – увеличение соотношения CD4+/CD8+iTILs (HR=3,264; 95% ДИ 1,09-9,78, $p=0,035$).

Для больных мРЖ факторами неблагоприятного прогноза для ОВ являлись увеличение уровня нейтрофилов в периферической крови (HR=1,64; 95% ДИ 1,12-2,40, p=0,011), а также увеличение инфильтрации опухолевой ткани НК-клетками (CD3-CD16+CD56+TILs) (HR=1,42; 95% ДИ 1,06-1,89, p=0,017). Для ВВП больных мРЖ достоверно значимыми явились возраст, уровень нейтрофилов и тромбоцитов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

в/в	– внутривенно
РЖ	– рак желудка
ЦТЛ	– цитотоксические Т-лимфоциты
CD	– кластер дифференцировки
Tregs	– Т-регуляторные лимфоциты
TILs	– лимфоциты, инфильтрирующие опухоль
sTILs	– стромальные лимфоциты, инфильтрирующие опухоль
iTILs	– интратуморальные лимфоциты, инфильтрирующие опухоль
ОВ	– общая выживаемость
ВБП	– выживаемость без прогрессирования
MSI	– микросателлитная нестабильность
MSI-H	– высокий уровень микросателлитной нестабильности
MSS	– стабильный уровень микросателлитной нестабильности
ISH	– гибридизация <i>in situ</i>
ИНС	– метод иммуногистохимии
G	– степень злокачественности
ЛД	– лимфодиссекция
R ₀ резекция	– радикальная резекция опухоли
TNM	– (аббревиатура от tumor, nodus и metastasis) – международная классификация стадий злокачественных новообразований
NK-клетки	– клетки натуральные киллеры
NKT	– субпопуляция лимфоцитов с одновременной экспрессией Т и NK
ХТ	– химиотерапия
НАХТ	– неoadьювантная химиотерапия
ЧОО	– частота объективных ответов
RECIST	– критерии оценки ответа солидных опухолей
CR	– полный ответ
PR	– частичный ответ

SD	– стабилизация
PD	– прогрессирование заболевания
MHC	– главный комплекс гистосовместимости
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
МКА	– моноклональные антитела
НЛИ	– нейтрофильно-лимфоцитарный индекс
ТЛИ	– тромбоцитарно-лимфоцитарный индекс
ВПЧ	– вирус папилломы человека
ОФА	– однофакторный анализ
ПКРШГ	– плоскоклеточный рак головы и шеи
ТН РМЖ	– трижды негативный рак молочной железы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аруин, Л.И. Рак желудка / Л.И.Аруин // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1999. – №1. – С. 72-78.
2. Бережная, Н.М. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения / Н.М. Бережная // Онкология. – 2009. – Т.1. – №2. – С. 86-93.
3. Бережная, Н.М. Иммунология злокачественного роста /Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун // Наукова думка. – 2005. – С.791.
4. Битанова, Э.Ж. Проточная цитометрия – преимущества метода и области применения / Э.Ж. Битанова, А.С. Тарабаева // Вестник КазНМУ. – 2017. – №4.
5. Борунова А.А. Перфорин-опосредованная цитотоксичность CD16+ лимфоцитов / А.А. Борунова, Г.З. Чкадуа, Т.Н. Заботина // Иммунология. – 2006. – Т. 27, № 1. – С. 4-6.
6. Борунова, А.А. Перфориновый потенциал эффекторных клеток у онкологических больных при вакцинотерапии / А.А. Борунова, Г.З. Чкадуа, Т.Н. Заботина и др. // Вестник ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2005. – №3-4. – С.3–4.
7. Давыдов, М.И. Энциклопедия хирургии рака желудка / М.И. Давыдов, И.Н. Туркин, М.М. Давыдов. – М., 2011. – С.536.
8. Давыдов, М.И. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2004 г. / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина. – 2006. – Т.17, № 3. – С. 132.
9. Заботина, Т.Н. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и инфильтрирующих опухоль у больных плоскоклеточным раком головы и шеи / Т.Н. Заботина, А.И. Черткова, В.Т. Циклаури и др. // Иммунология. – 2019. – Т.40, №3. – С. 10-19.
10. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2016 г. Заболеваемость и смертность / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М., 2018.

11. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2018 г. / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М., 2019.
12. Короткова, О.В. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови больных раком молочной железы / О.В. Короткова, Т.Н. Заботина, Л.В. Скотаренкои др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т.10, №3. – С. 95-98.
13. Кутукова, С.И. Системное воспаление и иммунологическое микроокружение в прогнозе течения солидных опухолей / С.И. Кутукова, Н.П. Беляк, Г.А. Раскин и др. // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т.9, №1. – С. 29-37.
14. Мерабишвили, В.М. Рак желудка: эпидемиология, профилактика, оценка эффективности лечения на популяционном уровне / В.М. Мерабишвили // Практическая онкология. – 2001. – Т.3. – С. 2-8.
15. Никулин, М.П. Рак желудка / М.П. Никулин, В.Ю. Сельчук // Русский медицинский журнал. – 2003. – Т.26, №11. – С. 1441-1449.
16. Никулин, М.П. Минимальная резидуальная болезнь при раке желудка / М.П. Никулин // Иммунология гемопоеза. – 2007. – Т.4, №2. – С. 132-147.
17. Практические рекомендации по лечению злокачественных опухолей Российского общества клинической онкологии, версия 2017. – С. 261-264.
18. Савченко, А.А. Роль Т- и В-клеточного иммунитета в патогенезе онкологических заболеваний / А.А. Савченко, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев и др. // Вопросы онкологии. – 2015. – Т.61, №6. – С. 867-875.
19. Скоропад, В.Ю. Рецидивы рака желудка: закономерности развития, профилактика и лечение / В.Ю. Скоропад, Б.А. Бердов // Российский онкологический журнал. – 2005. – Т.6. – С. 47-52.
20. Соловьева, И.Г. Возможности использования факторного анализа для исследования ассоциаций параметров иммунной системы с клиническими характеристиками рака желудка / И.Г. Соловьева, Л.В. Щербакова, В.С. Кожевников и др. // Медицинская иммунология. – 2010. – Т.12, №1-2. – С. 57-64.

21. Стилиди, И.С. Рак желудка / И.С. Стилиди, С.Н. Неред, А.Б. Рябов // Проблемы клинической медицины. – 2005. – Т.4. – С. 16-20.
22. Тарасов, В.А. Хирургическое лечение распространенных форм рака желудка / В.А. Тарасов, М.В. Виноградов, В.З. Клечиков и др. // Практическая онкология. – 2001. – Т.3. – С. 52-58.
23. Черткова, А.И. Эффекторные и регуляторные Т-лимфоциты периферической крови больных раком молочной железы с тройным негативным фенотипом: связь с клиническим эффектом химиотерапии / А.И. Черткова, Е.Г. Славина, М.А. Окружнова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т.12, №2. – С. 43-47.
24. Adams, S. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199 / S. Adams et al. // J Clin. Oncol. – 2014. – Vol.32. – P. 2959-66.
25. Al-Shibli, K. The prognostic value of intraepithelial and stromal innate immune system cells in non-small cell lung carcinoma / K. Al-Shibli, S. Al-Saad, T. Donnem et al. // Histopathology. – 2009. – Vol.55. – P. 301-312.
26. Ankita, S.R. Is the tumor infiltrating natural killer cell (NK-TILs) count in infiltrating ductal carcinoma of breast prognostically significant? / S.R. Ankita, M.G. Madhu, M. Annu et al. // Asian Pac J Cancer Prev. – 2014. – Vol.15. – №8. – P.3757-3761.
27. Badoual, C. Prognostic value of tumor – infiltrating CD4(+) T-cell subpopulations in head and neck cancers / C. Badoual, S. Hans, J. Rodriguez et al. // Clin. Cancer Res. – 2006. – Vol.12, N2. – P. 465-472.
28. Balch, C. Patterns of human tumor infiltrating lymphocytes in 120 human cancers / C. Balch, L. Riley, T. Bae et al. // Arch. Surg. – 1990. – Vol.125, N2. – P. 200-205.
29. Balsari, A. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer / A. Balsari, A. Merlo, P. Casalini et al. // J Clin. Oncol. – 2009. – Vol.27, N11. – P. 1746-1752.

30. Bambace, N.M. The platelet contribution to cancer progression / N.M. Bambace, C.E. Holmes // *J Thrombosis and Haemostasis*. – 2011. – Vol.9, N2. – P. 237-429.
31. Barbieri, C. Effect of surgical treatment on the cellular immune response of gastric cancer patients / C. Barbieri, M.M. Fujisawa, C. Yasuda et al. // *Brazilian J medical and biological research*. – 2003. – Vol.36. – P. 339-45.
32. Barry, M. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death / M. Barry, R.C. Bleackley // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol.2, N6. – P. 401-409.
33. Bates, G.J. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse / G.J. Bates, S.B. Fox, C. Han et al. // *J Clin Oncol.* – 2006. – Vol.24. – P. 5373-5380.
34. Bendelac, A. The biology of NKT cells / A. Bendelac, P.B. Savage, L. Teyton // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol.25. – P. 297-336.
35. Bernatchez, C. Advances in the treatment of metastatic melanoma: adoptive T-cell therapy / C. Bernatchez, L.G. Radvanyi, P. Hwu // *Semin Oncol.* – 2012. – 39(2). – P. 215-226. doi:10.1053/j.seminoncol.2012.01.006
36. Bhardwaj, N. Harnessing the immune system to treat cancer / N. Bhardwaj // *J Clin Invest.* – 2007. – Vol.117. – P. 1130-1136.
37. Bojarska-Junak, A. Natural killer-like T CD3⁺/CD16⁺CD56⁺ cells in chronic lymphocytic leukemia: intracellular cytokine expression and relationship with clinical outcome / A. Bojarska-Junak, I. Hus, M. Sieklucka et al. // *Oncol Rep.* – 2010. – Vol.24. – P. 803-10.
38. Bremnes, R.M. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in development, progression, and prognosis of non-small cell lung cancer / R.M. Bremnes et al. // *J Thoracic Oncol.* – 2016. – Vol.11. – P. 789-800.
39. Burnette, B. Radiation as an immune modulator / B. Burnette, R.R. Weichselbaum // *Semin Radiat Oncol.* – 2013. – Vol.23. – P. 273-280.
40. CA: Cancer Journal for Clinicians / Vol.68. – Issue6. <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/journal/15424863>

41. Carlson, L.M. Microenvironment of human neuroblastoma supports the activation of tumor-associated T-lymphocytes / L.M. Carlson, A.D. Geer, B. Sveinbjörnsson et al. // *OncoImmunology*. – 2013. – Vol.2. – e.23618.
42. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma / *Nature*. – 2014. – Vol.513. – P. 202-209.
43. Chang, W.C. Clinical significance of regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with human endometrial carcinoma / W.C. Chang, C.H. Li, S.C. Huang et al. // *Cancer*. – 2010. – Vol.116. – P. 5777-5788.
44. Chen, D.S. Oncology meets immunology: the cancer immunity cycle / D.S. Chen, I. Mellman // *Immunity*. – 2013. – Vol.39. – P. 1-10.
45. Chen, J.P. Function and subsets of dendritic cells and natural killer cells were decreased in gastric cancer / J.P. Chen, J. Yang, J.T. Jiang et al. // *Int J Clin Exp Pathol*. – 2014. – Vol.7. – P. 8304-11.
46. Chen, S. Pretreatment platelet count as a prognostic factor in patients with pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis / S. Chen, N. Na, Z. Jian // *Onco Targets Ther*. – 2018. – Vol.11. – P. 59-65.
47. Chiaravalli, A.M. Intratumour T cells, their activation status and survival in gastric carcinomas characterised for microsatellite instability and Epstein-Barr virus infection / A.M. Chiaravalli, M. Feltri, V. Bertolini et al. // *Virchows Arch*. – 2006. – Vol.448. – P. 344-353.
48. Choi, H.S. The prognostic effects of tumor infiltrating regulatory T cells and myeloid derived suppressor cells assessed by multicolor flow cytometry in gastric cancer patients / H.S. Choi, S.Y. Ha, H.M. Kim et al. // *Oncotarget*. – 2016. – Vol.7. – P. 7940-7951.
49. Coussens, L.M. Inflammation and cancer / L.M. Coussens, Z. Werb // *Nature*. – 2002. – Vol.6917, N420. – P.860-7.
50. Clarke, S.L. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T-cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer / S.L. Clarke, G.J. Betts, A. Plant et al. // *Plos one*. – 2006. – Vol.1. – P. 129.

51. Dai, C. Concordance of immune checkpoints within tumor immune contexture and their prognostic significance in gastric cancer / C. Dai, R. Geng, C. Wang et al. // *Mol Oncol.* – 2016. – Vol.10. – P. 1551-1558.

52. Cristescu, R. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes / R. Cristescu, J. Lee, M. Nebozhyn et al. // *Nat Med.* – 2015. – Vol.21. – P. 449-456.

53. Dai, F. The number and microlocalization of tumor-associated immune cells are associated with patient's survival time in non-small cell lung cancer / F. Dai, L. Liu, G. Che et al. // *BMC Cancer.* – 2010. – Vol.10. – P. 220.

54. Daniel, L. Neural cell adhesion molecule expression in renal cell carcinomas relation to metastatic behavior / L. Daniel, C. Bouvier, B. Chetaille et al. // *Hum. Pathol.* – 2003. – Vol.34. – P. 528-532.

55. Demaria, S. Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy / S. Demaria, M.D. Volm, R.L. Shapiro et al. // *Clin Cancer Res.* – 2001. – Vol.7. – P. 3025-3030.

56. Deschoolmeester, V. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients / V. Deschoolmeester, M. Baay, M.E. Van et al. // *BMC Immunol.* – 2010. – Vol.11. – P.1-12.

57. Diederichsen, A. A comparison of flow cytometry and immunohistochemistry in human colorectal cancers / A.Diederichsen, T. Hansen, O. Nielsen et al. // *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica.* – 1998. – Vol.106. – P. 562-70.

58. Dieu-Nosjean, M.C. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures / M.C. Dieu-Nosjean, M. Antoine, C. Danel et al. // *J Clin. Oncol.* – 2008. – Vol.26, N27. – P. 4410-4417.

59. Dirican, A. The effects of hematological parameters and tumor-infiltrating lymphocytes on prognosis in patients with gastric cancer / A. Dirican, N. Ekinici, A. Avci et al. // *Cancer Biomark.* – 2013. – Vol.13. – P.11-20.

60. Du, Y. Therapeutic Potential of Natural Killer Cells in Gastric Cancer /Y. Du, Y. Wei // *Front Immunol.* – 2019. – Vol.9. – P. 3095.

61. Eck, S.C. Differential down-regulation of CD28 by B7-1 and B7-2 engagement / S.C. Eck, D. Chang, A.D. Wells et al. // *Transplantation*. – 1997. – Vol.64. – P. 1497-1499.
62. Filaci, G. CD8⁺CD28⁻ T-regulatory lymphocytes inhibiting T-cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers / G. Filaci, D. Fenoglio, M. Fravega et al. // *J Immunol*. – 2007. – Vol.179, N7. – P. 4323-4334.
63. Fitzmaurice, C. A Systematic analysis for the global burden of disease study / C. Fitzmaurice, C. Allen et al. // *JAMA Oncol*. – 2017. – Vol.3, N4. – P. 524-48.
64. Gannon, P.O. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients / P.O. Gannon, A.O. Poisson, N. Delvoye et al. // *J. Immunol. Methods*. – 2009. – Vol.348. – P.9-17.
65. Gao, L. Prognostic value of combination of preoperative platelet count and mean platelet volume in patients with resectable non-small cell lung cancer / L. Gao, H. Zhang, B. Zhang et al.// *Oncotarget*. – 2017. – Vol.8, N9. – P. 15632-41.
66. Gao, Q. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection / Q. Gao, S.J. Qiu, J. Fan et al. // *J Clin Oncol*. – 2007. – Vol.25. – P. 2586-2593.
67. Gershon, R.K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes / R.K. Gershon, K. Kondo // *Immunology*. – 1970. – Vol.18, N5. – P. 723-737.
68. Gilbert, D.C. Tumour-infiltrating lymphocyte scores effectively stratify outcomes over and above p16 post chemo-radiotherapy in anal cancer / D.C. Gilbert et al. // *Br J Cancer*. – 2016. – Vol.114. – P. 134-7.
69. Goff, S.L. Randomized, prospective evaluation comparing intensity of lymphodepletion before adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with metastatic melanoma / S.L. Goff et al. // *J Clin. Oncol*. – 2016. – Vol.34. – P. 2389-97.
70. Gooden, M.J. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis / M.J. Gooden, G.H. de Bock, N. Leffers et al. // *Br J Cancer*. – 2011. – Vol.105. – P. 93-103.

71. Grabenbauer, G.G. Tumor – infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T-cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma / G.G. Grabenbauer, G. Lahmer, L. Distel et al. // *Clin Cancer Res.* – 2006. – Vol.12, N11. – P. 3355-3360.

72. Grizzi, F. Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer / F. Grizzi, P. Bianchi, A. Malesci et al. // *World J Gastroenterol.* – 2013. – Vol.19, N2. – P. 174-184.

73. Gulubova, M. Decrease in intrahepatic CD56⁺ lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases / M. Gulubova, I. Manolova, D. Kyurkchiev et al. // *Apmis.* – 2009. – Vol.117. – P. 870-9.

74. Gunaldi, M. Prognostic impact of platelet/lymphocyte and neutrophil/lymphocyte ratios in patients with gastric cancer: a multicenter study / M. Gunaldi, S. Goksu, D. Erdem et al. // *Int J ClinExp Med.* – 2015. – Vol.8, N4. – P. 5937-42.

75. Gutkin, D.W. Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration / D.W. Gutkin, M.R. Shurin // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2014. – Vol.63, N1. – P. 45-57.

76. Haas, M. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia / M. Haas, A. Dimmler, W. Hohenberger et al. // *BMC Gastroenterol.* – 2009. – Vol.9. – P. 65.

77. Halama, N. The localization and density of immune cells in primary tumors of human metastatic colorectal cancer shows an association with response to chemotherapy / N. Halama, S. Michel, M. Kloor et al. // *Cancer Immun.* – 2009. – Vol.9. – P. 1.

78. Halama, N. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy / N. Halama, S. Michel, M. Kloor et al. // *Cancer Res.* – 2011. – Vol.71. – P. 5670-5677.

79. Hennequin, A. Tumor infiltration by Tbet⁺ effector T cells and CD20⁺ B cells is associated with survival in gastric cancer patients / A. Hennequin, V. Derangère, R. Boidot et al. // *Oncoimmunology.* – 2015. – Vol.5, N2. – e1054598.

80. He, Q. Impact of the immune cell population in peripheral blood on response and survival in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer / Q. He, G. Li, X. Ji et al. // *Tumor Biology*. – 2017. – Vol.39, N5. – e.101042831769757.

81. Huang, H. Prognostic impact of tumor infiltrating lymphocytes on patients with metastatic urothelial carcinoma receiving platinum based chemotherapy / H. Huang, H.Y. Su, P. Li et al. // *Sci Rep*. – 2018. – Vol.8. – P. 7485.

82. Hu, B. Systemic immune inflammation index predicts prognosis of patients after curative resection for hepatocellular carcinoma / B. Hu, X.R. Yang, Y. Xu et al. // *Clin. Cancer Res*. – 2014. – Vol.20. – P. 6212-22.

83. Huszno, J. The association of tumor lymphocyte infiltration with clinicopathological factors and survival in breast cancer / J. Huszno, E.Z. Nozynska, D. Lange et al. // *Pol J Pathol*. – 2017. – Vol.68. – P. 26-32.

84. Hu, Z.I. Combined radiation therapy and immune checkpoint blockade therapy for breast cancer / Z.I. Hu, A.Y. Ho, H.L. McArthur // *Int J Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2017. – Vol.99. – №1. – P.153-164.

85. Ichihara, F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers / F. Ichihara, K. Kono, A. Takahashi et al. // *Clin Cancer Res*. – 2003. – Vol.9. – P. 4404-4408.

86. Ishigami, S. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma / S. Ishigami, S. Natsugoe, K. Tokuda et al. // *Cancer*. – 2000. – Vol.88. – P. 577-583.

87. Izhak, L. Delicate balance among three types of T cells in concurrent regulation of tumor immunity / L. Izhak, E. Ambrosino, S. Kato et al. // *Cancer Res*. – 2013. – Vol.73. – P. 1514-23.

88. Jensen, H.K. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma / H.K. Jensen, F. Donskov, N. Marcussen et al. // *J Clin Oncol*. – 2009. – Vol.27. – P. 4709-4717.

89. Kamphorst, O. CD4 T-cell immunotherapy for chronic viral infections and cancer / O. Kamphorst, R. Ahmed // Immunotherapy. – 2013. – Vol.5, N9. – P. 975-987.

90. Kang, B.W. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes for gastric cancer in the era of immunology / B.W. Kang, J.G. Kim, I.H. Lee et al. // World J Gastrointest Oncol. – 2017. – Vol.9. – P. 293-299.

91. Kang, B.W. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer / B.W. Kang, A.N. Seo, S. Yoon et al. // Ann Oncol. – 2016. – Vol.27. – P. 494-501.

92. Karagöz, B. CD8+CD28- cells and CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients / B. Karagöz, O. Bilgi, M. Gümüş et al. // Med Oncol. – 2010. – Vol.27, N1. – P. 29-33.

93. Keren, L. A structured tumor-immune microenvironment in triple negative breast cancer revealed by multiplexed ion beam imaging / L. Keren, M. Bosse, D. Marquez et al. // Cell. – 2018. – Vol.174, N6. – P. 1373-1387.

94. Kim, J.S. 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 / J.S. Kim, M.A. Kim, T.M. Kim et al. // British journal of cancer. – 2009. – V.100. – P. 732-738.

95. Kim, K.J. Prognostic implications of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T-cells and CD8+ cytotoxic T-cells in microsatellite-unstable gastric cancers / K.J. Kim, K.S. Lee, H.J. Cho et al. // Hum Pathol. – 2014. – Vol.45. – P. 285-293.

96. Kokordelis, P. CD3(+)CD56(+) natural killer-like T-cells display anti-HCV activity but are functionally impaired in HIV(+) patients with acute hepatitis C / P. Kokordelis, B. Krämer, C. Boesecke et al. // J Acquir Immune Defic Syndr. – 2015. – Vol.70. – P. 338-46.

97. Kollmann, D. Expression of programmed cell death protein 1 by tumor-infiltrating lymphocytes and tumor cells is associated with advanced tumor stage in

patients with esophageal adenocarcinoma / D. Kollmann, D. Ignatova, J. Jedamzik et al. // *Ann Surg Oncol.* – 2017. – Vol.24. – P. 2698-706.

98. Kondratiev, S. Intratumoral CD8⁺ T lymphocytes as a prognostic factor of survival in endometrial carcinoma / S. Kondratiev, E. Sabo, E. Yakirevich et al. // *Clin Cancer Res.* – 2004. – Vol.10. – P. 4450-4456.

99. Kono, K. CD4(+)CD25^{high} regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers / K. Kono, H. Kawaida, A. Takahashi et al. // *Cancer Immunol Immunother.* – 2006. – Vol.55(9). – P. 1064-1071.

100. Krijgsman, D. The role of natural killer T cells in cancer – a phenotypical and functional approach / D. Krijgsman, M. Hokland, P.J. Kuppen // *Frontiers in Immunology.* – 2018. – Vol.9.

101. Kruijf, E.M. The predictive value of HLA class I tumor cell expression and presence of intratumoral Tregs for chemotherapy in patients with early breast cancer / E.M. de Kruijf, J.G. van Nes, A. Sajet et al. // *Clin Cancer Res.* – 2010. – Vol.16. – P. 1272-1280.

102. Kryczek, I. Human TH17 cells are long-lived effector memory cells / I. Kryczek, E. Zhao, Y. Liu et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2011. – Vol.3, N104. – P. 104.

103. Ladoire, S. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival / S. Ladoire, G. Mignot, S. Dabakuyo et al. // *J Pathol.* – 2011. – Vol.224. – P. 389-400.

104. Laidlaw, B.J. The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory / B.J. Laidlaw, J.E. Craft, S.M. Kaech // *Nat. Rev. Immunol.* – 2016. – Vol.16. – P. 102-111.

105. Lee, H.E. Prognostic implications of type and density of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer / H.E. Lee, S.W. Chae, Y.J. Lee et al. // *Br J Cancer.* – 2008. – Vol.99. – P. 1704-1711.

106. Lee, J.S. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis / J.S. Lee, H.S. Won, S. Sun et al. // *Medicine (Baltimore).* – 2018. – Vol.97, N32. – e.11769.

107. Lei, Z. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil / Z. Lei, I.B. Tan, K. Das et al. // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol.145. – P. 554-565.

108. Levy, E.M. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications / E.M. Levy, M.P. Roberti, J. Mordoh et al. // *J. Biomed Biotechnol.* – 2011. – P. 1-11.

109. Lim, K.G. Review of gastric cancer research in Malaysia / K.G. Lim, K.A. Palayan // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2019. – Vol.20, N1. – P. 5-11.

110. Liotta, F. Frequency of regulatory t cells in peripheral blood and in tumor-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma / F. Liotta, M. Gacci, F. Frosali et al. // *BJU Int.* – 2011. – Vol.107. – P. 1500-1506.

111. Liu, K. Tumor- Infiltrating Immune Cells Are Associated With Prognosis of Gastric Cancer / K. Liu, K. Yang, B. Wu et al. // *Medicine (Baltimore)*. – 2015. – Vol.94. – e. 1631.

112. Liu, Sh. Tumor-associated monocytes/macrophages impair NK-cell function via TGF β 1 in human gastric cancer/ Sh. Liu, Z. Jin, T. Yong et al. // *Cancer Immunol Res.* – 2017. – Vol.5, N3. – P. 248-256.

113. Loi, S. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy / S. Loi et al. // *J Clin Oncol.* – 2013. – Vol.31. – P. 860-7.

114. Lu, L. Generation and regulation of CD8⁺ regulatory T-cells / L. Lu, H. Cantor // *Cell Mol Immunol.* – 2008. – Vol.5, N6. – P. 401-406.

115. Lu, P.H. A novel population of expanded human CD3⁺CD56⁺ cells derived from T-cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency / P.H. Lu, R.S. Negrin // *J Immunol.* – 1994. – Vol.153. – P. 1687-96.

116. Magdy, M. Pre-treatment peripheral neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic marker in gastric cancer / M. Magdy, T. Hussein, A. Ezzat et al. // *J Gastrointestinal Cancer.* – 2018.

117. Mahmoud, S.M. Tumor-infiltrating CD8 β lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer / S.M. Mahmoud, E.C. Paish, D.G. Powe et al. // *J Clin Oncol.* – 2011. – Vol.29. – P. 1949-1955.

118. Mahnke, K. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression / K. Mahnke, T. Bedke, A.H. Enk // *Cell Immunol.* – 2007. – Vol.250, N1-2. – P. 1-13.

119. Mantovani, A. Cancer-related inflammation / A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica et al. // *Nature.* – 2008. – Vol.7203, N454. – P. 436-444.

120. Mao, Y. The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer / Y. Mao, Q. Qu, Y. Zhang et al. // *A systematic review and meta-analysis PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, N12. – P. 103-115.

121. Maruyama, K. Gastric cancer treated in 1991 in Japan: data analysis of nationwide registry / K. Maruyama, M. Kaminishi, K. Hayashi // *Gastric cancer.* – 2006. – Vol.9. – P. 51-66.

122. Masaki, T. The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases / T. Masaki, J. A. Berzofsky // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2014. – Vol.63, N3. – P. 199-213.

123. Mei, Z. Tumor-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis / Z. Mei, Y. Liu, C. Liu et al. // *Br J Cancer.* – 2014. – Vol.110. – P. 1595-1605.

124. Meloni, F. Foxp3 expressing CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁻ T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma / F. Meloni, M. Morosini, N. Solari et al. // *Hum Immunol.* – 2006. – Vol.67, N1-2. – P. 1-12.

125. Mizukami, Y. Localisation pattern of Foxp3⁺ regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer / Y. Mizukami, K. Kono, Y. Kawaguchi et al. // *Br J Cancer.* – 2008. – Vol.98, N1. – P. 148-153.

126. Mlecnik, B. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction / B. Mlecnik, M. Tosolini, A. Kirilovsky et al. // *J Clin Oncol.* – 2011. – Vol.29. – P. 610-618.

127. Mohri, Y. Identification of prognostic factors and surgical indications for metastatic gastric cancer / Y. Mohri, K. Tanaka, M. Ohi et al. // *BMC Cancer.* – 2014. – Vol.14. – P. 409.

128. Molina-Castro, S. Gastric cancer: Basic aspects / S. Molina-Castro, J. Pereira-Marques, C. Figueiredo et al. // *Helicobacter.* – 2017. – Vol.22. – P. 12412.

129. Mori, M. An increase in the neutrophil-to-lymphocyte ratio during adjuvant chemotherapy indicates a poor prognosis in patients with stage II or III gastric cancer / M. Mori, K. Shuto, C. Kosugi et al. // *BMC Cancer.* – 2018. – Vol.18, N1. – P. 1261.

130. Müller, P. Metastatic spread in patients with non-small cell lung cancer is associated with a reduced density of tumor-infiltrating T-cells / P. Müller, S.I. Rothschild, W. Arnold et al. // *Cancer Immunol Immunother.* – 2016. – Vol.65. – P. 1.

131. Murakami, Y. Increased regulatory B cells are involved in immune evasion in patients with gastric cancer / Y. Murakami, H. Saito, Sh. Shimizu // *Scientific reports.* – 2019. – Vol.9. – P. 13083.

132. Murta, E.F. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy / E.F. Murta, J.M. de Andrade et al. // *Tumori.* – 2000. – Vol.86, N5. – P. 403-7.

133. Najafian, N. Regulatory functions of CD8⁺CD28⁻ T cells in an autoimmune disease model / N. Najafian, T. Chitnis, A.D. Salama et al. // *J Clin Invest.* – 2003. – Vol.112, N7. – P. 1037-1048.

134. Okines, A.F. 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 / A.F. Okines, A.R. Norman, P. McCloud et al. // *Ann Oncol.* – 2009. – Vol. 20. – P. 1529-1534.

135. Ormandy, L.A. Increased populations of regulatory T-cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma / L.A. Ormandy, T. Hillemann, H. Wedemeyer et al. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol.65. – P. 2457-2464.

136. Oshikiri, T. Prognostic value of intratumoral CD8⁺ T-lymphocyte in extrahepatic bile duct carcinoma as essential immune response / T. Oshikiri, M. Miyamoto, T. Shichinohe et al. // *J Surg Oncol.* – 2003. – Vol.84. – P. 224-228.

137. Page`s, F. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer / F. Page`s, A. Berger, M. Camus et al. // *N Engl J Med.* – 2005. – Vol.353. – P. 2654-2666.

138. Pan, K. The phenotype of ex vivo generated cytokine-induced killer cells is associated with overall survival in patients with cancer / K. Pan, Q.J. Wang, Q. Liu et al. // *Tumour Biol.* – 2014. – Vol.35. – P. 701-7.

139. Passardi, A. Inflammatory indexes as predictors of prognosis and bevacizumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer / A. Passardi, E. Scarpi, L. Cavanna et al. // *Oncotarget.* – 2016. – Vol.22, N7. – P.33210-9.

140. Peng, L.S. Altered phenotypic and functional characteristics of CD3⁺CD56⁺ NKT-like cells in human gastric cancer / L.S. Peng, F.Y. Mao, Y.L. Zhao et al. // *Oncotarget.* – 2016. – Vol.34, N7. – P. 55222-55230.

141. Purwar, R. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells / R. Purwar, C. Schlapbach, S. Xiao et al. // *Nat Med.* – 2012. – Vol.18. – P. 1248-53.

142. Robertson, F.C. NKT cell networks in the regulation of tumor immunity / F.C. Robertson, J.A. Berzofsky, M. Terabe // *Front Immunol.* – 2014. – Vol.5. – P. 543.

143. Ruffell B. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity / B. Ruffell, D.G. DeNardo, N.I. Affara et al. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2010. – Vol.21. – P. 3-10.

144. Sakaguchi, S. The origin of FOXP3- expressing CD4⁺ regulatory T-cells: thymus or periphery / S. Sakaguchi // *J Clin Invest.* – 2003. – Vol.112. – P. 1310-1312.

145. Salgado, R. The evaluation of tumor- infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014 / R. Salgado, C. Denkert, S. Demaria et al. // *Ann Oncol.* – 2015. – Vol.26. – P. 259-71.

146. Sathana, D. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer / D. Sathana, P.A. Beavis, P. Savas et al. // *BMC Medicine.* – 2015. – Vol.13. – P. 202.

147. Schabowsky, R.H. Targeting CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T-cells for the augmentation of cancer immunotherapy / R.H. Schabowsky, S. Madireddi, R. Sharma et al. // *Curr Opin Investig Drugs.* – 2007. – Vol.12, N8. – P. 1002-1008.

148. Schantz, S.P. Patterns of recurrence from head and neck cancer. An immunologic perspective / S.P. Schantz, L.J. Peters // *Am J Clin Oncol.* – 1987. – Vol.10. – P. 469-474.

149. Sharma, P. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma / P. Sharma, Y. Shen, S. Wen et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – Vol.104. – P. 3967-3972.

150. Schmidt, H. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model / H. Schmidt, L. Bastholt, P. Geertsen et al. // *Brit. J. Cancer.* – 2005. – Vol.93, N3. – P. 273-278.

151. Schneiders, F.L. Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up / F.L. Schneiders, R.C. De Bruin, A.J. Van Den Eertwegh et al. // *J Clin Oncol.* – 2012. – Vol.30. – P. 567-70.

152. Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion / R.D. Schreiber, L.J. Old, M.J. Smyth // *Science.* – 2011. – Vol.331. – P. 1565-1570.

153. Schumacher, K. Prognostic significance of activated CD8(+) T-cell infiltrations within esophageal carcinomas / K. Schumacher, W. Haensch, C. Roefzaad et al. // *Cancer Res.* – 2001. – Vol.61. – P. 3932-3936.

154. Shen, Y. Analysis of CD8+CD28-T-supressors cells in gastric cancer patients / Y. Shen, Q.X. Qu, Y.B. Zhu et al. // *J Immunoassay and Immunochemistry*. – 2012. – Vol.33, N2. – P. 149-155.

155. Shen, Z. Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/C8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer / Z. Shen, S. Zhou, Y. Wang et al. // *J Cancer Res Clin. Oncol.* – 2010. – Vol.136. – P. 1585-1595.

156. Simpson, J.A. Intratumoral T cell infiltration, MHC class I and STAT1 as biomarkers of good prognosis in colorectal cancer / J.A. Simpson, A. Al-Attar, N.F. Watson et al. // *Gut*. – 2010. – Vol.59, N7. – P. 926-933.

157. Strioga, M. CD8+CD28- and CD8+CD57+ T-cells and their role in health and disease / M. Strioga, V. Pasukoniene, D. Characiejus // *Immunology*. – 2011. – Vol.134. – P. 17-32.

158. Takenaka, Y. Platelet count and platelet-lymphocyte ratio as prognostic markers for head and neck squamous cell carcinoma: Meta-analysis / Y. Takenaka, R. Oya, T. Kitamiura et al. // *Head Neck*. – 2018. – Vol. 40, N12. – P. 2714-2723.

159. Tan, I.B. Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy / I.B. Tan, T. Ivanova, K.H. Lim et al. // *Gastroenterology*. – 2011. – Vol.141. – P. 476-485.

160. Trellakis, S. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease / S. Trellakis, K. Bruderek, C.A. Dumitru et al. // *Int. J. Cancer*. – 2011. – Vol.129, N9. – P. 2183-2193.

161. Tzankov, A. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma / A. Tzankov, C. Meier, P. Hirschmann et al. // *Haematologica*. – 2008. – Vol.93, N2. – P. 193-200.

162. Urbaniak-Kujda, D. Increased percentage of CD8+CD28- suppressor lymphocytes in peripheral blood and skin infiltrates correlates with advanced disease in

patients with cutaneous T-cell lymphomas / D. Urbaniak-Kujda, K. Kapelko-Słowik, D. Wołowiec et al. // *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. – 2009. – Vol.63. – P. 355-359.

163. Waddell, T. European Society for Medical Oncology (ESMO); European Society of Surgical Oncology (ESSO); European Society of Radiotherapy and Oncology (ESTRO). Gastric cancer: ESMO-ESSO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / T. Waddell, M. Verheij, W. Allum et al. // *Ann Oncol*. – 2013. – Vol.24, Suppl 6. – P. 57-63.

164. Wang, B. Association of intra-tumoral infiltrating macrophages and regulatory T cells is an independent prognostic factor in gastric cancer after radical resection / B. Wang, D. Xu, X. Yu et al. // *Ann Surg Oncol*. – 2011. – Vol.18. – P. 2585-2593.

165. Wang, Z. Activation of STAT3 in human gastric cancer cells via interleukin (IL)-6-type cytokine signaling correlates with clinical implications / Z. Wang, X. Si, A. Xu et al. // *Plos one*. – 2013. – Vol.8. – e.75788.

166. Wang, H. Tumor-derived soluble MICs impair CD3(+)CD56(+) NKT-like cell cytotoxicity in cancer patients / H. Wang, D. Yang, W. Xu et al. // *Immunol Lett*. – 2008. – Vol.120. – P. 65-71.

167. Wang, X. Platelet distribution with correlates with prognosis of gastric cancer / X. Wang, M-M. Cui, S. Fu et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Vol.8. – P. 20213-19.

168. Ward, M.J. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer / M.J. Ward et al. // *British Journal of Cancer*. – 2013. – Vol.110. – P. 489-500.

169. Webb, J.R. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer / J.R. Webb et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2013. – Vol.20. – P. 434-44.

170. Weon-Seon, H. Peripheral blood lymphocytes subsets in patients with stomach cancer/ H. Weon-Seon, S. Young et al. / *J Korean Med. Science*. – 1995. – Vol.10, N3. – P. 164-168.

171. Whiteside, T.L. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? / T.L. Whiteside // *Cancer Immunol Immunother.* – 2014. – Vol.63, N1. – P. 67-72.

172. Wislez, M. Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death / M. Wislez, N. Rabbe, J. Marchal et al. // *Cancer Res.* – 2003. – Vol.63, N6. – P. 1405-1412.

173. Wojtukiewicz, M.Z. Platelets and cancer angiogenesis nexus / M.Z. Wojtukiewicz, E. Sierko, D. Hempel et al. // *Cancer and Metastasis Reviews.* – 2017. – Vol.36, N2. – P. 249-262.

174. Wojtukiewicz, M.Z. Thrombin – unique coagulation system protein with multifaceted impacts on cancer and metastasis / M.Z. Wojtukiewicz, D. Hempel, E. Sierko et al. // *Cancer and Metastasis Reviews.* — 2016. – Vol.35. – P. 213-233.

175. Wu, Y. Clinical significance of peripheral blood and tumor tissue lymphocyte subsets in cervical cancer patients / Y. Wu, S. Ye, S. Goswami et al. / *BMC Cancer.* – 2020. – Vol.20, N1. – P. 173.

176. Yazici, O. Targeted therapies in gastric cancer and future perspectives / O. Yazici, M.A. Sendur, N. Ozdemir et al. // *World J gastroenterology.* – 2016. – Vol.22, N2. – P. 41-89.

177. Yuan, L. Tumor-infiltrating CD4⁺ T cells in patients with gastric cancer / L. Yuan, B. Xu, P. Yuan et al. // *Cancer Cell Int.* – 2017. – Vol.17. – P. 114.

178. Zamarron, B.F. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression / B.F. Zamarron, W. Chen // *Int J Biol Sci.* – 2011. – Vol.7, N5. – P. 651-658.

179. Zhang, H. Higher platelet distribution width predicts poor prognosis in laryngeal cancer / H. Zhang, L. Liu, S. Fu et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol.29, N8. – P. 48138-48144.

180. Zhang, L. Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T-cells by paclitaxel-based chemotherapy / L. Zhang, K. Dermawan, M. Jin et al. // *Clin Immunol.* – 2008. – Vol.129. – P. 219-229.

181. Zhang, L. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer / L. Zhang, J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros et al. // *New England J Medicine*. – 2003. – Vol.348, N3. – P. 203-213.
182. Zhang, S. Immune infiltration in renal cell carcinoma / S. Zhang, E. Zhang, J. Long et al. // *Cancer Sci*. – 2019. – Vol.110, N5. – P. 1564-1572. doi:10.1111/cas.13996
183. Zheng, X. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: A meta-analysis / X. Zheng, X. Song, Y. Shao et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Vol.8. – P. 10.
184. Zhou, S. CCR7 expression and intratumoral FOXP3+ regulatory T cells are correlated with overall survival and lymph node metastasis in gastric cancer / S. Zhou, Z. Shen, Y. Wang et al. // *Plos one*. – 2013. – Vol.8. – e74430.
185. Zhu, L. Microsatellite instability and survival in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis / L. Zhu, Y. Wang, C. Zhang et al. // *Mol Clin Oncol*. – 2015. – Vol.3. – P. 699-705.
186. Zitvogel, L. Immunological aspects of cancer chemotherapy / L. Zitvogel, L. Apetoh, F. Ghiringhelli et al. // *Nat Rev Immunol*. – 2008. – Vol.8. – P. 59-73.
187. Zitvogel, L. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? / L. Zitvogel, L. Apetoh, F. Ghiringhelli et al. // *J Clin Invest*. – 2008. – Vol.118. – P. 1991-2001.