

DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-4-5-15

Цитирование: Хакимова Г.Г., Трякин А.А., Заботина Т.Н., Хакимова Ш.Г. Комплексная оценка системного и локального иммунитета, факторов воспаления и клинических показателей у больных раком желудка. Злокачественные опухоли. 2020; 10 (4), 5–15

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА, ФАКТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И КЛИНИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Г.Г. Хакимова^{1,2}, А.А. Трякин³, Т.Н. Заботина³, Ш.Г. Хакимова^{1,4}

1. Ташкентский педиатрический медицинский институт, Ташкент, Узбекистан

2. Республиканский специализированный Научно-практический Медицинский Центр Онкологии и Радиологии, Ташкент, Узбекистан

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

4. МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

Аннотация

Цель. Изучить состояние системного иммунитета и локального иммунитета у больных аденокарциномой желудка.

Материалы и методы. С 2017 по 2018 г. в ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина 45 первичных больных с аденокарциномой желудка (25 пациентов имели I–III стадии, 20 — IV стадию) получили хирургическое лечение или химиотерапию, соответственно. Забор биологического материала (периферической крови, опухолевой ткани) осуществлялся перед лечением. Методом проточной цитометрии оценивали процентное содержание степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами (CD45+CD14-TILs), число Т-клеток (CD3+CD19-TILs), В-клеток (CD3-CD19+TILs), NK-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs), CD16 и CD8 эффекторных клеток и их цитотоксического потенциала (ЦТП) (CD16+Perforin +TILs; CD16ЦТПTILs), (CD8+Perforin +TILs; CD8ЦТПTILs), регуляторных Т-клеток — NKT-клеток (CD3+CD16+CD56+TILs), CD4 (CD4+CD25+CD127-TILs) и CD8 (CD8+CD11b-CD28-TILs) регуляторных клеток и данные параметры системного иммунитета. Методом иммуногистохимии исследовались интратуморальные и стромальные CD4+TILs, CD8+TILs субпопуляции лимфоцитов, их соотношение (CD4+/CD8+TILs). Проведена оценка прогностической значимости иммунных клеток, факторов воспаления (нейтрофильно-лимфоцитарного индекса, тромбоцитарно-лимфоцитарного индекса) и клинических характеристик (возраст пациента, стадия заболевания, степень дифференцировки, тип по Lauren и статус MSI для общей выживаемости (ОВ) и выживаемости без прогрессирования (ВБП)).

Результаты. Фактором благоприятного прогноза в отношении ВБП у пациентов с локализованными и местно-распространенными формами рака желудка явилось повышение числа CD3+CD19-TILs (ОР 0,865, 95% ДИ 0,782–0,957, $p=0,005$), а неблагоприятного прогноза — повышение NK-клеток (ОР 1,382, 95% ДИ 1,087–1,758, $p=0,008$). Отмечено негативное влияние увеличения содержания NK-клеток, уровня нейтрофилов в периферической крови на ОВ пациентов с метастатическим раком желудка (мРЖ) (ОР 1,42, 95% ДИ 1,06–1,89, $p=0,017$), (ОР 1,64, 95% ДИ 1,12–2,40, $p=0,011$). Увеличение возраста больных, уровня нейтрофилов и тромбоцитов (ОР 1,106, 95% ДИ 1,002–1,199, $p=0,015$; ОР 1,714, 95% ДИ 1,063–2,764, $p=0,027$ и ОР 1,017, 95% ДИ 1,006–1,029, $p=0,003$) снижают показатель ВБП у пациентов с мРЖ.

Вывод. Показатели локального иммунитета, клеточного состава периферической крови, характеризующие системную воспалительную реакцию, и показатели системного иммунитета служат дополнительными прогностическими факторами при раке желудка.

Ключевые слова: аденокарцинома желудка, клеточный иммунитет, локальный иммунитет, субпопуляция лимфоцитов, нейтрофильно-лимфоцитарный индекс, тромбоцитарно-лимфоцитарный индекс.

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) занимает 5-е место среди онкологических заболеваний (1313000 случаев) и является 3-й по частоте причиной смертности от рака (819000 случаев смерти) в мире [1]. В настоящее время не вызывает сомнения,

что злокачественная опухоль — это динамическая система, рассматриваемая в комплексе со всеми морфологически составляющими, формирующими ее микроокружение: клетки стромы, клетки системы иммунитета, кровеносные, лимфатические сосуды и экстрацеллюлярный матрикс [1,2]. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TILs) являются

Собственные исследования

объектом активного изучения [3–5]. Им отводится ключевая роль в концепции «противоопухолевого иммунитета». Кроме этого, клетки системного иммунитета и отвечают за подавление опухолевого роста [6], и, напротив, коррелируют с неблагоприятным прогнозом [7,8]. Прогностическая ценность системных воспалительных индексов, основанных на подсчете соотношений нейтрофилов, лимфоцитов и тромбоцитов в периферической крови пациентов колоректальным раком [9], РЖ [5,10] и гепатоцеллюлярным раком [11] позволяет использовать эти показатели в клинической практике на этапе планирования комплексного лечения пациентов со злокачественными новообразованиями, а также максимально рано выявлять признаки развития 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.

Целью данной работы явилось комплексное изучение структуры опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (tumor-infiltrating lymphocytes — TILs), системного иммунитета и индексов воспаления у пациентов с аденокарциномой желудка, а также оценка их прогностической значимости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование включены больные РЖ, проходившие лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» в период с 2017 по 2018 г. Анализ статуса системного иммунитета в периферической крови, локального иммунитета в опухолевой ткани осуществляли однократно, до начала лечения. Основные критерии включения пациентов в исследование: возраст старше 18 лет, морфологическая верификация опухоли — аденокарцинома желудка, вне зависимости от стадии заболевания. Основные критерии исключения: наличие в анамнезе воспалительных заболеваний за последние 3 мес, поддерживающая антибактериальная и иммуномодулирующая терапия на момент включения в исследование. Лечение проводили согласно существующим стандартам (I–III стадии — хирургическое или комбинированное лечение; IV стадия — лекарственная терапия).

Лабораторные методы

Анализ показателей субпопуляций лимфоцитов периферической крови и опухолевой ткани осуществлялся методом проточной цитометрии в целях определения структуры иммунных клеток: степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами (CD45+CD14-TILs), число Т-клеток (CD3+CD19-TILs), В-клеток (CD3-CD19+TILs), NK-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs), эффекторных клеток CD16 (CD16+Perforin +TILs), CD8 (CD8+Perforin +TILs)

и их цитотоксического потенциала — CD16ЦТПТILs и CD8ЦТПТILs, субпопуляций регуляторных Т-клеток — NKT-клеток (CD3+CD16+CD56+TILs), регуляторных CD4 (CD4+CD25+CD127-TILs) и CD8 (CD8+CD11b-CD28-TILs) клеток и данных показателей клеточного иммунитета. В целях определения пространственного распределения интратуморальных (iTILs) и стромальных (sTILs) субпопуляций лимфоцитов методом иммуногистохимии исследовались показатели субпопуляций CD4+TILs, CD8+TILs и соотношения CD4+/CD8+TILs. Для выявления прогностической ценности клинических маркеров воспаления был проведен расчет следующих соотношений (по результатам клинического анализа крови на этапе исходной оценки): 1) нейтрофильно-лимфоцитарный индекс (НЛИ); 2) тромбоцитарно-лимфоцитарный индекс (ТЛИ).

Проточно-цитометрический анализ

Структуру субпопуляций иммунокомпетентных клеток оценивали по связыванию с моноклональными антителами различной специфичности методом многопараметрового количественного анализа на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences). Для каждого образца анализировали не менее 500–5000 клеток в CD45+гейте. Использовали DotPlot-анализ цитограмм с коммерческим программным обеспечением BD CellQuest PRO software (BD Biosciences). Дальнейшую обработку FSC-файлов первичных цитометрических данных проводили с использованием программного пакета WinMDI, версия 2.8.

Имуногистохимический анализ

На образцах из парафиновых тканей, фиксированных формалином, использовались следующие первичные моноклональные антитела: клон анти-CD4 113 (разведение 1:200; Sino Biological, BDA, Beijing, PR China) и клон анти-CD8SP16 (разведение 1:150; Thermo Scientific, Fremont, CA). Количество иммунных клеток определяли отдельно в интратуморальной и перитуморальной ткани. С помощью микроскопического исследования (×400; BX51; Olympus, Токио, Япония) каждое сечение оценивали на наличие иммунных клеток. Количество иммунных клеток в 10 полях накапливалось и затем усреднялось для расчета среднего числа для 1 компьютеризированного 400-кратно увеличенного микроскопического поля (0,1590 мм²/поле).

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием статистического пакета программ Statistica for Windows v. 10 и SPSS v21. Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию t Стьюдента для нормально распределенных величин или по непараметрическим критериям Манна–Уитни и Вилкоксона. Для сравнения качественных × 2 параметров применяли точный критерий Фишера и χ^2 . Различия считали значимыми при $p < 0,05$ (95%

точности). Степень взаимосвязи параметров оценивали с помощью корреляционного анализа по Спирмену.

Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием статистического пакета лицензионных программ Statistica для Windows v. 10 (однофакторный анализ, корреляционный анализ по Спирмену, описательная статистика сравнения количественных показателей по Манну–Уитни, анализ Каплана–Мейера) и SPSS v21 (ROC-кривые, многофакторный анализ). Количественные переменные отклонялись от нормального распределения (тест Колмогорова–Смирнова) и представлены медианой с указанием 25-го и 75-го квартилей. Категориальные переменные выражали в процентах и абсолютных значениях.

Статистическую значимость различий между количественными показателями вычисляли по t-критерию Стьюдента по непараметрическим критериям Манна–Уитни и Вилкоксона. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера и χ^2 . Различия считали значимыми при $p < 0,05$ (допустимый уровень α -ошибки 5%). Степень взаимосвязи параметров оценивали с помощью корреляционного анализа по Спирмену. Определение границ с оптимальным соотношением чувствительности и специфичности выполняли методом построения ROC-кривой.

Основные оцениваемые параметры

Основными конечными точками в данном исследовании были ОВ и ВБП. ОВ определяли как время от момента постановки диагноза РЖ до момента смерти пациента от любой причины либо до даты последнего контакта с больным. ВБП определяли как время от начала лечения заболевания до времени регистрации роста имеющихся проявлений болезни либо появления новых метастатических очагов. Сравнение кривых выживаемости — с использованием log-rank-теста. Показатели выживаемости рассчитывали из

реальных данных о длительности жизни каждого больного на момент завершения исследования с использованием методики Каплана–Мейера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика пациентов

В исследование было включено 45 пациентов РЖ — 19 (42,2%) мужчин и 26 (57,8%) женщин. Возраст пациентов варьировал от 37 до 80 лет (средний возраст $60,9 \pm 10,9$ года, медиана 62 года). В зависимости от разбиения пациентов на возрастные группы — до 45 лет, 46–60 лет и старше 60 лет — пациенты преимущественно относились к III группе (18 (72,0%) и 9 (45%) к I и II группам, соответственно. Двадцать пять (55,6%) пациентов с локализованным РЖ получили на первом этапе хирургическое лечение (из них 16 (64%) пациентов получали адъювантную терапию) и 20 (44,4%) пациентов с IV стадией получили химиотерапию (II группа) в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» в 2017–2018 гг. Среднее время наблюдения за больными составило $16,4 \pm 6,2$ мес. (от 0,7 до 23,6 мес, медиана 18,5 мес). В I и II группах, по гистологическому строению опухоль была преимущественно низкодифференцированной (56% и 60%) и представлена кишечным типом Lauren (64% и 60%). В хирургической группе у 2 пациентов (4%) имел место высокий уровень MSI.

Исследование клеточного иммунитета в периферической крови

Полученные результаты представлены в табл. 1.

Изучение субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови у 45 больных раком желудка показало уменьшение числа В-клеток при IV стадии по

Таблица 1. Показатели системного клеточного иммунитета у больных раком желудка

| Показатели клеточного иммунитета в крови | Хирургическая группа (I) (n=25) | | Химиотерапевтическая группа (II) (n=20) p | | 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 |

Собственные исследования

Таблица 2. Показатели локального иммунитета у больных раком желудка

| 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 | 3,0–28,60 | 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 | 6,1–13,80 | 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 |

сравнению с I–III (1,0 против 1,6; $p = 0,017$). Напротив, по сравнению с I группой у пациентов II группы содержание CD16+Perforin +эффektorных лимфоцитов и их цитотоксического потенциала оказалось выше 19,1% против 12,1%, ($p = 0,016$); 81,9% и 66,7%, ($p = 0,010$) соответственно.

Исследование клеточного состава опухолевой ткани методом проточной цитометрии

Полученные результаты представлены в табл. 2.

Подгрупповой анализ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) у 45 пациентов РЖ показал, что медиана процентного содержания TILs (CD45+CD14-TILs) достоверно выше у пациентов с I–III стадиями заболевания по сравнению с мРЖ — 6,8% против 3,4% ($p = 0,001$). Напротив, медиана процентного содержания NK-клеток (CD3-CD16+CD56+TILs) повышается по мере увеличения стадии заболевания с 3,2% в I группе до 6,9% во II группе ($p = 0,019$). Медиана процентного содержания эффекторных CD16 (CD16+Perforin +TILs)

у пациентов мРЖ достоверно выше по сравнению с пациентами с локализованными формами РЖ 4,3–0,5%, ($p = 0,002$). Схожая закономерность выявлена и для клеток-эффекторов CD8 (CD8+Perforin +TILs) и CD8ЦТП, составив 7,7–1,8% ($p = 0,002$) и 16,7–4,6% ($p = 0,034$), соответственно. Высокое содержание NKT-клеток (CD3+CD16+CD56+TILs) отмечено у больных мРЖ по сравнению с I–III стадиями заболевания (11,2% и 5,1%, $p = 0,002$).

Исследование клеточного состава опухолевой ткани методом иммуногистохимии

Полученные результаты представлены в табл. 3.

При проведении подгруппового анализа субпопуляций лимфоцитов CD4+TILs, CD8+TILs, соотношения CD4+/CD8+TILs методом иммуногистохимии выявлено, что число стромальных TILs статистически значимо выше в I группе по сравнению со II, у пациентов которой данные субпопуляции sTILs не встречались (медианы 21,9 про-

Таблица 3. Показатели локального иммунитета у больных раком желудка

| Показатели клеточного иммунитета в ткани | | Хирургическая группа (I) (n=25) | | Химиотерапевтическая группа (II) (n=20) | | p |
|--|------------------|---------------------------------|------------|---|----------|--------|
| | | Медиана | Квартили | Медиана | Квартили | |
| CD4 + TILs (кл/п. зр.) | CD4+TILs | 22,2 | 10,5–38,5 | 0,4 | 0–1,1 | 0,001 |
| | CD4+iTILs | 1,1 | 0,4–7,4 | 0,2 | 0–1,1 | 0,021 |
| | CD4+sTILs | 21,9 | 7,7–26,5 | 0 | 0–0 | 0,003 |
| CD8 + TILs (кл/п. зр.) | CD8+TILs | 53,5 | 39,1–106,9 | 3,0 | 0–9,0 | 0,002 |
| | CD8+iTILs | 24,1 | 4,9–37,3 | 3,0 | 0–9,0 | 0,0027 |
| | CD8+sTILs | 38,0 | 11,7–54,9 | 0 | 0–0 | 0,004 |
| CD4 +/CD8 + TILs | CD4 +/CD8 +TILs | 0,35 | 0,19–0,54 | 0,04 | 0–0,32 | 0,001 |
| | CD4 +/CD8 +iTILs | 0,06 | 0,007–0,59 | 0,04 | 0–0,27 | 0,157 |
| | CD4 +/CD8 +sTILs | 0,48 | 0,20–0,61 | 0 | 0–0 | 0,002 |

Таблица 4. Показатели клинических маркеров воспаления у больных раком желудка

| Показатели клинических маркеров воспаления | | Хирургическая группа (I) (n=25) | | Химиотерапевтическая группа (II) (n=20) | | p |
|--|------------|---------------------------------|--------------|---|--------------|-------|
| | | медиана | квартили | медиана | квартили | |
| Показатели периферической крови (109/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 |

тив 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 мРЖ ($p=0,02$, $rs=0,70$; $p=0,0027$, $rs=0,65$) по сравнению с локализованными стадиями заболевания.

Исследование показателей клинических маркеров воспаления

Полученные результаты представлены в табл. 4.

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. При этом повышение числа нейтрофилов и НЛИ встречается преимущественно у мужчин и более выражено в I группе ($r=-0,58$; $r=-0,74$). Повышение числа тромбоцитов чаще встречается при кишечном типе РЖ и преимущественно представлено во II группе ($r=-0,66$).

Прогностическое значение иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови, факторов воспаления, иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, и клинических показателей у больных раком желудка

За время наблюдения с медианой 18,5 (15,2–20,4) месяцев от прогрессирования основного заболевания умерли 3 (12%) из 25 больных I группы и 10 (50%) из 20 пациентов II группы ($p=0,007$). Прогрессирование заболевания зарегистрировано у 29 (62,2%) пациентов: у 20 (100%) во II группе и у 9 (36%) в I-й. В I группе 1-годичная ОВ составила $92,0 \pm 5,4\%$, во II-й — $70,0 \pm 10,2\%$; 1-годичная ВБП — $64,0 \pm 9,6\%$ и $10,0 \pm 6,7\%$, соответственно.

Для определения независимых прогностических признаков, влияющих на показатели ВБП и ОВ, выполнен последовательный регрессионный анализ Кокса. В него были включены показатели системного и локального иммунитета, а также показатели системного воспаления, определенные методом проточной цитометрии и иммуногистохимии.

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.

По данным однофакторного анализа (ОФА) для ОВ I группы достоверно значимыми оказались $CD3+iTILs$ (относительный риск (ОР) 0,894; 95% доверительный интервал (ДИ) 0,813–0,983; $p=0,021$), $CD3+CD8+iTILs$ (ОР 0,782; 95%ДИ 0,631–0,970; $p=0,026$) и $CD8+CD11b-CD28-TILs$ (ОР 0,935; 95%ДИ 0,885–0,989; $p=0,018$), соответственно (рис. 1).

Для ВБП больных I группы достоверно значимыми оказались $CD3+iTILs$ (ОР 0,915; 95%ДИ 0,862–0,971, $p=0,003$), $CD3-CD16+CD56+iTILs$ (ОР 1,195; 95%ДИ 1,042–1,369; $p=0,011$), ТЛИ по диапазонам (ОР 0,21; 95%ДИ 0,06–0,72; $p=0,013$), $CD4+/CD8+iTILs$ (ОР 3,26; 95%ДИ 1,09–9,78; $p=0,035$), соответственно (рис. 1, 2).

По данным однофакторного анализа для ОВ II группы достоверно значимыми оказались уровни нейтрофилов (ОР 1,33; 95%ДИ 1,08–1,65; $p=0,008$), тромбоцитов (ОР 1,01; 95%ДИ 1,00–1,02; $p=0,006$), $CD3+CD19-$ (ОР 0,91; 95%ДИ 0,085–0,97; $p=0,007$) и $CD3-CD16+CD56+$ (ОР 1,09; 95%ДИ 1,02–1,16; $p=0,007$) периферической крови, а также $CD3-CD16+CD56+iTILs$ (ОР 1,202; 95%ДИ 1,011–1,429;

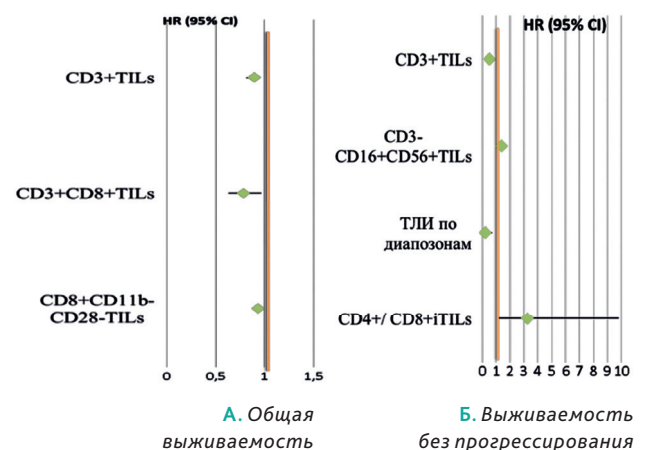


Рисунок 1. Величина рисков, влияющих на ОВ и ВБП у больных I группы.

Собственные исследования

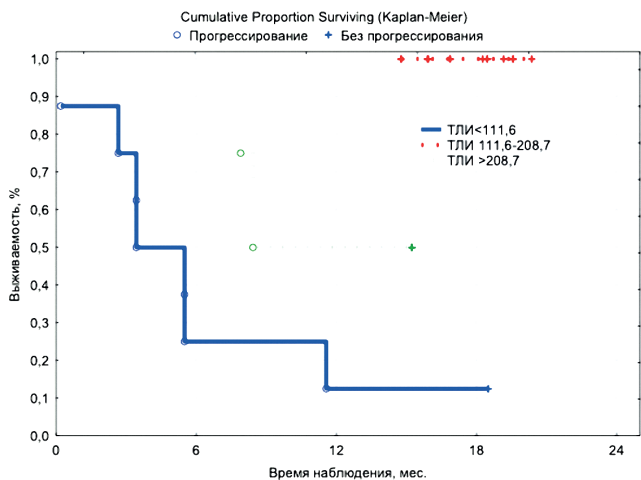


Рисунок 2. Влияние тромбоцитарно-лимфоцитарного индекса на ВБП у больных I группы.

$p=0,037$) и $CD3+CD16+CD56+TILs$ (ОР 1,112; 95%ДИ 1,012–1,221; $p=0,027$) опухолевой ткани (рис. 3).

Для ВБП II группы достоверно значимыми оказались возраст пациентов (ОР 1,06; 95%ДИ 1,01–1,12; $p=0,012$), уровень нейтрофилов (ОР 1,34; 95%ДИ 1,07–1,67; $p=0,010$), тромбоцитов (ОР 1,01; 95%ДИ 1,01–1,02; $p=0,0006$), НЛИ (ОР 2,80; 95%ДИ 1,36–5,75; $p=0,005$), $CD3-CD16+CD56+$ (ОР 1,05; 95%ДИ 1,01–1,10; $p=0,023$) и ЦТПCD16 (ОР 1,06; 95%ДИ 1,01–1,11; $p=0,018$) периферической крови, а также $CD45+CD14-TILs$ (ОР 1,003; 95%ДИ 1,000–1,006; $p=0,041$), $CD3+CD19-TILs$ (ОР 0,952; 95%ДИ 0,908–0,998; $p=0,041$), $CD3-CD19+TILs$ (ОР 1,058; 95%ДИ 1,001–1,117; $p=0,045$) опухолевой ткани (рис. 3–6).

Выполнение многофакторного регрессионного анализа по Коксу для ОВ I группы не позволило построить значимую математическую модель с независимыми факторами. Однако многофакторный регрессионный анализ по Коксу

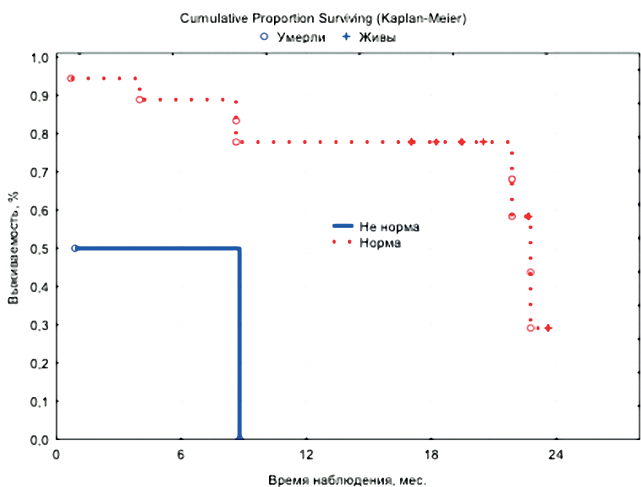


Рисунок 4. Влияние уровня нейтрофилов (норма/не норма) на показатели выживаемости: А — ОВ; Б — ВБП у больных II группы

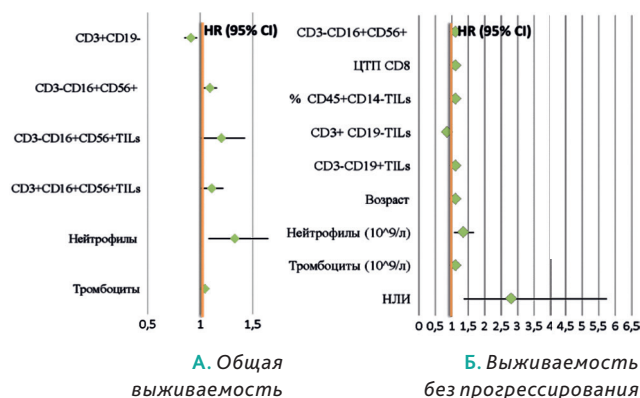
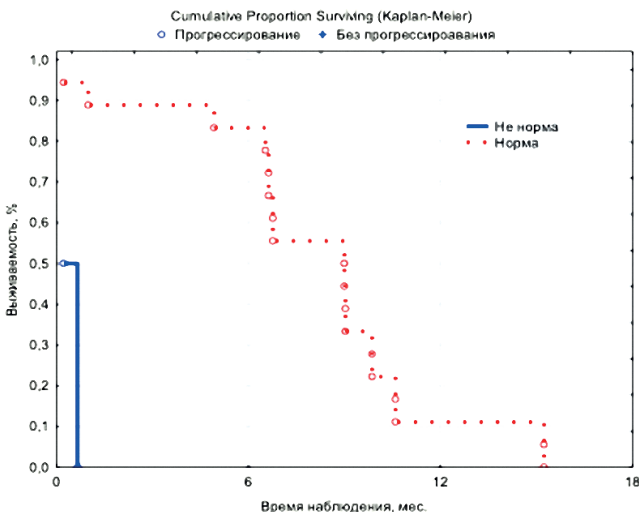


Рисунок 3. Величина рисков, влияющих на ОВ и ВБП у больных II группы.

для ВБП показал, что увеличение относительного содержания Т-клеток ($CD3+CD19-TILs$) является благоприятным фактором прогноза у больных I группы (ОР 0,865, 95% ДИ 0,782–0,957, $p=0,005$). Напротив, повышение НК-клеток ($CD3-CD16+CD56+TILs$) ухудшает показатель ВБП (ОР 1,382, 95% ДИ 1,087–1,758, $p=0,008$).

Многофакторный регрессионный анализ по Коксу для ОВ II группы показал, что увеличение уровня нейтрофилов в периферической крови (ОР 1,64, 95% ДИ 1,12–2,40, $p=0,011$), а также увеличение инфильтрации опухолевой ткани НК-клетками ($CD3-CD16+CD56+TILs$) (ОР 1,42, 95%ДИ 1,06–1,89, $p=0,017$) являются факторами неблагоприятного прогноза для ОВ у больных МРЖ.

Многофакторный регрессионный анализ по Коксу для ВБП II группы продемонстрировал, что увеличение возраста (ОР 1,106, 95%ДИ 1,020–1,199, $p=0,015$), уровня нейтрофилов (ОР 1,714, 95%ДИ 1,063–2,764, $p=0,027$) и тромбоцитов (ОР 1,017, 95%ДИ 1,006–1,029, $p=0,003$) ухудшают показатель выживаемости без прогрессирования у больных МРЖ.



Собственные исследования

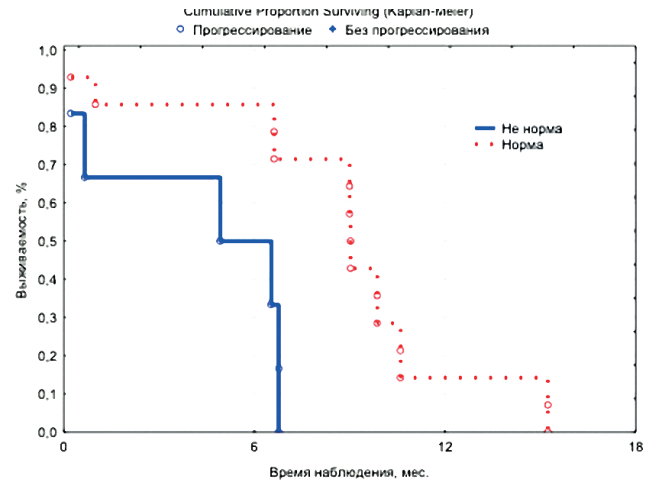
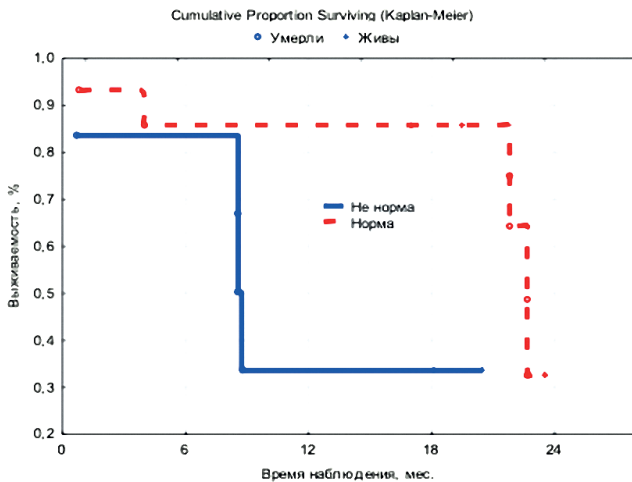


Рисунок 5. Влияние уровня тромбоцитов (норма/не норма) на показатели выживаемости: А — ОВ; Б — ВБП у больных II группы

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие злокачественной неоплазии является сложным процессом, зависящим от взаимодействия отдельных клеток в опухоли, микроокружения и иммунной системы, которые могут как стимулировать, так и подавлять рост и инвазию опухоли [12]. Результаты данного исследования, где содержание Т-клеток является фактором благоприятного прогноза для ОВ больных мРЖ, а увеличение НК-клеток ухудшает показатели ОВ и ВБП у больных мРЖ согласуются с исследованием Bass et al. [13]. Исследование сопряженности 2-х групп (Т-клеток и НК-клеток) 152 образцов периферической крови больных РЖ показало, что у пациентов группы Т-клеток в сравнении с группой НК-клеток значительно 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%, ($p=0,01$). У пациентов группы НК-клеток 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 [13]. С одной стороны, приведенные выше данные позволяют предположить, что существуют процессы взаиморегуляции между указанными направлениями дифференцировки предшественников Т-и НК-клеток. Возможно, подобный баланс является одним из механизмов адаптации при развитии стресс-реакции. С другой стороны, такая сопряженность может говорить об обратном: указанные клетки близки по происхождению, но их лимфопозид идет независимо, поэтому факторы, вызывающие угнетение Т-клеток, не влияют на НК-клетки, которых продуцируется «нормальное» количество, и их становится «относительно» больше (и наоборот).

Согласно последним данным зарубежной литературы, НЛИ и ТЛИ могут являться информативными факторами прогноза течения РЖ в связи с обнаруженным их влиянием на ОВ пациентов. Так, по данным Mori et al., повышение значения НЛИ у пациентов с аденокарциномой желудка, получавших адъювантную химиотерапию, является фактором неблагоприятного прогноза, влияющим как на ОВ, так и на БРВ [2]. Эти данные согласуются с результатами однофакторного анализа, где НЛИ явился негативным фактором прогноза для ВБП у больных мРЖ. С помощью метода построения ROC-кривой были определены границы с оптимальным соотношением чувствительности и специфичности. Для нейтрофилов граница составила $5 \times 10^9/\text{л}$, а их количество напрямую коррелировала со стадией заболевания. Оказалось, что уровень нейтрофилов достигает своего максимума при III стадии болезни, а при I–II и IV стадиях показатели находятся в пределах $3,48\text{--}3,63 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,045$). Метод построения ROC-кривой определил границы с оптимальным соотношением чувствительности и специфичности для тромбоцитов, что

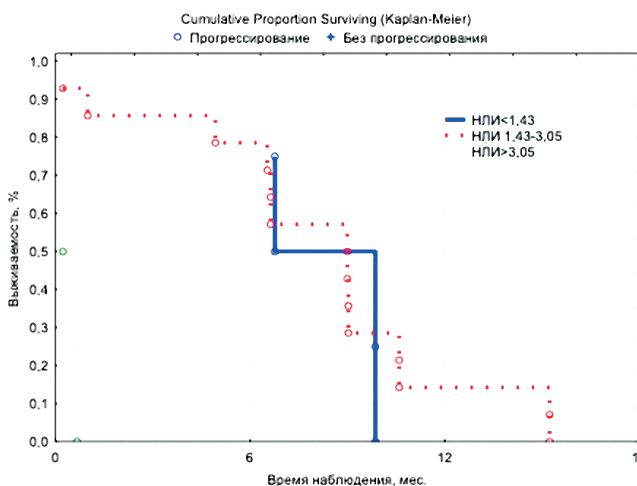


Рисунок 6. Влияние нейтрофильно-лимфоцитарного индекса на ВБП у больных II группы.

Собственные исследования

составило $270 \times 10^9/\text{л}$. 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, ($p=0,045$). Аналогичные результаты 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 ОВ, так и на безрецидивную выживаемость [3].

TILs действуют как главные детерминанты иммунного ответа человека на опухолевые клетки. Считается, что степень инфильтрации TILs связана с контролем роста и метастазирования рака, а также с прогнозированием ответа на химиотерапию и лучевую терапию. Тем не менее, результаты исследований по их изучению при злокачественных опухолях молочной железы, пищевода и легких противоречивы [14–16]. В частности, из-за небольшого объема выборки и исследования различных подгрупп Т-клеток прогностическая роль TILs при РЖ еще не была полностью определена. Однако в мета-анализе 2017 года с включением более 30 исследований было выявлено, что повышение относительного содержания Т-клеток увеличивает ОВ (ОР 0,52, 95% ДИ 0,43–0,63, $p=0,001$) [13]. Аналогичные результаты получены и в нашем исследовании. Медиана высокого процентного содержания Т-клеток коррелировала с ОВ и ВБП в обеих группах. При этом при выполнении многофакторного анализа по Коксу выявлена корреляция между уровнем Т-клеток и увеличением ВБП у пациентов с ранними и местно-распространенными формами РЖ (ОР 0,862, 95% ДИ 0,782–0,957, $p=0,005$). При однофакторном исследовании отмечено влияние цитотоксических CD8 Т-лимфоцитов на показатель ОВ у пациентов 1-й группы (ОР 0,782, 95% ДИ 0,631–0,970, $p=0,026$). Данные подтверждаются работами Lu et al., исследовавших роль CD3+CD8+TILs у пациентов РЖ после адъювантной химиотерапии, где их высокий уровень уменьшал риск прогрессирования (ОР 0,37, 95% ДИ 0,23–0,57, $p=0,001$) [17].

В настоящее время ключевую роль в уклонении от иммунного надзора отводят регуляторным Т-клеткам. Они представляют собой разновидность Т-лимфоцитов с иммунорегуляторной способностью, которые могут ингибировать пролиферацию и секрецию цитокинов эффекторными Т-лимфоцитами. Ряд исследований подтвердил, что регуляторные CD8 клетки и НКТ-клетки являются факторами неблагоприятного прогноза и коррелируют с прогрессированием заболевания при РЖ [18–20]. Например, анализ Т-регуляторных клеток ранее не леченных пациентов РЖ и контрольной группы выявил, что процентное содержание НКТ-клеток в опухолях было значительно ниже, чем в неопухолевых тканях (18,1% против 26,5%, $p < 0,01$). Кроме этого, низкий уровень Т-регуляторных клеток прямо пропорционален клинической стадии заболевания, включая размер опухоли, инвазию опухоли и отдаленные метастазы [21]. Таким образом, эти данные позволяют предположить,

что уменьшение количества Т-регуляторных клеток связано с прогрессированием опухоли и снижением ОВ пациентов РЖ. Напротив, полученные результаты многофакторного анализа у пациентов мРЖ показали, что увеличение относительного содержания НКТ-клеток является фактором неблагоприятного прогноза для ОВ (ОР 1,127, 95% ДИ 1,025–1,239, $p=0,013$). Еще одним широко исследуемым показателем локального иммунитета являются НК-клетки. Считается, что естественная цитотоксичность, опосредованная НК-клетками, играет важную роль в ингибировании метастазирования опухолей, а снижение активности НК-клеток приводит к высокой частоте возникновения опухолей. Несмотря на убедительные данные экспериментальных исследований, роль НК-клеток в иммунологическом надзоре все еще плохо определена. В работе Takeuchi et al. при исследовании 156 пациентов РЖ II–III стадии выявлено, что 5-летняя ОВ была выше в группе больных, где процентное содержание их было выше (больше 25%, $p=0,05$) [22]. Согласно многофакторным анализам, повышение уровня НК-клеток ухудшало ВБП у пациентов с ранними и местно-распространенными формами РЖ (ОР 1,382, 95% ДИ 1,087–1,758, $p=0,008$) и ОВ у пациентов мРЖ (ОР 1,249, 95% ДИ 0,997–1,564, $p=0,053$). Эти данные показали, что активность НК-клеток может быть связана с объемом и распространением опухоли. Например, изменение предоперационной активности НК-клеток может иметь значение для прогноза пациентов с локализованным РЖ и для последующего клинического лечения. Таким образом, у больных раком желудка увеличение уровня Т-клеток сопровождается увеличением ВБП, и, напротив, рост процентного содержания НК-клеток является фактором неблагоприятного прогноза. Для пациентов мРЖ с сохранением линейности соотношения основных иммунных клеток показатели локального иммунитета влияют как на ОВ, так и на ВБП. Увеличение процентного содержания НК-клеток и НКТ-клеток коррелирует со снижением ОВ. В то же время, с увеличением возраста пациентов и степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами увеличивается вероятность прогрессирования заболевания. Соответственно, субпопуляции иммунокомпетентных клеток локального иммунитета играют особую роль при РЖ и приводят к различным исходам у пациентов.

Так как применение проточной цитометрии возможно лишь при условии проведения исследования в суспензии клеток, дальнейшее раздельное изучение интратуморального и стромального компонентов становится невозможным. Поскольку оба варианта TILs локализованы в опухолевой ткани, они представляют собой истинные TILs. Недавние 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 расположе-

ние опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Наши данные согласуются с данными мета-анализа, включавшего 31 исследование и посвященного взаимосвязи плотности и распределения TILs с прогнозом при раке желудка. При анализе 484 образцов опухолевой ткани больных РЖ, выявлено позитивное влияние CD8+tTILs на ОВ, HR = 0,71; 95% ДИ, $p = 0,029$. В исследовании с включением более 1500 больных CD8+iTILs являются фактором благоприятного прогноза для ОВ, HR = 0,73, 95%ДИ, $p = 0,001$ и ВБП 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 [13]. Соответственно, 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.

Полученные нами результаты свидетельствуют о возможности использования показателей клеточного иммунитета опухолевой ткани, системного иммунитета и воспалительного ответа у больных РЖ в качестве дополнительных прогностических маркеров оценки ВБП и ОВ.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гулноз Г. Хакимова, к. м. н., врач-онколог отделения химиотерапии Ташкентского городского филиала Республиканского специализированного Научно-практического Медицинского Центра Онкологии и Радиологии, Ташкент, Узбекистан, e-mail: hgg_doc@mail.ru.

Алексей А. Трякин, д. м. н., заведующий онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтическое) № 2, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Татьяна Н. Заботина, д. б. н., заведующий отделением клиничко-лабораторной диагностики, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Шахноз Г. Хакимова, к. м. н., Ташкентский педиатрический медицинский институт, Ташкент, Узбекистан, отделение реконструктивно-пластической хирургии молочной железы и кожи, МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-4-5-15

For citation: Khakimova G.G., Tryakin A.A., Zabolina T.N., Khakimova Sh.G. Comprehensive assessment of the systemic and local immunity, inflammatory factors and clinical indicators in patients with gastric cancer. *Malignant Tumours*. 2020; 10 (4), 5–15 (In Russ.)

COMPREHENSIVE ASSESSMENT OF THE SYSTEMIC AND LOCAL IMMUNITY, INFLAMMATORY FACTORS AND CLINICAL INDICATORS IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

G. G. Khakimova^{1,2}, A. A. Tryakin³, T. N. Zabolina³, Sh. G. Khakimova^{1,4}

1. *Tashkent Pediatric Medical Institute, Tashkent, Uzbekistan*

2. *Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Oncology and Radiology, Tashkent, Uzbekistan*

3. *N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia*

4. *P. Hertzgen Moscow Oncology Research Institute — Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russia*

Abstract:

Objective. To study the state of cellular immunity and local immunity in patients with gastric adenocarcinoma.

Materials and methods. From 2017 to 2018 45 primary patients with gastric adenocarcinoma (25 — with stages I–III, 20 — with stage IV) received surgical/combined treatment or chemotherapy at the Blokhin Scientific Research Center of Oncology, respectively. Peripheral blood and tumor tissue were collected before starting treatment. The percentage of the degree of infiltration of tumor tissue by lymphocytes (CD45+CD14-TILs) was assessed by flow

Собственные исследования

cytometry: T-cells (CD3+CD19-TILs), B-cells (CD3-CD19+TILs), NK-cells (CD3-CD16+CD56+TILs), effector cells CD16 and CD8 and their cytotoxic potential (CD16+Perforin+TILs, CD16CTPTILs), (CD8+Perforin+TILs; CD8CTPTILs); subpopulations of regulatory T-cells — NKT-cells (CD3+CD16+CD56+TILs), regulatory CD4-cells (CD4+CD25+CD127-TILs) and CD8 (CD8+CD11b-CD28-TILs) and parameters of systemic immunity. Intratumoral and stromal subpopulations of CD4+TILs, CD8+TILs, CD4+/CD8+TILs ratios were studied by immunohistochemistry. Also, the cellular composition of peripheral blood was investigated. The prognostic significance of immune cells, inflammation factors (neutrophil-lymphocyte index, platelet-lymphocyte index) and clinical characteristics (patient's age (both by years and by groups: up to 45 years, 46–60 years, over 60 years), disease stage, differentiation (G), Lauren type and MSI status were evaluated for overall survival (OS) and progression-free survival (PFS).

Results. The factor of a favorable prognosis for PFS in patients with local and locally advanced forms of gastric cancer was an increase in the number of CD3+CD19-TILs (HR0.865, 95%CI 0.782–0.957, $p = 0.005$), and for poor prognosis — an increase in NK-cells; HR1.382, 95%CI 1.087–1.758, $p = 0.008$. There was a negative effect of the relative content of NK-cells, an increase in the level of neutrophils in the peripheral blood on the OS of patients with metastatic GC (HR1.42, 95%CI 1.06–1.89, $p = 0.017$ and HR1.64, 95%CI 1.12–2.40, $p = 0.011$). At the same time, an increase in the age of patients, the level of neutrophils and platelets (HR1.106, 95%CI 1.002–1.199, $p = 0.015$; HR1.714, 95%CI 1.063–2.764, $p = 0.027$ and HR1.017, 95%CI 1.006–1.029, $p = 0.003$) reduce PFS in patients with metastatic gastric cancer.

Conclusion. Indicators of local immunity, the cellular composition of peripheral blood, characterizing the systemic inflammatory response, as well as indicators of systemic immunity can serve as additional prognostic factors in gastric cancer.

Key words: gastric adenocarcinoma; cellular immunity; local immunity; subpopulation of lymphocytes; neutrophil-lymphocyte index; platelet-lymphocyte index.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Gulnoz G. Khakimova, MD, PhD, oncologist, Department of the Tashkent City Branch of the Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Oncology and Radiology, Tashkent, Uzbekistan, e-mail: hgg_doc@mail.ru

Alexey A. Tryakin, MD, PhD, DSc, Head of the Oncology Department Drug Methods of Treatment (chemotherapy) № 2 N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Tatyana N. Zabolina, MD, DSC Biol, Head of the Department of Clinical and Laboratory Diagnostics, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

Shakhnoz G. Khakimova, MD, PhD, Tashkent Pediatric Medical Institute, Tashkent, Uzbekistan, Department of Breast and Skin Reconstructive Plastic Surgery, P. Herten Moscow Oncology Research Institute — Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russia

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

1. Бережная Н. М. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения. Онкология. 2009; 1 (2): 86–93.
2. Mantovani A. et al. Tumor immunity: effector response to tumor and role of the microenvironment. *Lancet* 2008; 371 (9614): 771–83.
3. Тупицын Н. Н. Иммунофенотип рака молочной железы. В кн.: Рак молочной железы. Под ред. Н. Е. Кушлинского, С. М. Портного, К. П. Лактионова. М.: Издательство РАМН, 2005; с. 174–97.
4. Balch C., Riley L., Baer T. et al. Patterns of human tumor infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch Surg* 1990; 125 (2): 200–5.
5. Galon J., Pages F. et al. Cancer classification using the immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 2012; 10: 205.
6. Zamarron B. F., Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci.* 2011; 7 (5): 651–658.
7. Ruffell B., DeNardo D. G., Affara N. I. et al. Lymphocytes in cancer development: polarization towards protumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21: 3–10.
8. Shen Z. Zhou S., Wang Y. et al. Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/C8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J Cancer Res Clin. Oncol.* 2010; 136:1585–1595.

9. Mori M., Shuto K., Kosugi C. et al. An increase in the neutrophil to lymphocyte ratio during adjuvant chemotherapy indicates a poor prognosis in patients with stage II or III gastric cancer. *BMC Cancer*. 2018;18 (1):1261.
10. Passardi A., Scarpi E., Cavanna L. et al. Inflammatory indexes as predictors of prognosis and bevacizumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* 2016;7 (22):33210–9. DOI: 10.18632/oncotarget. 8901.
11. Gunaldi M., Goksu S., Erdem D. et al. Prognostic impact of platelet/lymphocyte and neutrophil/lymphocyte ratios in patients with gastric cancer: a multicenter study. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8 (4):5937–42.
12. Zheng X., Song X., Shao Y. et al. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8. 10.18632/oncotarget. 18065.
13. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014; 513: 202–209.
14. Müller P., Rothschild S. I., Arnold W. et al. Metastatic spread in patients with non-small cell lung cancer is associated with a reduced density of tumor-infiltrating T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2016; 65: 1–1.
15. Kollmann D., Ignatova D., Jedamzik J. et al. 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. *Ann Surg Oncol* 2017; 24: 2698–706.
16. Huszno J., Nożyńska E. Z., Lange D. et al. The association of tumor lymphocyte infiltration with clinicopathological factors and survival in breast cancer. *Pol J Pathol* 2017; 68: 26–32.
17. Lu J., Xu Y., Wu Y. et al. Tumor-infiltrating CD8+ T cells combined with tumor-associated CD68+ macrophages predict postoperative prognosis and adjuvant chemotherapy benefit in resected gastric cancer. *BMC Cancer* 2019; 920 (19).
18. Ebihara T., Sakai N., Koyama S. Suppression by sorted CD8+ CD11b-cells from T-cell growth factor-activated peripheral blood lymphocytes on cytolytic activity against tumor in patients with gastric carcinoma. *Eur J of Cancer* 1991; 27 (12): 1654–7/19. Hou J., Yu Z., Xiang R. et al. Correlation between infiltration of FOXP3+ regulatory T cells and expression of B7-H1 in the tumor tissues of gastric cancer. *Exp Molecular Pathol* 2014; 96 (3): 284–91.
20. Yuan X. L., Chen L., Li M-X. et al. Elevated expression of Foxp3 in tumor-infiltrating Treg cells suppresses T-cell proliferation and contributes to gastric cancer progression in a COX -2-dependent manner. *Clin Immunol* 2010; 134 (3): 277–88.
21. Peng L. S., Mao F. Y., Zhao Y. L. et al. Altered phenotypic and functional characteristics of CD3+ CD56+ NKT-like cells in human gastric cancer. *Oncotarget* 2016; 7 (34): 55222–30. DOI: 10.18632/oncotarget. 10484
22. Takeuchi H., Maehara Y., Tokunaga E. et al. Prognostic Significance of Natural Killer Cell Activity in Patients With Gastric Carcinoma: A Multivariate Analysis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96 (2): 574–8.