



DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.3.2020.199-207>
УДК: 616.33-006.6-089-085.277.3

Імуноскор і використання можливостей персоналізації хіміотерапевтичного лікування у хворих на рак шлунка

Кіркiлевський С. І.,¹ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2074-1936>, e-mail: info@unci.org.ua
Сулаєва О. М.,⁴ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9614-4652>, e-mail: oksana.sulaieva@gmail.com
Лук'янчук О. В.,³ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4605-9679>, e-mail: odessaonko@gmail.com
Лурін А. Г.,³ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0102-1834>, e-mail: odessaonko@gmail.com
Машуков А. О.,^{1,2,3} ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6925-4218>, e-mail: mashukster@gmail.com
Ткаченко О. І.,² ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7929-0220>, e-mail: doctortkachenko@i.ua
Згура О. М.,³ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3324-1690>, e-mail: odessaonko@gmail.com
Біленко О. А.,² ORCID ID: <https://orcid.org/Rt2-moH-TRG-GxX>, e-mail: bilenko1@gmail.com
Максимовський В. Є.,² ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5084-3290>, e-mail: ksidoc@gmail.com
Раціборський Д. В.,³ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6892-8505>, e-mail: racik@rambler.ru
Сирбу В. М.,³ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0412-9421>, e-mail: odessaonko@gmail.com

¹ Національний інститут раку Міністерства охорони здоров'я України, Київ, Україна

² Одеський національний медичний університет Міністерства охорони здоров'я України, Одеса, Україна

³ Комунальне неприбуткове підприємство «Одеський обласний онкологічний диспансер» Одеської обласної ради, Одеса, Україна

⁴ Медична лабораторія CSD, Київ, Україна

Immunoscore and personification of chemotherapeutic treatment in patients with gastric cancer

Kirkilevskiy S. I.,¹ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2074-1936>, e-mail: info@unci.org.ua
Sulaeva O. M.,⁴ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9614-4652>, e-mail: oksana.sulaieva@gmail.com
Lukyanchuk O. V.,³ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4605-9679>, e-mail: odessaonko@gmail.com
Lurin A.G.,³ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0102-1834>, e-mail: odessaonko@gmail.com
Mashukov A. O.,^{1,2,3} ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6925-4218>, e-mail: mashukster@gmail.com
Tkachenko O. I.,² ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7929-0220>, e-mail: doctortkachenko@i.ua
Zgura O.M.,³ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3324-1690>, e-mail: odessaonko@gmail.com
Bilenko O.A.,² ORCID ID: <https://orcid.org/Rt2-moH-TRG-GxX>, e-mail: bilenko1@gmail.com
Maksimovskiy V. E.,² ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5084-3290>, e-mail: ksidoc@gmail.com
Ratsiborskiy D. V.,³ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6892-8505>, e-mail: racik@rambler.ru
Syrbu V. N.,³ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0412-9421>, e-mail: odessaonko@gmail.com

¹ National Cancer Institute Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, Ukraine

² Odessa National Medical University Ministry of Health of Ukraine, Ukraine

³ Municipal Non-Profit Enterprise "Odesa Regional Oncological Center" of Odesa Regional Council, Odesa, Ukraine

⁴ Clinical Laboratory CSD, Kyiv, Ukraine

Ключові слова:

рак шлунка, онкобілки, імуногістохімічне дослідження, імуноскор.

Для цитування:

Кіркiлевський С. І., Сулаєва О. М., Лук'янчук О. В., Лурін А. Г., Машуков А. О., Ткаченко О. І., Згура О. М., Біленко О. А., Максимовський В. Є., Раціборський Д. В., Сирбу В. М. Імуноскор і використання можливостей персоналізації хіміотерапевтичного лікування у хворих на рак шлунка. *Український радіологічний та онкологічний журнал*. 2020. Т. XVIII. № 3. С. 199–207. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.3.2020.199-207>

РЕЗЮМЕ

Актуальність. У світі зареєстровано декілька показань для призначення імунотерапії інгібіторами імунних контрольних точок (ІТ ІКТ). Призначення ІТ ІКТ при раку шлунка (РШ) обумовлене наявністю експресії лігандів PD-L1 на пухлинних клітинах; високим мутаційним навантаженням у пухлині; наявністю мікросателітнонестабільної форми РШ MSI-h або поломкою механізму виправлення помилок системи неспарених основ ДНК – MMR; Т-кілер імуноскор, або скорочено IS.

Мета роботи – вивчити склад імуноклітинного фенотипу злякисних пухлин шлунка.

Для кореспонденції:

Машуков Артем Олексійович
пр-т Добровольського, буд. 75, кв. 4,
м. Одеса, Україна, 65069;
e-mail: mashukster@gmail.com

© Кіркільєвський С. І., Сулаєва О. М.,
Лук'янчук О. В., Лурін А. Г., Машу-
ков А. О., Ткаченко О. І., Згура О. М.,
Біленко О. А., Максимовський В. С.,
Раціборський Д. В., Сирбу В. М.,
2020

Матеріали та методи. У даній роботі представлено результати клінічного дослідження, проведеного на базі науково-дослідного відділення пухлин органів грудної порожнини Національного інституту раку та абдомінального онкохірургічного відділення КНП «Одеський обласний онкологічний диспансер» Одеської обласної ради у 221 хворого, прооперованого з приводу раку шлунка (РШ) у період 2007–2013 років. Середній вік $60,88 \pm 10,5$ року, чоловіків – 180, жінок – 41. Всього виконано 143 гастректомії і 78 дистальних субтотальних резекцій. Досліджувана група хворих для вивчення IS складалася з 22 хворих на РШ. На першому етапі визначена щільність імунокомпетентних клітин TILs або TIMs, де TILs передбачає кількісну оцінку лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, а TIMs – підрахунок кількості макрофагів, що інфільтрують пухлину. Другим етапом проведена оцінка вираженості інфільтрації імунними клітинами двох компартментів: центральних ділянок пухлини (СТ) та навколо краю інвазії пухлини (ІМ) – у перитуморозній стромі.

Результати та їх обговорення. Усі хворі, включені в дослідження, були радикально прооперовані. Вилучені під час операції пухлини досліджувались з використанням імуноскопу. Дуже висока кореляція відмічалась між наявністю у клітинах експресії PD-L1 і присутністю CD8 T-лімфоцитів у tumor nest – 0,81. Вплив імуноскопу на прогноз склав 0,64. Негативна висока кореляція визначалась між концентрацією M2 CD163 макрофагів у пухлині і наявністю метастазів у регіонарні лімфатичні вузли – 0,65. Дуже висока кореляція між концентрацією CD3 і CD8 у центральних зонах пухлини – 0,95. Дуже висока кореляція між наявністю у клітин експресії PD-L1 і наявністю CD3 клітин у tumor nest – 0,84. Дуже високою була кореляція між CD3 і CD8 у пухлинній стромі – 0,87.

Висновки. Вивчення IS необхідне як з точки зору впливу на виживаність хворих як фактора прогнозу, так і з перспективою більш активного призначення і використання імунотаргетних препаратів надалі.

Keywords:

gastric cancer, oncoproteins, immuno-histochemical study, immunoscore

For citation:

Kirkilevskiy S. I., Sulaeva O. M., Lukyanchuk O. V., Lurin A. G., Mashukov A. O., Tkachenko O. I., Zgura O. M., Bilenko O. A., Maksimovskiy V. E., Ratsiborskiy D. V., Syrbu V. N. Immunoscore and personification of chemotherapeutic treatment in patients with gastric cancer. *Ukrainian journal of radiology and oncology*. 2020;28(3): 199–207. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.3.2020.199-207>

For correspondence:

Mashukov Artem Oleksiiovich
75, apt. 4, Dobrovolsky Ave.,
Odessa, Ukraine, 65069
e-mail: mashukster@gmail.com

© Kirkilevskiy S. I., Sulaeva O. M.,
Lukyanchuk O. V., Lurin A. G.,
Mashukov A. O., Tkachenko O. I.,
Zgura O. M., Bilenko O. A.,
Maksimovskiy V. E., Ratsiborskiy D. V.,
Syrbu V. N., 2020

SUMMARY

Background. There are a few indications known in the world to administer immunotherapy (IT) via immune checkpoint inhibitors (ICIs). Prescribing IT by means of ICIs in gastric cancer (GC) results from PD-L1 ligand expression on tumor cells; high tumor mutation burden; GC with microsatellite instability MSI-h or DNA mismatch repair (MMR) failure; T-killer immunoscore (IS).

Purpose – to study the composition of the immunocellular phenotype of gastric malignancies.

Materials and methods. The paper presents the outcomes of a clinical study conducted at the premises of Thoracic Tumors Research Department of National Cancer Institute and Abdominal Oncosurgery Department of Municipal Non-Profit Enterprise “Odessa Regional Oncology Dispensary” of Odessa Regional Council enrolling 221 patients operated on for gastric cancer within the period from 2007 to 2013. The average age was 60.88 ± 10.5 , men – 180, women – 41. A total of 143 gastrectomies and 78 distal subtotal resections were performed. The study group of patients to investigate IS consisted of 22 patients with gastric cancer. At the first stage, the density of immunocompetent TILs or TIMs were determined, where TILs quantified tumor-infiltrating lymphocytes and TIMs counted the number of tumor-infiltrating macrophages. The second step was assessing the severity of infiltration by immune cells of two compartments: the central areas of the tumor (CT) and around the edge of the tumor invasion (IM), i. e. in the peritumoral stroma.

Results and discussion. All patients included in the study were radically operated on. The tumors removed during surgery were examined by means of immunoscore. A particularly high correlation was observed between PD-L1 expression in cells and CD8 T-lymphocytes in tumor nest – 0.81. Immunoscore effect on the prognosis was 0.64. A negative high correlation was assessed between the concentration of M2 CD163 macrophages in the tumor and the metastases to regional lymph nodes – 0.65. A particularly high correlation between the concentration of CD3 and CD8 in the central areas of the tumor reaching 0.95. A particularly high correlation between PD-L1 expression in cells and CD3 cells in tumor nest – 0.84. The correlation between CD3 and CD8 in the tumor stroma was particularly high, 0.87.

Conclusions. The study of immunoscore is essential both in terms of the impact on patient survival, as a prognostic factor, and with a view to more active administering and using immune-targeted drugs in the future.

Рукопис надійшов
Manuscript was received
18.05.2020

Отримано після рецензування
Received after review
24.06.2020

Прийнято до друку
Accepted for printing
09.09.2020

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Робота виконана в рамках планової науково-дослідної роботи науково-дослідного відділення пухлин органів грудної порожнини Національного інституту раку Міністерства охорони здоров'я України «Нові підходи та методи лікування хворих на злоякісні пухлини органів грудної порожнини» (державний реєстраційний номер 0118U003728).

ВСТУП

У світі зареєстровано декілька показань для призначення імунотерапії інгібіторами імунних контрольних точок (ІТ ІКТ). Призначення ІТ ІКТ при РШ зумовлене наявністю експресії лігандів PD-L1 на пухлинних клітинах, високим мутаційним навантаженням у пухлині (ТМВ – tumor mutation burden, більш ніж 6–10 на 10^9 нуклеотидних основ у пухлинній ДНК); наявністю мікросателітнонестабільної форми РШ MSI-h або поломкою механізму виправлення помилок системи неспарених основ ДНК – MMR (що відразу значно розширило кількість локалізацій раку, при яких терапія ефективна, більш ніж 30); імуноскор, або скорочено IS. Тобто, чим більш вираженою є лімфоцитарна інфільтрація пухлини, тим ефективність терапії вища. Зроблені попередні висновки про те, що вивчення IS необхідне як з точки зору впливу на виживаність хворих як фактора прогнозу, так і з перспективою більш активного призначення і використання імунотаргетних препаратів (ІТ ІКТ) надалі.

Мета роботи – вивчити склад імуноклітинного фенотипу злоякісних пухлин шлунка.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У даній роботі представлено результати клінічного дослідження, проведеного на базі науково-дослідного відділення пухлин органів грудної порожнини Національного інституту раку та абдомінального онкохірургічного відділення Комунального неприбуткового підприємства «Одеський обласний онкологічний

Connection with research programs, plans and projects

The study has been carried out in the scope of the planned research project at Thoracic Tumors Research Department of National Cancer Institute, National Academy of Medical Sciences of Ukraine “New Approaches and Methods of Treating Patients with Thoracic Viscera Malignancy” (State registration: No 0118U003728).

INTRODUCTION

There are a few indications known in the world to administer immunotherapy (IT) via immune checkpoint inhibitors (ICIs). Prescribing IT by means of ICIs in gastric cancer (GC) results from PD-L1 ligand expression on tumor cells, high tumor mutation burden (TMB – tumor mutation burden, more than 6–10 on 10^9 nucleotide bases in tumor DNA); GC with microsatellite instability MSI-h or DNA mismatch repair (MMR) failure (significantly increased the amount of tumor locations, where therapy is effective, more than 30); immunoscore (IS). Thus, the more evident the tumor lymphocyte infiltration is, the higher the therapy effectiveness is. The preliminary conclusions emphasize the necessity of studying IS in terms of the impact on patient survival rate, as a prognostic factor, and with a view to more active administering and using immune-targeted agents (IT ICIs) in the future.

Purpose – to study the composition of the immunocellular phenotype of gastric malignancies.

MATERIALS AND METHODS

The paper presents the outcomes of a clinical study conducted at the premises of Thoracic Tumors Research Department of National Cancer Institute and Abdominal Oncosurgery Department of Municipal Non-Profit Enterprise “Odessa Regional Oncology Dispensary” of Odessa Regional Council enrolling 221 patients operated on for

диспансер» Одеської обласної ради у 221 хворого, прооперованого з приводу раку шлунка (РШ) у період 2007–2013 років. Середній вік $60,88 \pm 10,5$ року, чоловіків – 180, жінок – 41. Всього виконано 143 гастректомії і 78 дистальних субтотальних резекцій. Досліджувана група хворих для вивчення ІС складалася з 22 хворих на РШ.

На сьогодні існує кілька підходів щодо оцінки імунного статусу пухлин. Проте вони базуються на двох ключових принципах:

1) Визначення щільності імунокомпетентних клітин (TILs або TIMs, де TILs передбачає кількісну оцінку лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, а TIMs – підрахунок кількості макрофагів, що інфільтрують пухлину [1].

2) Оцінку вираженості інфільтрації імунними клітинами двох компартментів: центральних ділянок пухлини (CT) та навколо краю інвазії пухлини (IM) – у перитуморозній стромі.

При цьому різні дослідники використовують різні маркери та системи інтерпретації [3]. У межах даної роботи було проведено оцінку кількості Т-лімфоцитів (CD3), серед них прицільно Т-цитотоксичних лімфоцитів (CD8), а також пухлиноасоційованих макрофагів, що відповідають M1 (CD68) та M2 підтипам (CD163). Крім того, для оцінки ефекторних клітин гуморального імунітету було проведено оцінку кількості та розподілу плазматичних клітин (CD138).

У дослідженні використовували імуногістохімічне забарвлення РШ із МАТ до CD3. У тому випадку, якщо Т-лімфоцити дифузно інфільтрували мікросередовище пухлини шлунка [2] та формували локальні «зоряні» скупчення, імуноскор вважали рівним 2; якщо невеликі локальні «сузір'я» без фолікулярних третинних TLSs структур, ІС вважали рівним 1; поодинокі «зірки» – рівним 1 (рис. 1).

gastric cancer within the period from 2007 to 2013. The average age was 60.88 ± 10.5 , men – 180, women – 41. A total of 143 gastrectomies and 78 distal subtotal resections were performed. The study group of patients to investigate IS consisted of 22 patients with gastric cancer.

At present, there are several approaches to assess the tumor immune status. However, they stem from the two core principles:

1) Determining the density of immunocompetent cells (TILs or TIMs, where TILs require quantitative evaluation of the lymphocytes infiltrating the tumor and TIMs require counting the macrophages infiltrating the tumor [1].

2) Assessing the severity of infiltration by immune cells of two compartments: the central areas of the tumor (CT) and around the edge of the tumor invasion (IM) – in the peritumoral stroma.

In this regard, different scientists use different markers and interpretation systems [3]. Within the scope of the study, the amount of T-lymphocytes (CD3) was assessed, including targeted T-cytotoxic lymphocytes (CD8), as well as tumor-associated macrophages corresponding to M1 (CD68) and M2 subtypes (CD163). In addition, in order to make an assessment of humoral immunity effector cells, the amount and distribution of plasma cells (CD138) was evaluated.

The immunohistochemical staining of GC from mAb to CD3 was applied in the study. If T-lymphocytes diffusely infiltrated the microenvironment of the gastric tumor [2] and formed local “star-like” clusters, immunoscore was considered to equal 2; if small local “star clusters” were without follicular tertiary TLSs structures, IS was considered to equal 1; single “stars” equaled 1 (Fig. 1).

IS, CD3/CD8 ratio of T-lymphocytes were determined as well as the cells in several tumor areas were

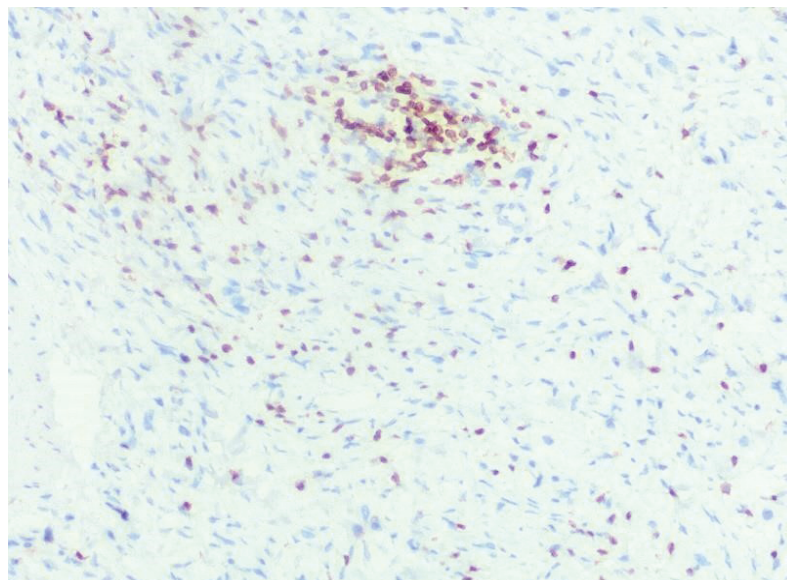


Рис. 1. Т-лімфоцити дифузно інфільтрують інтратуморозний компартмент дискогезивної карциноми та формують невеликі локальні скупчення. Імуногістохімічне дослідження з використанням МАТ до CD3. Збільшення $\times 200$

Fig. 1. T-lymphocytes are diffusely infiltrating the intratumorous compartment of discohesive carcinoma and forming small local clusters. The immunohistochemical study applying mAb to CD3. Magnification $\times 200$

Визначався IS, співвідношення CD3/CD8 Т-лімфоцитів, а також проводився підрахунок клітин у декількох зонах пухлини: TN – всередині пухлини (tumor nest), TS – у перипухлинній стромі (TS), у частині випадків також у ТМ-інвазивному краї пухлини (tumor invasive margin). Імуноскор IS=2 у даному випадку обумовлений наявністю фолікулоподібних, так званих «третинних» лімфатичних структур (TLSs – tertiary lymphatic structures).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ретроспективна група дослідження IS складалася з 22 хворих на РШ. Під час виконання IS отримані такі результати. Середня концентрація CD3 клітин у пухлинній стромі РШ 321 ± 149 (інтервал 30–450, мода 425, медіана 210) Т-лімфоцит на 1 мм^2 ; CD3 клітин у центральних ділянках пухлини на 1 мм^2 201 ± 165 одиницю (інтервал 0–1210, мода 0, медіана 148); CD8 Т-лімфоцитів у пухлинній стромі 144 ± 114 клітин на 1 мм^2 (інтервал 15–350, мода 282, медіана 100); CD8 клітин у центральних ділянках РШ – 116 ± 234 (інтервал 0–1000, мода 5, медіана 49) Т-лімфоцитів на 1 мм^2 ; CD68 M1 пухлинних макрофагів – 254 ± 132 клітини у пухлинній стромі на 1 мм^2 (інтервал 58–439, мода 400, медіана 215); CD68 макрофагів у центральних ділянках пухлини 280 ± 157 (інтервал 0–510, мода 214, медіана 330) клітин на 1 мм^2 ; CD163 M2 макрофагів у стромі 138 ± 83 клітини на 1 мм^2 (28–300, мода 152, медіана 150); CD163 M2 макрофагів у центральних ділянках пухлини – 142 ± 127 (інтервал 0–380, мода 80, медіана 80) одиниці на 1 мм^2 . Середнє значення IS виявилось на рівні 0,88 (інтервал 0–2, мода 0, медіана 1), співвідношення CD3/CD8 Т-лімфоцитів, що відображає напруженість імунної відповіді організму на пухлину, склала 2,06 (інтервал 1,12–5,62, мода 1,2, медіана 1,65).

У частини хворих ($n = 9$) концентрація специфічних імунних клітин була настільки високою, що вони формували так звані «третинні» лімфатичні фолікули у вигляді лімфатичних вузликів дуже невеликого розміру (до 1 мм), які звичайний клінічний морфолог часто знаходить під час консультації гістологічних препаратів навіть при відсутності специфічних ІГХ забарвлень. Наявність подібних великих скупчень виявлено у 3 хворих (13,64 %), більш дрібних – ще у 6 (27,27 %). Найчастіше такі інфільтрати формувалися за участю M1 клітин, найбільш великий – з комбінацією CD3 і CD8 Т-лімфоцитів. Третинні лімфатичні фолікули знаходили в зоні tumor nest – TN, але виявлялися вони і в пухлинній стромі (tumor stroma, TS). Пухлинна біологія впливала на ступінь агресивної інфільтрації тканини РШ [4].

Найбільш значні математичні кореляції між рядами множин спостерігалися в таких показниках. Дуже висока кореляція відмічалась між наявністю у клітинах експресії PD-L1 і присутністю CD8 Т-лімфоцитів у tumor nest – 0,81. Вплив імуноскуру IS на прогноз склав 0,64. Негативна висока кореляція визначалася між концентрацією M2 CD163 макрофагів у пухлині і наявністю метастазів у регіонарні лімфатичні вузли – 0,65. Дуже висока кореляція між

counted: TN inside the tumor (tumor nest), TS in peritumoral stroma (TS), in some cases also in tumor invasive margin. Immunoscore IS=2 in this case resulted from occurring follicle-like, so-called tertiary lymphatic structures (TLSs – tertiary lymphatic structures).

RESULTS AND DISCUSSION

The retrospective group enrolled into IS studying was represented by 22 GC patients. The following outcomes were obtained while applying IS. The average concentration of CD3 cells in the tumor stroma of GC was 321 ± 149 (interval 30–450, mode 425, median 210) T-lymphocyte per 1 mm^2 ; CD3 cells in central areas of the tumor was 201 ± 165 un per 1 mm^2 (interval 0–1210, mode 0, median 148); CD8 T-lymphocytes in the tumor stroma was 144 ± 114 cells per 1 mm^2 (interval 15–350, mode 282, median 100); CD8 cells in the GC central areas – 116 ± 234 (interval 0–1000, mode 5, median 49) T-lymphocytes per 1 mm^2 ; CD68 M1 tumor macrophages – 254 ± 132 cells in the tumor stroma per 1 mm^2 (interval 58–439, mode 400, median 215); CD68 macrophages in the tumor central areas – 280 ± 157 (interval 0–510, mode 214, median 330) cells per 1 mm^2 ; CD163 M2 macrophages in the stroma – 138 ± 83 cells per 1 mm^2 (28–300, mode 152, median 150); CD163 M2 macrophages in the tumor central areas – 142 ± 127 (interval 0–380, mode 80, median 80) units per 1 mm^2 . The average IS value was at level 0.88 (interval 0–2, mode 0, median 1), CD3/CD8 T-lymphocytes ratio, reflecting the stress of immune response to the tumor, was 2.06 (interval 1.12–5.62, mode 1.2, median 1.65).

In some patients ($n = 9$), the concentration of specific immune cells was so high that they formed so-called tertiary lymph follicles in the form of lymph nodes of very small size (up to 1 mm), which a usual clinical morphologist often finds when consulting tissue specimen even if specific immunohistochemical staining is absent. The occurrence of such large clusters was revealed in 3 patients (13.64 %), smaller ones – in 6 patients (27.27 %). Most frequently, the infiltrates like those were forming involving M1 cells, the largest one – by means of CD3 and CD8 T-lymphocytes combination. The tertiary lymphatic follicles were found in the tumor nest area – TN, at the same time they were also found in the tumor stroma (tumor stroma, TS). Tumor biology influenced the degree of aggressive infiltration of the GC tissue [4].

The most significant mathematical correlations between values were observed in the following measures. A very high correlation was observed between PD-L1 expression in the cells and CD8 T-lymphocytes in the tumor nest, that was 0.81. The impact of IS immunoscore on the prognosis was 0.64. A negative high correlation was determined between the concentration of M2 CD163 macrophages in the tumor and the metastases to regional lymph nodes, 0.65. A particularly high correlation between the concentration of CD3 and CD8 in the central areas of the tumor, 0.95, was observed. There was a particularly high correlation between PD-L1 expression in

концентрацією CD3 і CD8 у центральних зонах пухлини – 0,95. Дуже висока кореляція між наявністю у клітин експресії PD-L1 і наявністю CD3 клітин у tumor nest – 0,84. Дуже високою була кореляція між CD3 і CD8 у пухлинній стромі – 0,87.

Додатково відзначено негативний вплив на прогноз хворого на РШ наявності у центральних зонах пухлини CD163 M2 макрофагів і виявлення периневральної і перивазальної інвазії; у деяких випадках спостерігалось поширення CD68 за перивазальними і периневральними щільностями далеко від периферичних ділянок пухлини в зону її стромі. Пухлини з агресивними формами гістологічної будови (sig, muc) при РШ найчастіше інфільтровані M1 і M2 макрофагами і менш активно інфільтровані Т-лімфоцитами; форми РШ з менш агресивною гістологією (pap, tub) мали більш виражену Т-лімфоцитарну інфільтрацію і відносний дефіцит протипухлинних макрофагів.

Таким чином, більш агресивні форми РШ є низькодиференційованими, отже, в них збільшується кількість клітин в апоптозі: відбувається фрагментація клітин на частки, на відміну від некрозу, коли клітина дифузно набухає. Ці дрібні частки прибираються фагоцитозом, отже, збільшується кількість макрофагів в осередку пухлини і апоптоз у пухлині може стимулювати розмноження злоякісних клітин та пригнічує їх диференціювання.

Отже, навіть не IS був маркером прогнозу, а кількість макрофагів як додатковий показник апоптозу. При збільшенні кількості Т-лімфоцитів пембролізумабом зменшується рівень апоптозу і макрофагів, стимулюється диференціювання пухлини і пухлина переводиться із низькодиференційованої в більш диференційовану форму, що покращує прогноз і виживаність. Але при дрібноклітинному недиференційованому РШ пригнічується і фагоцитоз, що вже не стримує агресивний ріст пухлини і має найгірший прогноз (при найвищому рівні апоптозу). Тому інфільтрація макрофагами корелює з більш сприятливим прогнозом: фагоцитоз стримує рівень апоптозу при агресивних формах РШ. Отже, кількість макрофагів вказує лише на присутність апоптозу, а не на його рівень, вказує на рівень фагоцитозу, як це показано у таблиці 1.

cells and CD3 cells in tumor nest, 0.84. The correlation between CD3 and CD8 in the tumor stroma was particularly high, 0.87.

Additionally, there was a negative effect on the prognosis of GC patients resulting from CD163 M2 macrophages in the tumor central areas and detecting perineural and perivascular invasion; some cases showed spreading CD68 in the perivascular and perineural spaces away from the peripheral areas of the tumor to its stroma. Tumors with aggressive forms of histological structure (sig, muc) in GC are most often infiltrated by M1 and M2 macrophages and less actively infiltrated by T-lymphocytes; GC forms with less aggressive histology (pap, tub) had more pronounced T-lymphocytic infiltration and relative deficiency of antitumor macrophages.

Thus, more aggressive forms of GC are low differentiated; it means they increase the amount of cells in apoptosis: there is fragmentation of cells into particles, in contrast to necrosis, when a cell diffusely swells. These small particles are removed by phagocytosis, consequently, the number of macrophages in the tumor center increases and apoptosis in the tumor can stimulate generation of malignant cells and inhibit their differentiation.

From this perspective, even IS was not a prognostic marker, but the amount of macrophages as an additional apoptosis indicator was. Along with increasing T-lymphocyte amount by pembrolizumab, the apoptosis and macrophages level is decreased, tumor differentiation is stimulated and the tumor changes from being low differentiated to more differentiated, and this factor improves the prognosis and the survival rate. However, in case of small cell undifferentiated GC, phagocytosis is also suppressed; it results in inability to inhibit aggressive growth of the tumor and in the worst prognosis (in the highest level of apoptosis). For that reason, the infiltration by macrophages correlates with a more favorable prognosis: phagocytosis suppresses apoptosis level in aggressive GC forms. Thus, the amount of macrophages indicates only the presence of apoptosis, not its level, as well as it indicates the phagocytosis level the way it is shown in Table 1.

In case of mildly aggressive G1–G2 tumors of the stomach, the prognosis is possible due to assessing T-killers level, since they “kill” malignant cells. Should we

Таблиця 1. Імунна неоднорідність РШ

Table 1. Immune Heterogeneity of GC

Ступінь диференціювання Differentiation degree	Рівень апоптозу Apoptosis level	Фагоцитоз Phagocytosis	Т-кілери, Імуноскоп T-killers, Immunoscore	Підрахунок прогнозу Prognosis estimation
Малоагресивні G ₁ , G ₂ Mildly aggressive G ₁ , G ₂	*	*	***	За Т-кілерами According to T-killers
		**	**	
Агресивні G ₃ , G ₄ Aggressive G ₃ , G ₄	**	**	**	За макрофагами According to macrophages
		***	*	

У випадку відносно малоагресивних G1–G2 пухлин шлунка прогнозування перебігу захворювання можливе за рахунок вивчення рівня Т-кілерів, тому що вони «вбивають» злоякісні клітини. У випадку G3–G4 РШ – за макрофагами, тому що сильніше стимулюють апоптоз і розмноження клітин.

deal with G3–G4 GC, the macrophages are assessed, as they better stimulate apoptosis and cell generation.

ВИСНОВКИ

1. Наявність високих концентрацій як CD3, так і CD8 позитивних Т-лімфоцитів у tumor nest, як правило, означала спостереження експресії PD-L1 у макрофагах, Т-лімфоцитах і пухлинних клітинах РШ.

2. Присутність високої концентрації CD3 Т-лімфоцитів, які здійснювали «впізнавання» РШ імунною системою, корелювала з великим рівнем CD8 Т-цитотоксичних лімфоцитів у тих самих зонах у відповідь.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ REFERENCES

1. Sebastian R., Nielsen and Michael C. Schmid. Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. *Mediators of Inflammation*. 2017. Review Article. Open Access. Vol. 2017. 11 p. Article ID 9624760. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/9624760>
2. Jiang W., Liu K., Guo Q et al. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. (Published 2017 May 3). 2017. Vol 8, № 37. P. 62312–62329. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17602>.
3. Jonathan A. D., Simpson Ahmad Al-Attar, Nicholas F. S. Watson J. H. Scholefield M. I., Lindy G. D. Intratumoral T Cell Infiltration, MHC Class I and STAT1 as Biomarkers of Good Prognosis in Colorectal Cancer. *Gut*. 2010. Vol. 59, № 7. P. 926–933. DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.2009.194472>.
4. Zhang T., Su D., Mao Z., Guo X., Wang L., Bai L. Prognostic role of neuroendocrine cell differentiation in human gastric carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Med.* (Published 2015 May 15). 2015. Vol. 8, № 5. P. 7837–7842.

CONCLUSIONS

1. High concentrations of both CD3 and CD8 positive T-lymphocytes in tumor nest usually meant observing PD-L1 expression in macrophages, T-lymphocytes and GC tumor cells.

2. High concentration of CD3 T-lymphocytes, that “recognized” GC by the immune system, correlated with a high level of CD8 T-cytotoxic lymphocytes in the same areas in response.

5. Sebastian R., Nielsen R. Nielsen and Michael C. Schmid. Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. *Mediators of Inflammation*. 2017. Review Article. Open Access. 2017;11. Article ID 9624760. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/9624760>.
6. Jiang W, Liu K, Guo Q et al. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. (Published 2017 May 3). 2017;8(37):62312–29. (In English). DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17602>.
7. Jonathan AD, Simpson Ahmad Al-Attar, Nicholas FS, Watson JH, Scholefield MI, Lindy GD. Intratumoral T Cell Infiltration, MHC Class I and STAT1 as Biomarkers of Good Prognosis in Colorectal Cancer. *Gut*. 2010;59(7)926–33. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.2009.194472>.
8. Zhang T, Su D, Mao Z, Guo X, Wang L, Bai L. Prognostic role of neuroendocrine cell differentiation in human gastric carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Med.* (Published 2015 May 15). 2015;8(5):7837–42. (In English).

Перспективи подальших досліджень

Необхідно збільшувати кількість Т-кілерів, які зменшують стимулювання апоптозом розмноження злоякісних клітин і «добивають» їх. Тобто пембролізумаб може бути показаний для більш широкого застосування – в обох випадках (усі РШ, незалежно від агресивності). Мета – збільшити лімфоцитарну інфільтрацію: чим вона більша, тим ефективність терапії вища. Вивчення IS необхідне як з точки зору впливу на виживаність хворих як фактора прогнозу, так і з перспективою більш активного призначення і використання імунотаргетних препаратів (ІТ ІКТ) надалі.

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Інформація про фінансування

Робота фінансується видатками Державного бюджету України.

Prospects for further research

It is essential that the amount of T-killers, which reduce stimulation of malignant cell generation by means of apoptosis and “kill” them, is increased. Thus, pembrolizumab can be indicated for a wider use in both cases (all GC forms independently of aggression level). The purpose is to increase lymphocytic infiltration: the higher it is, the higher the effectiveness of therapy is. Studying IS is necessary from the perspective of impact on patient survival, as a prognostic factor as well as it is a prospect for more active indicating and applying immune-targeted agents (IT ICIs) in the future.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

Funding

Financed by the state budget of Ukraine.

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

Кіркiлевський Станіслав Ігорович – доктор медичних наук, професор, завідувач науково-дослідного відділення пухлин грудної порожнини Національного інституту раку Міністерства охорони здоров'я України; вул. Ломоносова, буд. 33, кв. 43, м. Київ, Україна, 03022;

e-mail: info@unci.org.ua
тел.: +38(044) 257-93-15.

Внесок автора: загальне керівництво проведенням досліджень.

Сулаєва Оксана Миколаївна – доктор медичних наук, професор, Медична лабораторія CSD; вул. Васильківська, буд. 45, м. Київ, Україна, 03022;

e-mail: oksana.sulaieva@gmail.com
тел.: +38(0800) 33-00-75.

Внесок автора: розробка концепції дослідження.

Лук'янчук Олег Валерійович – кандидат медичних наук, доцент, головний лікар Комунального неприбуткового підприємства «Одеський обласний онкологічний диспансер» Одеської обласної ради; вул. Нежданової, буд. 32а, м. Одеса, Україна, 65055;

e-mail: odessaonko@gmail.com
тел.: +38(048) 720-26-72.

Внесок автора: розробка дизайну дослідження.

Лурін Анатолій Григорович – член-кореспондент Національної академії технологічних наук України, заслужений лікар України, заступник головного лікаря Комунального неприбуткового підприємства «Одеський обласний онкологічний диспансер» Одеської обласної ради; вул. Нежданової, буд. 32а, м. Одеса, Україна, 65055;

e-mail: odessaonko@gmail.com
моб.: +38(050) 502-43-48.

Внесок автора: загальне керівництво проведенням дослідження.

Машуков Артем Олексійович – доктор медичних наук, доцент кафедри променевої діагностики, терапії та онкології Одеського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України, лікар вищої категорії, ординатор абдомінального відділення Комунального неприбуткового підприємства «Одеський обласний онкологічний диспансер» Одеської обласної ради; пр-т Добровольського, буд. 75, кв. 4, м. Одеса, Україна, 65069;

e-mail: mashukster@gmail.com
моб.: +38(068) 256-06-96.

Внесок автора: написання тексту статті, статистичне опрацювання отриманих даних.

Ткаченко Олександр Іванович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри хірургії № 4 Одеського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; вул. Тініста, буд. 8, м. Одеса, Україна, 65055;

INFORMATION ON THE AUTHORS

Kirkilevsky Stanislav Igorovich – Doctor of Science (Medicine), Professor, Head of Thoracic Tumors Research Department of National Cancer Institute, Ministry of Health of Ukraine; 33/43, Lomonosova Str., Kyiv, Ukraine, 03022;

e-mail: info@unci.org.ua
tel.: +38(044) 257-93-15.

Author contributions: general management of the study.

Sulaeva Oksana Nikolaevna – Doctor of Science (Medicine), Professor, CSD Medical Laboratory; 45, Vasylkivska Str., Kyiv, Ukraine, 03022;

e-mail: oksana.sulaieva@gmail.com
tel.: +38(0800) 330075.

Author contributions: study concept development.

Lukyanchuk Oleh Valeriiovych – PhD (Medicine), Associate Professor, Chief Physician of Non-Profit Enterprise “Odessa Regional Oncology Dispensary” of Odessa Regional Council;

32a, Nezhdanova Str., Odessa, Ukraine, 65055;

e-mail: odessaonko@gmail.com
tel.: +38(048) 720-26-72.

Author contributions: study design development.

Lurin Anatoliy Hryhorovych – Corresponding Member of NATNU, MD, Deputy Chief Physician of Non-Profit Enterprise “Odessa Regional Oncology Dispensary” of Odessa Regional Council, Honored Doctor of Ukraine;

32a, Nezhdanova Str., Odessa, Ukraine, 65055;

e-mail: odessaonko@gmail.com
tel.: +38(050) 502-43-48.

Author contributions: general management of the study.

Mashukov Artem Oleksiyovych – Doctor of Science (Medicine), Associate Professor of Diagnostic Radiology, Therapy and Oncology Department of Odessa National Medical University of Ministry of Health of Ukraine, M. D. Board certified, Surgeon of the Abdominal Department of Non-Profit Enterprise “Odessa Regional Oncology Dispensary” of Odessa Regional Council; 75, apt. 4, Dobrovolsky Ave., Odessa, Ukraine, 65069;

e-mail: mashukster@gmail.com
tel.: +38(068) 256-06-96.

Author contributions: writing the article, statistical processing the obtained data.

Tkachenko Alexander Ivanovich – Doctor of Science (Medicine), Professor, MD, Head of Surgery Department No 4 of Odessa National Medical University of Ministry of Health of Ukraine; 8, Tenysta Str., Odessa, Ukraine, 65055;

e-mail: doctortkachenko@i.ua
тел.: +38(048) 737-37-70.

Внесок автора: підбір літературних джерел, написання тексту статті.

Згура Олександр Миколайович – лікар вищої категорії, заслужений лікар України, завідувач абдоминального відділення Комунального неприбуткового підприємства «Одеський обласний онкологічний диспансер» Одеської обласної ради; вул. Нежданової, буд. 32а, Одеса, Україна, 65055;
e-mail: odessaonko@gmail.com
моб.: +38(067) 976-50-41.

Внесок автора: підбір пацієнтів за темою роботи, написання тексту статті.

Біленко Олександр Анатолійович – кандидат медичних наук, доцент кафедри променевої діагностики, терапії та онкології Одеського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; вул. Івана Франка, буд. 51, кв. 124, м. Одеса, Україна, 65049;
e-mail: bilenko1@gmail.com
моб.: +38(066) 789-48-71.

Внесок автора: статистичне опрацювання отриманих даних, написання тексту статті.

Максимовський В'ячеслав Євгенович – кандидат медичних наук, асистент кафедри хірургії № 3 Одеського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України, лікар вищої категорії; вул. Тініста, буд. 8, м. Одеса, Україна, 65049;
e-mail: maksidoc@gmail.com
моб.: +38(050) 392-14-84.

Внесок автора: підбір літературних джерел, написання тексту статті.

Раціборський Дмитро Вікторович – лікар вищої категорії, ординатор абдоминального відділення Комунального неприбуткового підприємства «Одеський обласний онкологічний диспансер» Одеської обласної ради; вул. Романтиків, буд. 25/3, кв. 12, м. Одеса, Україна, 65030;
e-mail: racik@rambler.ru
моб.: +38(068) 192-51-45.

Внесок автора: обстеження та лікування хворих, написання тексту статті.

Сирбу Вадим Миколайович – лікар вищої категорії, ординатор поліклінічного відділення Комунального неприбуткового підприємства «Одеський обласний онкологічний диспансер» Одеської обласної ради; вул. Ядова, буд. 16а, кв. 49, м. Одеса, Україна, 68322;
e-mail: odessaonko@gmail.com
моб.: +38(096) 644-84-65.

Внесок автора: обстеження та лікування хворих, написання тексту статті.

e-mail: doctortkachenko@i.ua
тел.: +38(048) 737-37-70.

Author contributions: literature sourcing, writing the article.

Zgura Oleksandr Mykolayovych – M. D. Board certified, Honored Doctor of Ukraine, Head of Abdominal Department of Non-Profit Enterprise “Odessa Regional Oncology Dispensary” of Odessa Regional Council; 32a, Nezhdanova Str., Odessa, Ukraine, 65055;
e-mail: odessaonko@gmail.com
tel.: +38(067) 976-50-41.

Author contributions: selecting patients in the scope of the study issue, writing the article.

Bilenko Oleksandr Anatoliyovych – PhD (Medicine), Associate Professor of Department of Diagnostic Radiology, Therapy and Oncology of Odessa National Medical University of Ministry of Health of Ukraine; 51, apt. 124, Ivana Franka Str., Odessa, Ukraine, 65049;
e-mail: bilenko1@gmail.com
tel.: +38(066) 789-48-71.

Author contributions: statistical processing the obtained data, writing the article.

Maksymovsky Vyacheslav Yevhenovych – PhD (Medicine), Candidate of Medical Science, Assistant of Surgery Department No 3 of Odessa National Medical University of Ministry of Health of Ukraine, M. D. Board certified; 8, Tenysta Str., Odessa, Ukraine, 65049;
e-mail: maksidoc@gmail.com
tel.: +38(050) 392-14-84.

Author contributions: literature sourcing, writing the article.

Ratsiborskyi Dmytro Viktorovych – M. D. Board certified, Surgeon of Abdominal Department of Non-Profit Enterprise “Odessa Regional Oncology Dispensary” of Odessa Regional Council; 25/3, apt. 12, Romantics St. Odessa, Ukraine, 65030;
e-mail: racik@rambler.ru
tel.: +38(068) 192-51-45.

Author contributions: examination and treatment of patients, writing the article.

Sirbu Vadym Mykolayovych – M.D. Board certified, Surgeon of Outpatient Department of Non-Profit Enterprise “Odessa Regional Oncology Dispensary” of Odessa Regional Council; 16a, apt. 49, Yadova Str. Odessa, Ukraine, 68322;
e-mail: odessaonko@gmail.com
tel.: +38(096) 644-84-65.

Author contributions: examination and treatment of patients, writing the article.