

Для цитирования: Данилова Н.В., Хомяков В.М., Чайка А.В., Михайлов И.А., Олейникова Н.А., Мальков П.Г. Характеристики иммунного микроокружения нормальной слизистой оболочки перитуморальной области – дополнительный независимый прогностический фактор при раке желудка. Сибирский онкологический журнал. 2021; 20(1): 74–86. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-1-74-86

For citation: Danilova N.V., Kkomtyakov V.M., Chayka A.V., Mikhailov I.A., Oleynikova N.A., Malkov P.G. Characteristics of the immune microenvironment of the normal mucous membrane of the peritumoral area is an additional independent prognostic factor in gastric cancer. Siberian Journal of Oncology. 2021; 20(1): 74–86. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-1-74-86

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ИММУННОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ НОРМАЛЬНОЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПЕРИТУМОРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ – ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ НЕЗАВИСИМЫЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Н.В. Данилова<sup>1</sup>, В.М. Хомяков<sup>2</sup>, А.В. Чайка<sup>2</sup>, И.А. Михайлов<sup>1</sup>,  
Н.А. Олейникова<sup>1</sup>, П.Г. Мальков<sup>1</sup>

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», г. Москва, Россия<sup>1</sup>  
Россия, 119192, г. Москва, Ломоносовский проспект, 27/10. E-mail: imihailov@mc.msu.ru<sup>1</sup>  
Московский научно-исследовательский онкологический институт (МНИОИ)  
им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр радиологии» Минздрава России, г. Москва, Россия<sup>2</sup>  
Россия, 125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр., 3<sup>2</sup>

### Аннотация

**Цель исследования** – оценка прогностического значения иммунного микроокружения рака желудка и морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области с применением системы автоматического морфометрического анализа на примере CD8+ клеток. **Материал и методы.** Использованы образцы операционного материала от 130 пациентов с верифицированным диагнозом рака желудка. После проведения иммуногистохимического окрашивания с антителами к CD8 была проведена морфологическая оценка по оригинальной методике: подсчет средней площади CD8+ клеток в трех полях зрения при  $\times 20$ , измеренной с помощью автоматической системы морфометрического анализа LAS X, в центральной части опухоли и участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области, непосредственно прилежащей к опухолевой ткани. Результаты сопоставлены с основными клинико-морфологическими характеристиками опухолевого процесса и с общей пятилетней выживаемостью пациентов. **Результаты и обсуждение.** Высокая плотность инфильтрации CD8+ клетками в участках нормальной слизистой оболочки перитуморальной области наблюдалась в группах T4a и T4b по глубине инвазии ( $n=96$ ,  $p=0,0089$ ); была ассоциирована с наличием эмболов в лимфатических сосудах ( $n=96$ ,  $p=0,0102$ ) и с более продвинутой стадией рака желудка ( $n=96$ ,  $p=0,0107$ ). Исследованные случаи были разделены на две группы: до 3300 кв.мкм (лучшая выживаемость пациентов –  $n=79$ ,  $p=0,01$ ) и от 3300 кв.мкм и более по средней площади CD8+ клеток в участках нормальной слизистой оболочки перитуморальной области. При проведении многофакторного анализа выживаемости с использованием регрессионной модели Кокса установлено, что средняя площадь CD8+ клеток в нормальной слизистой оболочке перитуморальной области является значимым отрицательным прогностическим фактором (RR=1,537; CI: 1,102–3,105;  $p<0,01$ ), сопоставимым по степени ковариации со стадией опухолевого процесса. Аналогичный показатель, измеренный в центральной части опухоли, не был значимо ассоциирован с выживаемостью пациентов (RR=0,803; CI: 0,574–1,122;  $p>0,05$ ). **Заключение.** Впервые продемонстрирована возможность использования системы автоматического анализа для оценки иммунного микроокружения при раке желудка и установлено, что высокий уровень инфильтрации CD8+ лимфоцитами морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области является независимым неблагоприятным прогностическим фактором, в связи с чем рекомендуем обязательный забор биопсийного материала из слизистой оболочки перитуморальной области на предоперационном этапе для морфометрической оценки инфильтрации CD8+ лимфоцитами.

**Ключевые слова:** рак желудка, иммунное микроокружение, морфометрический анализ, иммуногистохимия, CD8-позитивные Т-лимфоциты, анализ выживаемости, прогностические факторы.

# CHARACTERISTICS OF THE IMMUNE MICROENVIRONMENT OF THE NORMAL MUCOUS MEMBRANE OF THE PERITUMORAL AREA IS AN ADDITIONAL INDEPENDENT PROGNOSTIC FACTOR IN GASTRIC CANCER

N.V. Danilova<sup>1</sup>, V.M. Kkomyakov<sup>2</sup>, A.V. Chayka<sup>2</sup>, I.A. Mikhailov<sup>1</sup>,  
N.A. Oleynikova<sup>1</sup>, P.G. Malkov<sup>1</sup>

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia<sup>1</sup>  
27/10, Lomonosovsky Prospekt, 119192, Moscow, Russia.  
E-mail: imihailov@mc.msu.ru<sup>1</sup>

P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia<sup>2</sup>  
3, 2nd Botkinsky Pr., 125284, Moscow, Russia<sup>2</sup>

## Abstract

**The aim of the study** was to study and evaluate the predictive value of the immune microenvironment of gastric cancer and morphologically normal mucous membrane of the peritumoral area using an automatic morphometric analysis system on the example of CD8+ cells. **Material and Methods.** Surgical samples from 130 patients with a verified diagnosis of gastric cancer were used. After immunohistochemical staining with antibodies to CD8, a morphological assessment was performed according to the original method. We assessed the average area of CD8+ cells in three fields of view (lens magn.  $\times 20$ ) using the automatic system of morphometric analysis LAS X (Leica) in the central part of the tumor and areas of morphologically normal mucous membrane of the peritumoral region directly adjacent to the tumor tissue. The results were compared with the main clinical and morphological characteristics of the tumor as well as with the overall five-year survival of patients. **Results and Discussion.** A high density of CD8+ infiltration of normal mucous membrane of the peritumoral area was observed in groups T4a and T4b by the depth of invasion ( $n=96$ ,  $p=0.0089$ ) and was associated with the presence of emboli in the lymphatic vessels ( $n=96$ ,  $p=0.0102$ ) and with the more advanced stage of gastric cancer ( $n=96$ ,  $p=0.0107$ ). The studied cases were divided into two groups: less than 3300 square micrometers (better patient survival;  $n=79$ ,  $p=0.01$ ) and more than 3300 square micrometers according to the average area of CD8+ cells in normal mucous membrane of the peritumoral area. According to multivariate survival analysis using the Cox regression model, it was found that the average area of CD8+ cells in normal mucous membrane of the peritumoral area was a significant negative prognostic factor (RR=1.537; CI: 0.761–3.105;  $p<0.01$ ) comparable in degree covariance with the stage of the tumor. A similar indicator assessed in central part of the tumor was not significantly associated with patient survival (RR=0.803; CI: 0.574–1.122;  $p>0.05$ ). **Conclusion.** The possibility of using an automatic analysis system to evaluate the immune microenvironment in gastric cancer was demonstrated for the first time. It was found that a high level of CD8+ lymphocyte infiltration of morphologically normal mucous membrane of the peritumoral area was an independent negative prognostic factor. Therefore, we recommend the mandatory preoperative biopsy sampling from the mucous membrane of the peritumoral region for morphometric assessment of CD8+ lymphocyte infiltration.

**Key words:** gastric cancer, tumor microenvironment, morphometric analysis, immunohistochemistry, CD8-positive T-lymphocytes, survival analysis, prognostic factors.

## Введение

Рак желудка (РЖ) – одно из самых распространенных онкологических заболеваний в мире [1], активно исследуются его биологические характеристики с целью создания молекулярно-биологической классификации [2]. Современная стратегия лечения рака желудка основана на системе стадирования TNM, которая отражает общий прогноз заболевания. Классификация постоянно пересматривается и совершенствуется в течение последних 80 лет [3], но известно, что на прогноз выживаемости при раке желудка могут влиять и другие факторы, которые не учитывает система TNM.

При РЖ одной и той же стадии пациенты имеют различные клинические исходы, что стимулирует поиск новых прогностических факторов и эффективных методов лечения, одними из которых являются характеристики иммунного микроокружения опухолей, в том числе опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (TILs) [4]. С точки зрения иммунологии TILs – специфическая популяция Т-лимфоцитов, которая активируется при презентации дендритными клетками опухолевых антигенов [5]. Опухолевые антигены возникают в результате транскрипции участков ДНК, подвергшихся различным генетическим нарушениям.

Известно, что опухолевые клетки способны распространяться намного дальше микроскопически определяемого инвазивного края и обеспечивать ремоделирование прилежащих участков стромы путем сложного каскада взаимодействий с фибробластами, макрофагами, эндотелиальными и другими клетками [6], что микроскопически проявляется как десмопластическая реакция стромы. Вероятно, опухолевые антигены присутствуют и в перитуморальной области (peri-tumor, PT), распознаются дендритными клетками и презентуются находящимся там лимфоцитам. Таким образом, воспалительный инфильтрат, находящийся как в опухоли, так и в прилегающей морфологически нормальной ткани, является проявлением одного патологического процесса. В связи с этим считается корректным применение термина «опухоль-инфильтрирующие лимфоциты» и PT. Среди TILs выделяют Т-хелперы (CD4+), цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+) и Т-регуляторные клетки (FoxP3+). CD8+ лимфоциты способны напрямую целенаправленно уничтожать опухолевые клетки путем секреции перфорина и гранзимов либо вызывать деструкцию ткани опухоли путем секреции эффекторных цитокинов, таких как интерферон-гамма и фактор некроза опухоли альфа [7, 8]. Для аденокарциномы желудка показано, что высокая плотность инфильтрации в паренхиме (непосредственно между опухолевыми клетками) и в строме опухоли CD8+ лимфоцитами ассоциирована с лучшим прогнозом [4]. Также установлено, что иммунные клетки в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области могут участвовать в процессах эпителио-мезенхимного перехода, метастазирования и других [9, 10]. Однако количественная оценка опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) в PT при раке желудка и сравнение этих показателей с клинико-морфологическими характеристиками опухолевой ткани встретились только в одной публикации [11]. Авторы обнаружили ассоциацию лучшей общей выживаемости пациентов с высокой плотностью инфильтрации опухолевой ткани CD4+ и CD8+ лимфоцитами и высокой плотностью инфильтрации прилежащих участков неизменной слизистой оболочки FoxP3+ клетками [11]. Таким образом, несмотря на безусловную важность и прогностическую значимость изучения TILs при раке желудка, характеристики микроокружения PT, в частности в морфологически нормальной слизистой оболочке перитуморальной области, остаются недостаточно изученными.

В соответствии с рекомендациями Международной рабочей группы по изучению иммунных биомаркеров в онкологии (International Immunooncology Biomarkers Working Group, IIBWG) [12] лучшим для идентификации TILs признается иммуногистохимический метод. Согласно этому консенсусу, репрезентативным для оценки TILs счита-

ется фрагмент ткани размером не менее 4–5 мм, более предпочтителен операционный, а не биопсийный материал. Метод тканевых микрочипов, по мнению данной рабочей группы, непригоден для оценки плотности инфильтрации TILs [12]. Однако рекомендованная методика подсчета не учитывает необходимость подсчета TILs во всех участках перитуморальной области, поэтому необходима апробация новых шкал оценки TILs, а также внедрение автоматизированных систем, позволяющих выполнять более точный морфометрический анализ.

**Целью исследования** являются оценка иммунного микроокружения рака желудка и морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области с применением системы автоматического морфометрического анализа, определение степени прогностической значимости плотности иммунного микроокружения в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области на примере CD8+ TILs.

### Материал и методы

В исследовании были использованы образцы операционного материала от 130 пациентов с верифицированным диагнозом рака желудка (тубулярные аденокарциномы, AC и перстневидноклеточные раки, SRC). Важным критерием отбора парафиновых блоков было наличие в одном кусочке участков рака желудка с прилежащими участками морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области. Характеристики выборки пациентов представлены в табл. 1 и 2.

Для каждого образца было проведено обзорное окрашивание гематоксилином и эозином; иммуногистохимическое выявление маркера цитотоксических Т-лимфоцитов CD8 (клон C8/144B) с использованием иммуностейнера Autostainer 480S (Thermo Fisher Scientific, USA). Результаты реакций оценивали с использованием микроскопа DM4000B/DFC495 (Leica Microsystems, Germany) и автоматической системы морфометрического анализа LAS X (Leica Microsystems, Germany) с применением сегментации участков изображения выбранного цветового диапазона по шкале RGB. Результат морфометрического анализа фиксировался в виде площади, занятой объектами выделенного цветового диапазона (окрашенными диаминобензидином) в данном поле зрения в квадратных микрометрах (мкм<sup>2</sup>).

Для морфологической оценки использована оригинальная методика, частично основанная на рекомендациях IIBWG [12]: подсчет средней площади CD8+ клеток в трех полях зрения при  $\times 20$  в центральной части опухоли и участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области, непосредственно прилежащей к опухолевой ткани (находящейся на расстоянии не более одного поля зрения при  $\times 20$  от опухолевой ткани).

Таблица 1/Table 1

**Половозрастные характеристики пациентов**

**Age and sex characteristics of patients**

Возраст, лет/ Age, years	Мужчины/ Male (n=59)	Женщины/ Female (n=71)	Всего/ Total (n=130)
35–40	2	5	7
41–50	7	5	12
51–60	14	15	29
61–70	20	23	43
71–80	16	22	38
>80 лет	0	1	1

Таблица 2/Table 2

**Распределение пациентов по pTNM-стадиям рака желудка (AJCC, 8-й пересмотр, 2017)**

**Distribution of patients by Pathologic stages of gastric cancer (AJCC, 8th edition, 2017)**

Стадия опухоли/ Stage of the tumor	Мужчины/ Male (n=59)	Женщины/ Female (n=71)	Всего/ Total (n=130)
IA	8	12	20
IB	5	4	9
IIA	5	2	7
IIB	8	10	18
IIIA	11	11	22
IIIB	8	11	19
IIIC	7	9	16
IV	8	11	19

Полученные результаты были сопоставлены со следующими клинико-морфологическими характеристиками опухолевого процесса: степень дифференцировки опухоли (G); глубина инвазии (T); количество метастазов в регионарные лимфоузлы (N); наличие отдаленных метастазов (M); стадия опухолевого процесса (AJCC, 8-е издание, 2017); наличие эмболов в лимфатических сосудах; наличие эмболов в кровеносных сосудах; локализация опухоли по третям желудка. Прогностическая значимость определялась с использованием данных о 5-летней общей выживаемости. Исследование выполнялось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, его проведение было одобрено локальными этическими комитетами всех учреждений-соисполнителей.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA). Для статистической обработки результатов использовались: непараметрический U-критерий Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test) для попарного сравнения групп, критерий Краскала–Уоллиса (Kruskal–Wallis test) для множественного сравнения, анализ выживаемости по Каплану–Майеру (survival analysis by Kaplan–Meier curve), логранговый критерий (log-rank test), критерий Кокса–Мантела (Cox–Mantel test) и критерий Вилкоксона, обобщенный Геханом (Gehan’s Wilcoxon test), а также многофакторный анализ выживаемости в регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса (Cox proportional hazard model).

**Результаты и обсуждение**

Сводные данные, полученные в ходе морфометрического анализа инфильтрации CD8+ TILs центральной части опухолевой ткани и участков морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области, представлены в табл. 3 в виде медиан и интерквартильных размахов средних площадей CD8+ в 3 полях зрения в мкм<sup>2</sup> при ×20 в разрезе основных клинико-морфологических характеристик рака желудка. Важно, что не во всех случаях в блоках присутствовали участки морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области, в связи с чем общее число отобранных для исследования случаев в табл. 3, графе 3 составляет n=96. При определении локализации опухоли по третям желудка опухоли, захватывающие более одной трети, и опухоли желудка с прорастанием в пищевод из анализа исключались, в связи с чем общее число случаев в табл. 3 по графе 2 составляет n=104, а по графе 3 – n=76.

Наибольшее значение медианы средней площади CD8+ клеток при оценке в центральной части опухолей было получено в группе T4a – 2260,8 мкм<sup>2</sup>, однако близкие значения также были получены в группе T1a/T1b – 2229,2 мкм<sup>2</sup> и в группе T3 – 2260,8 мкм<sup>2</sup> (табл. 3). Различия между группами по глубине инвазии при оценке инфильтрации в центральной части опухолей оказались статистически не значимыми. Наибольшее значение медианы при оценке инфильтрата в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области было получено

Таблица 3/Table 3

**Медианы средних площадей, занимаемых CD8+ клетками в 3 полях зрения в мкм<sup>2</sup> при Ч20 в зависимости от клинико-морфологических характеристик опухоли**

**Medians of the average areas occupied by CD8+ cells in three fields of view in square micrometers (Ч20) in the context of the clinical and morphological characteristics of the tumor**

Клинико-морфологические свойства опухоли/ Clinical and morphological properties of the tumor	В центральной части опухоли/ In the central part of the tumor		В участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области/ In areas of morphologically normal mucous membrane of the peritumoral area	
	Глубина инвазии/Depth of invasion			
T1a/T1b	2229,2	n=24	2647,9	n=23
T2	1731,3	n=14	3423,0	n=12
T3	2260,8	n=13	3311,1	n=9
T4a	2114,4	n=69	5306,4	n=43
T4b	1075,8	n=10	4415,7	n=9
	Наличие метастазов в регионарные лимфоузлы/Presence of metastases to regional lymph nodes			
N0	2065,3	n=40	3229,7	n=32
N1	1773,0	n=26	3506,9	n=20
N2	1826,1	n=18	5055,4	n=11
N3a	2064,3	n=29	4583,9	n=24
N3b	2429,8	n=17	4832,8	n=9
	Наличие отдаленных метастазов/The presence of distant metastases			
M0	2064,3	n=111	4205,4	n=82
M1	2392,17	n=19	4351,4	n=14
	pTNM-стадия (AJCC, 8-е издание)/pTNM stage (AJCC, 8th edition)			
IA	2107,4	n=20	2770,3	n=19
IB	3314,5	n=9	3287,9	n=8
IIA	598,5	n=7	3093,8	n=5
IIB	1356,6	n=18	2661,1	n=13
IIIA	2753,6	n=22	6179,8	n=13
IIIB	2114,4	n=19	4752,0	n=15
IIIC	2226,2	n=16	5786,5	n=9
IV	2392,2	n=19	4351,4	n=14
	Степень дифференцировки/Differentiation degree			
AC, NOS, G1	2325,6	n=8	5273,3	n=5
AC, NOS, G2	1606,6	n=36	3112,2	n=27
AC, NOS, G3	3172,4	n=55	4415,7	n=37
SRC	2154,0	n=31	3739,1	n=27
	Наличие эмболов в лимфатических сосудах/The presence of emboli in the lymphatic vessels			
Да/Yes	2429,8	n=70	4965,2	n=53
Нет/No	1949,4	n=60	3290,2	n=43
	Наличие эмболов в кровеносных сосудах/Presence of emboli in blood vessels			
Да/Yes	2253,3	n=22	4965,2	n=18
Нет/No	2119,3	n=108	4178,9	n=79
	Локализация опухоли по третям желудка/Localization of the tumor in thirds of the stomach			
Верхняя треть/Upper third	2358,9	n=17	3478,4	n=9
Средняя треть/Middle third	3265,7	n=40	5164,3	n=29
Нижняя треть/Lower third	1815,1	n=32	3112,2	n=28
Субтотальное поражение/ Subtotal lesion	2070,7	n=15	2529,9	n=10

но в группах T4a – 5306,4 мкм<sup>2</sup> и T4b – 4415,7 мкм<sup>2</sup> (табл. 3). Между группами имеются значимые различия (n=96, p=0,0089), при этом наблюдается единая тенденция, что с увеличением глубины инвазии опухоли увеличивается и средняя площадь CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области

(рис. 1а). Известно, что высокая плотность инфильтрации опухолевой ткани цитотоксическими CD8+ Т-лимфоцитами ассоциирована с лучшим прогнозом. Основным путем активации этой популяции клеток является презентация антигена дендритными клетками путем связывания Т-клеточного рецептора (TCR) и CD8 с соответствующими

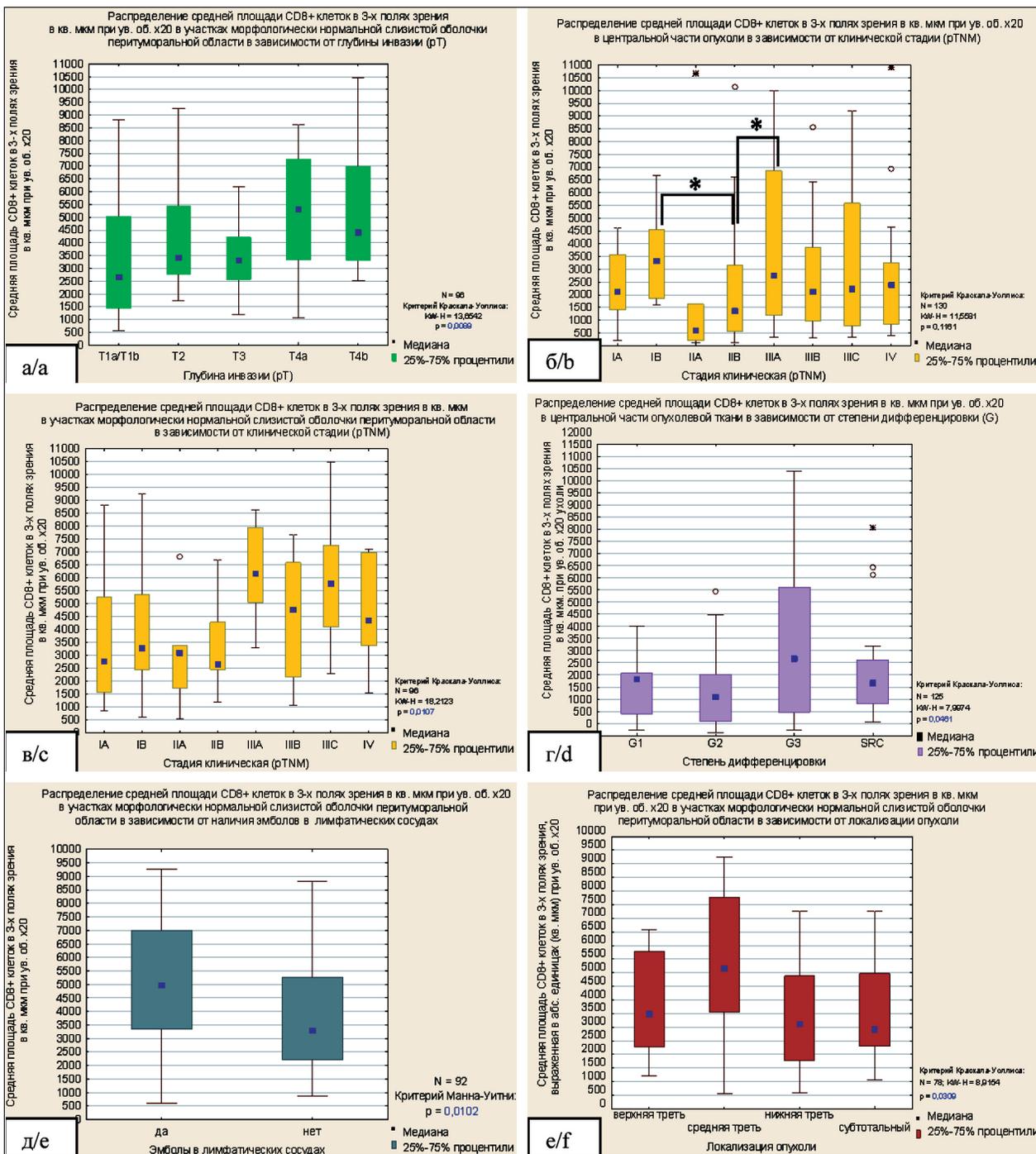


Рис. 1. Распределение средней площади CD8+ клеток в зависимости от клинко-морфологических характеристик рака желудка: а – распределение средней площади CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области в зависимости от глубины инвазии; б – распределение средней площади CD8+ клеток в центральной части опухоли в зависимости от стадии; в – распределение средней площади CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области в зависимости от стадии; г – распределение средней площади CD8+ клеток в центральной части опухоли в зависимости от степени дифференцировки; д – распределение средней площади CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области в зависимости от наличия эмболов в лимфатических сосудах; е – распределение средней площади CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области в зависимости от локализации опухоли по третям желудка

Fig. 1. Distribution of the average area of CD8+ cells depending by clinical and morphological characteristics of gastric cancer а – distribution of average area of CD8+ cells in morphologically normal mucous membrane of the peritumoral area by depth of invasion; б – distribution of average area of CD8+ cells in the central part of the tumor depending by stages; в – distribution of average area of CD8+ cells in morphologically normal mucous membrane of the peritumoral area by stages; д – distribution of average area of CD8+ cells in the central part of the tumor by grade of differentiation; е – distribution of the average area of CD8+ cells in morphologically normal mucous membrane of the peritumoral area by the presence of emboli in the lymphatic vessels; ф – distribution of average area of CD8 cells in morphologically normal mucous membrane of the peritumoral area by tumor localization

доменами на МНС-II дендритной клетки с последующим формированием иммунокомпетентного клона [6]. Высокая плотность инфильтрации CD8+ клетками участков морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области может свидетельствовать о внутриорганным распространении опухолевых клеток намного дальше видимого инвазивного края опухоли, что приводит к активации противоопухолевого ответа со стороны CD8+ клеток и их пролиферации в том случае, если опухолевые клетки не гиперэкспрессируют ингибирующие молекулы PD-L1 и CTLA-4. Подобный механизм может объяснять ассоциацию высокой плотности инфильтрации CD8+ лимфоцитами участков морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области с более глубоким уровнем инвазии рака желудка в подлежащие ткани.

Полученные данные свидетельствуют о том, что средняя площадь CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области имеет значимую взаимосвязь с глубиной инвазии опухоли при раке желудка, которые отличаются от аналогичных показателей в центральной части опухолевой ткани – высокая плотность инфильтрации CD8+ клетками ассоциирована с большей глубиной инвазии. Данный факт выявлен впервые.

При изучении связи средней площади CD8+ клеток с количеством метастазов в регионарные лимфатические узлы, а также наличием отдаленных метастазов значимых различий не выявлено.

Стадии опухолевого процесса по системе pTNM при раке желудка объединяют крайне гетерогенные группы опухолей: в пределах одной стадии опухоли могут иметь либо большую глубину инвазии, либо большее число метастазов в регионарные лимфоузлы. Поскольку TILs активируются специфическими опухолевыми антигенами, показатели плотности их инфильтрации могут хорошо отражать гетерогенность опухолей в пределах одной клинической стадии. Наибольшее значение медианы средней площади CD8+ клеток при оценке в центральной части опухолей (рис. 1б) было получено в группе опухолей со стадией IB – 3314,5 мкм<sup>2</sup>, что превышает значения, полученные в группе IB – 1356,56 мкм<sup>2</sup> и группе IIIA – 2753,61 мкм<sup>2</sup> (табл. 3). Однако эти различия оказались статистически не значимыми (p=0,1161). Полученные данные свидетельствуют о связи большей плотности инфильтрации CD8+ клетками с более ранними стадиями рака желудка. Это согласуется с выводами наиболее крупного исследования, включавшего данные по 4888 пациентам. Согласно этой работе, высокая плотность инфильтрации CD3+ лимфоцитами (включает CD4+ и CD8+) опухолевой ткани ассоциирована с лучшей общей выживаемостью. Инфильтрация CD8+ лимфоцитами в инвазивном крае опухоли

также была ассоциирована с увеличением общей выживаемости [4]. Наибольшее значение медианы при оценке инфильтрата в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области было получено в группе опухолей со стадией IIIA – 6179,8 мкм<sup>2</sup> (табл. 3). Между всеми группами имеются значимые различия (n=96, p=0,0107), при этом, на первый взгляд, не наблюдается единой тенденции изменения средней площади CD8+ клеток в разрезе стадий (рис. 1в). Это может быть обусловлено тем, что стадия по системе pTNM определяется в значительной степени сроками постановки диагноза и в меньшей степени свойствами самой опухоли. Однако так как между всеми группами в разрезе стадий имеются достоверные различия с уровнем значимости p=0,0107, была проведена кластеризация полученных результатов на две группы (табл 3):

– опухоли со стадиями IA, IB, ПА, ПБ, значения медиан для которых соответственно равны 2770,3; 3287,9; 3093,8 и 2661,1 мкм<sup>2</sup>;

– опухоли со стадиями IIIA, IIIB, IIIC и IV, значения медиан для которых соответственно равны 6179,8; 4752,0; 5786,5 и 4351,4 мкм<sup>2</sup>. При подобной группировке видно, что значения медиан второго кластера в 2–3 раза превышают медианы первого кластера, что свидетельствует о том, что большая плотность инфильтрации CD8+ клетками в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области ассоциирована с более продвинутой стадией рака желудка. Подобная зависимость выявлена впервые и косвенно указывает на значительную диагностическую ценность подсчета площади CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области. Этот факт особенно важен в сравнении с оценкой иммунного микроокружения в центральной части опухолевой ткани, где, по данным литературы, выявляется противоположная закономерность [4].

Наибольшее значение медианы средней площади CD8+ клеток при оценке в центральной части опухолей было получено в группе опухолей с наличием эмболов в лимфатических сосудах – 2429,8 мкм<sup>2</sup>, однако это преобладание не является статистически значимым (табл. 3).

Наибольшее значение медианы при оценке инфильтрата в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области также было получено в группе опухолей с наличием эмболов в лимфатических сосудах – 4965,2 мкм<sup>2</sup> (рис. 1д) по сравнению с другой группой опухолей – 3290,2 мкм<sup>2</sup> (табл. 3). Данное различие имеет высокий уровень значимости (n=96, p=0,0102), следовательно, высокая плотность инфильтрации CD8+ клетками в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области ассоциирована с лимфогенным метаста-

зированием рака желудка. Полученные данные хорошо согласуются с ранее установленным нами фактом, что высокая плотность инфильтрации CD4+ клетками в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области ассоциирована с большим количеством метастазов в регионарные лимфоузлы [13]. Возможные патогенетические причины подобных закономерностей изучены недостаточно. Ряд авторов указывает на значимую роль TILs в активации экспрессии матриксных металлопротеиназ в перитуморальной области [6, 10, 14, 15]. Считается, что экспрессия матриксных металлопротеиназ является одним из основных факторов, способствующих инвазии и метастазированию аденокарциномы желудка [10]. Подробное изучение механизма увеличения экспрессии металлопротеиназ проведено для опухолей других локализаций,

в частности для меланомы с высоким инвазивным потенциалом. Показано, что клетки меланомы путем выделения IL-1 $\alpha$  индуцируют продукцию фибробластами этой группы ферментов [14]. Известно, что IL-1 $\alpha$  (обычно секретируется антиген-презентирующими клетками) индуцирует пролиферацию CD4+ Т-хелперов 17 типа (Th17), которые, в свою очередь, продуцируют IL-17A [6], способный стимулировать экспрессию матриксных металлопротеиназ клетками аденокарциномы желудка [15]. Можно предположить, что высокая плотность инфильтрации CD4+ лимфоцитами в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области объясняется именно пролиферацией Th17, которые стимулируют фибробласты окружающей ткани к продукции матриксных металлопротеиназ, что облегчает продвижение клеток аденокарциномы желудка к крове-

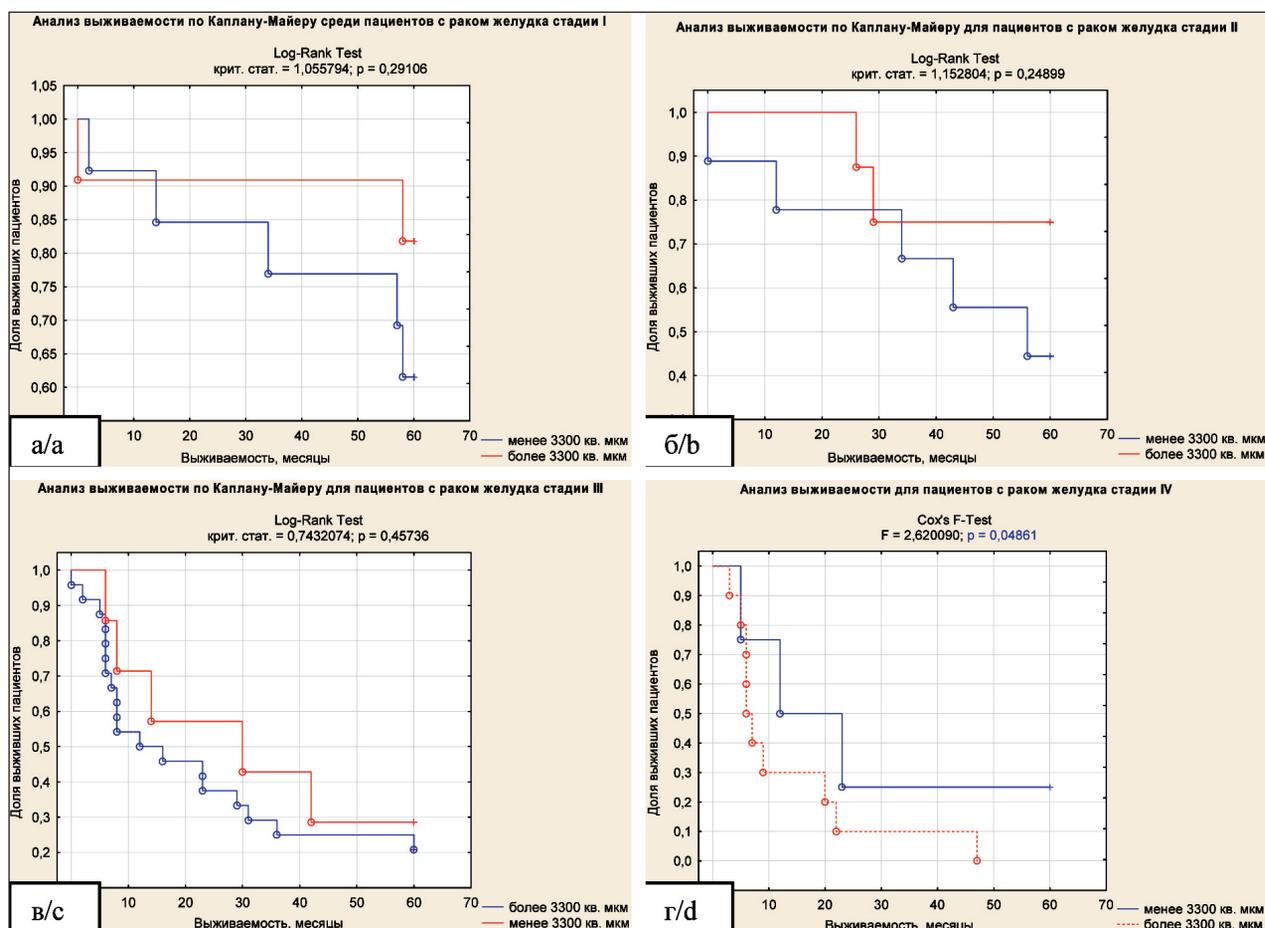


Рис. 2. Распределение средней площади CD8+ клеток в зависимости от показателей общей 5-летней выживаемости по Каплану-Майеру:

- а – в зависимости от плотности распределения средних площадей CD8+ клеток в центральной части опухолевой ткани;
- б – в зависимости от средней площади CD8+ клеток в центральной части опухолевой ткани;
- в – в зависимости от плотности распределения средних площадей CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области выживаемости пациентов;
- г – в зависимости от средней площади CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области

Fig. 2. Distribution of average area of CD8+ cells by overall five-year survival of patients: a – analysis of the density distribution of average areas of CD8+ cells in the central part of the tumor tissue by survival; b – Kaplan-Meier survival analysis by average area of CD8+ cells in the central part of the tumor tissue; c – analysis of the density distribution of average areas of CD8+ cells in morphologically normal mucous membrane of the peritumoral area by survival; d – Kaplan-Meier survival analysis survival by average area of CD8+ cells in morphologically normal mucous membrane of the peritumoral area

носным и лимфатическим сосудам и способствует метастазированию. Возможная патогенетическая роль CD8+ TILs в прилежащей к инвазивному краю опухоли морфологически не измененной ткани также изучена недостаточно. Известно, что CD4+ лимфоциты способны стимулировать активность CD8+ лимфоцитов путем секреции эффекторных цитокинов [6]. Следовательно, если предположить, что в перитуморальной области CD4+ Т-хелперы 17 типа находятся в активированном состоянии, то весьма вероятно, что они стимулируют миграцию и активность CD8+ лимфоцитов. При изучении связи средней площади CD8+ клеток с наличием эмболов в кровеносных сосудах, степенью дифференцировки и локализацией опухоли значимых различий не получено.

В целях проведения анализа выживаемости выборка была сгруппирована на основании не-

скольких пороговых значений средней площади CD8+ клеток в 3 полях зрения при ×20, которые были определены в ходе построения функций выживаемости. Исследованная выборка случаев является цензурированной как слева (отсчет времени проводился от даты операции), так и справа (срок наблюдения ограничивался 60 мес). Исследованные случаи были разделены на три группы по средней площади CD8+ клеток в центральной части опухоли: до 1100 мкм<sup>2</sup>; от 1100 до 3500 мкм<sup>2</sup>; от 3500 мкм<sup>2</sup> и более. Разделение на группы проводилось эмпирически путем выделения пороговых значений средней площади CD8+ клеток, разделяющих области наибольшего скопления значений на графиках плотности распределения полученных данных (рис. 2а).

Для трех выбранных групп были построены кривые выживаемости Каплана–Майера (рис. 2б).

Таблица 4/Table 4

**Распределение случаев рака желудка по pTNM-стадии и степени дифференцировки в группе со средней площадью CD8+ клеток более 3300 мкм<sup>2</sup> в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области**

**The distribution of cases of gastric cancer by pathologic stages and grade of differentiation (G) in the group with an average area of CD8+ cells of more than 3300 square micrometers in morphologically normal mucous membrane of the peritumoral area**

Стадия/Stage (n=53)	Степень дифференцировки/Differentiation degree (n=53)
I	AC, NOS, G1 4
II	AC, NOS, G2 12
III	AC, NOS, G3 20
IV	SRC 17

Таблица 5/Table 5

**Сравнение результатов проведения многофакторного анализа общей пятилетней выживаемости пациентов с использованием регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса**

**Comparison of the results of a multivariate analysis of the overall five-year survival of patients using the Cox proportional risk regression model**

Оцениваемый фактор/Estimated factor	RR	ДИ (5–95 %)/CI (5–95 %)	P
Степень дифференцировки/Differentiation grade	1,003	0,997–1,008	>0,05
Стадия/Stage	1,719	1,235–2,395	<0,01
Наличие эмболов в лимфатических сосудах (да/нет)/ The presence of emboli in the lymphatic vessels (yes/no)	1,946	0,992–3,818	<0,01
Наличие эмболов в кровеносных сосудах (да/нет)/ Presence of emboli in blood vessels (yes/no)	1,659	0,869–3,168	<0,01
Локализация по третям желудка/Localization in thirds of the stomach	1,419	1,069–1,885	<0,01
Средняя площадь CD8+ клеток в 3 полях зрения (мкм <sup>2</sup> ) при ×20, измеренная методом автоматической сегментации, в центральной части опухоли (до 110 мкм <sup>2</sup> ; 1100–3500 мкм <sup>2</sup> ; более 3500 мкм <sup>2</sup> )/ The average area of CD8+ cells in 3 fields of view (sq. μm) at magnification about ×20, measured by automatic segmentation, in the central part of the tumor (up to 110 sq. μm; 1100–3500 sq. μm; more than 3500 sq. μm)	0,803	0,574–1,122	>0,05
Средняя площадь CD8+ клеток в 3 полях зрения (мкм <sup>2</sup> ) при ×20, измеренная методом автоматической сегментации, в морфологически нормальной слизистой оболочке перитуморальной области, непосредственно прилежащей к опухолевой ткани (до 3300 мкм <sup>2</sup> ; более 3300 мкм <sup>2</sup> )/ The average area of CD8+ cells in 3 fields of view (sq. μm) at magnification about ×20, measured by automatic segmentation, in the morphologically normal mucous membrane of the peritumoral region, immediately adjacent to the tumor tissue (up to 3300 sq. μm; more than 3300 sq. μm)	1,537	0,761–3,105	<0,01

Лучшая пятилетняя выживаемость наблюдалась в группе больных с опухолями со средней площадью CD8+ клеток в 3 полях зрения от 3500 мкм<sup>2</sup> и более, однако значимые различия между группами отсутствовали (критерий  $\chi^2$ : n=114, p=0,1260). В зависимости от средней площади CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области исследованные случаи были разделены на две группы: до 3300 мкм<sup>2</sup>; от 3300 мкм<sup>2</sup> и более. Разделение на группы проводилось на основании анализа плотности и функции распределения полученных данных (рис. 2в). Лучшая пятилетняя выживаемость наблюдалась у группы пациентов, в образцах от которых средняя площадь CD8+ клеток в 3 полях зрения в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области не превышала 3300 мкм<sup>2</sup> (рис. 2г), причем различие с другой группой характеризовалось высоким уровнем статистической значимости (для n=79: лог-ранговый критерий – p=0,0333; критерий Кокса–Мантела – p=0,0381; критерий Вилкоксона, обобщенный Ге-

ханом – p=0,01). Следует обратить внимание, что в группе с высокой (от 3300 мкм<sup>2</sup> и более) площадью CD8+ клеток присутствовали опухоли различных pTNM-стадий и дифференцировки (табл. 4).

При сравнении выживаемости пациентов в рамках одной клинической стадии выявлено значимое снижение выживаемости пациентов с РЖ IV стадии при высокой средней площади CD8+ клеток (более 3300 мкм<sup>2</sup>) (рис. 3). Для других стадий значимых различий не получено, что может быть связано с малым числом наблюдений, однако у больных РЖ III стадии прослеживается тенденция к ухудшению выживаемости при высокой средней площади CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области.

Таким образом, впервые показано, что высокая плотность инфильтрации CD8+ клетками, выраженная в виде средней площади в 3 полях зрения при  $\times 20$  и подсчитанная автоматическим методом, достоверно ассоциирована с худшей общей пятилетней выживаемостью пациентов, а так-

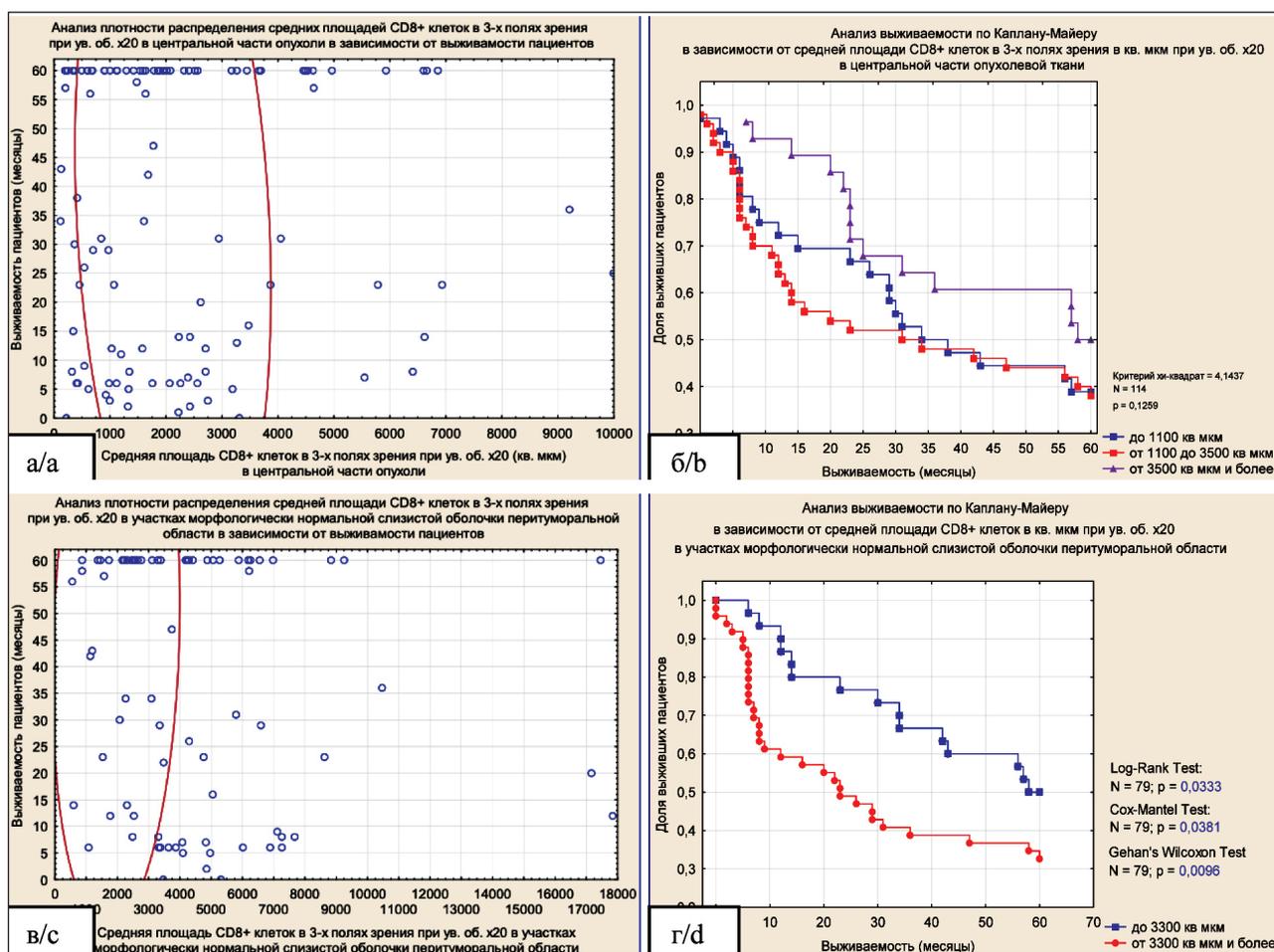


Рис. 3. Общая пятилетняя выживаемость по Каплану–Майеру больных РЖ в зависимости от стадий и средней площади CD8+ клеток в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области:

а – РЖ I стадии; б – РЖ II стадии; в – РЖ III стадии; г – РЖ IV стадии

Fig. 3. The overall five-year Kaplan-Meier survival of patients with gastric cancer depending on stages and average area of CD8+ cells in morphologically normal mucous membrane of the peritumoral area:

а – gastric cancer I stage; б – gastric cancer II stage; в – gastric cancer III stage; г – gastric cancer IV stage

же значимо ухудшает прогноз при раке желудка IV стадии. При многофакторном анализе общей пятилетней выживаемости пациентов с использованием регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса установлено, что наиболее значимым отрицательным прогностическим фактором является стадия опухолевого процесса, для которой RR составило 1,719 (5–95% CI 1,235–2,395;  $p < 0,01$ ) (табл. 5). Средняя площадь CD8+ клеток в 3 полях зрения ( $\text{мкм}^2$ ) при  $\times 20$ , измеренная методом автоматической сегментации, в морфологически нормальной слизистой оболочке перитуморальной области, непосредственно прилежащей к опухолевой ткани, также является значимым отрицательным прогностическим фактором (RR=1,537; CI 1,102–3,105;  $p < 0,01$ ), сопоставимым по степени значимости со стадией опухолевого процесса. Аналогичный показатель, измеренный в центральной части опухоли, значимо не ассоциирован с общей 5-летней выживаемостью (RR=0,803; CI 0,574–1,122;  $p > 0,05$ ). Таким образом, анализ выживаемости с использованием регрессионной модели Кокса подтвердил установленный факт о том, что высокая плотность инфильтрации CD8+ клетками, выраженная в виде средней площади в 3 полях зрения при  $\times 20$  и подсчитанная автоматическим методом, является отрицательным независимым прогностическим фактором у больных раком желудка, сопоставимым по степени ковариации с прогностической значимостью стадии опухолевого процесса (AJCC, 8-е издание, 2017).

### Заключение

В исследовании впервые продемонстрирована возможность использования системы автоматиче-

ского анализа для оценки иммунного микроокружения при раке желудка. Предложенная шкала оценки иммунного микроокружения характеризуется умеренным уровнем трудоемкости и достаточной точностью за счет использования автоматического морфометрического анализа. Установлено, что оценка иммунного микроокружения (на примере CD8+ клеток при раке желудка) в участках морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области имеет большее прогностическое значение по сравнению с общепринятой оценкой в центральной части опухоли. Впервые показано, что высокая плотность инфильтрации морфологически нормальной слизистой оболочки перитуморальной области при раке желудка значимо ассоциирована с большей глубиной инвазии, более распространенной стадией, наличием эмболов в лимфатических сосудах, худшей общей 5-летней выживаемостью (независимый отрицательный прогностический фактор, сопоставимый по значимости со стадией опухолевого процесса). В свете необходимости поиска новых прогностических критериев, позволяющих выявить на предоперационном этапе более агрессивные опухоли, заключаем, что высокий уровень инфильтрации CD8+ лимфоцитами морфологически нормальной слизистой оболочки желудка в перитуморальной области является независимым неблагоприятным прогностическим фактором. В связи с этим рекомендуем обязательный забор биопсийного материала из слизистой оболочки перитуморальной области на предоперационном этапе для морфометрической оценки инфильтрации CD8+ лимфоцитами.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov; 68(6): 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
2. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014 Sep 11; 513(7517): 202–9. doi: 10.1038/nature13480.
3. Ajani J.A., Amin M.B., Edge S., Greene F., Byrd D.R., Brookland R.K. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer, American Joint Committee on Cancer; 2017. 1032 p.
4. Jiang W, Liu K, Guo Q, Cheng J, Shen L, Cao Y, Wu J, Shi J, Cao H, Liu B, Tao K, Wang G, Cai K. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 May 3; 8(37): 62312–62329. doi: 10.18632/oncotarget.17602.
5. Zhang D, He W, Wu C, Tan Y, He Y, Xu B, Chen L, Li Q, Jiang J. Scoring System for Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Its Prognostic Value for Gastric Cancer. *Front Immunol*. 2019; 10: 71. doi: 10.3389/fimmu.2019.00071.
6. Kumar V, Abbas A.K., Aster J.C. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2015.
7. Lu P, Weaver V.M., Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. 2012; 196(4): 395–406. doi: 10.1083/jcb.201102147.
8. Fridman W.H., Pagès F., Sautès-Fridman C., Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 15; 12(4): 298–306. doi: 10.1038/nrc3245. PMID: 22419253.
9. Ma H.Y., Liu X.Z., Liang C.M. Inflammatory microenvironment contributes to epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2016 Aug 7; 22(29): 6619–28. doi: 10.3748/wjg.v22.i29.6619.

10. Sawayama H., Ishimoto T., Baba H. Microenvironment in the pathogenesis of gastric cancer metastasis. *J Cancer Metastasis Treat*. 2018; 4(10). doi: 10.20517/2394-4722.2017.79.
11. Liu K, Yang K, Wu B, Chen H, Chen X, Chen X, Jiang L, Ye F, He D, Lu Z, Xue L, Zhang W, Li Q, Zhou Z, Mo X, Hu J. Tumor-Infiltrating Immune Cells Are Associated With Prognosis of Gastric Cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Sep; 94(39): e1631. doi: 10.1097/MD.0000000000001631.
12. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell P.A., John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada M.V., Gonzalez-Ericsson P.L., Sanders M, Solomon B, Solinas C, Van den Eynden G.G.G.M., Allory Y, Preusser M, Hainfellner J, Pruneri G, Vingiani A, Demaria S, Symmans F, Nuciforo P, Comerma L, Thompson E.A., Lakhani S, Kim S.-R., Schnitt S, Colpaert C, Sotiriou C, Scherer S.J., Ignatiadis M, Badve S, Pierce R.H., Viale G, Sirtaine N, Penault-Llorca F, Sugie T, Fineberg S, Paik S, Srinivasan A, Richardson A, Wang Y, Chmielik E, Brock J, Johnson D.B., Balko J, Wienert S, Bossuyt V, Michiels S, Ternes N, Burchardi N, Luen S.J., Savas P, Klauschen F, Watson P.H., Nelson B.H., Criscitello C, O'Toole S, Larsimont D, de Wind R, Curigliano G, Andre F, Lacroix-Triki M, van de Vijver M, Rojo F, Floris G, Bedri S, Sparano J, Rimm D, Nielsen T, Kos Z, Hewitt S, Singh B, Farshid G, Loibl S, Allison K.H., Tung N, Adams S, Willard-Gallo K, Horlings H.M., Gandhi L, Moreira A, Hirsch F, Dieci M.V., Urbanowicz M, Brčić I, Korski K, Gare F, Koepfen H, Lo A, Giltman J, Rebelato M.C., Steele K.E., Zha J, Emancipator K, Juco J.W., Denkert C, Reis-Filho J. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invas. *Adv Anat Pathol*. 2017 Sep; 24(5): 235–251. doi: 10.1097/PAP.0000000000000162.
13. Mikhailov I, Danilova N, Malkov P, Oleynikova N. CD4+ and CD8+ lymphocytes in the immune microenvironment of gastric cancer:

evaluation in Tumour Tissue (TT) and Adjacent Areas of Unchanged Mucosa (AAUM). *Virchows Arch.* 2019; 475(Suppl 1): S282. doi: 10.1007/s00428-019-02631-8.

14. *Löffek S., Zigrino P., Angel P., Anwald B., Krieg T., Mauch C.* High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1 $\alpha$  and basic fibroblast growth factor-

mediated mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2005 Mar; 124(3): 638–43. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23629.x.

15. *Wang Y., Wu H., Wu X., Bian Z., Gao Q.* Interleukin 17A promotes gastric cancer invasiveness via NF- $\kappa$ B mediated matrix metalloproteinases 2 and 9 expression. *PLoS One.* 2014; 9(6): e96678. doi: 10.1371/journal.pone.0096678.

Поступила/Received 02.04.2020  
Принята в печать/Accepted 23.05.2020

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Данилова Наталья Владимировна**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, отдел клинической патологии, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (г. Москва, Россия). E-mail: ndanilova@mc.msu.ru. SPIN-код: 6878-2025. Researcher ID (WOS): H-6477-2014. Author ID (Scopus): 36613033400. ORCID: 0000-0001-7848-6707.

**Хомяков Владимир Михайлович**, кандидат медицинских наук, заведующий торакоабдоминальным отделением, МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 4081-7701. Researcher ID (WOS): W-4911-2019. Author ID (Scopus): 56740937000. ORCID: 0000-0001-8301-4528.

**Чайка Анна Валентиновна**, кандидат медицинских наук, научный сотрудник торакоабдоминального отделения, МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 6781-1890. Researcher ID (WOS): AАН-1566-2020. Author ID (Scopus): 57200366803. ORCID: 0000-0002-2178-9317.

**Михайлов Илья Александрович**, стажер-исследователь, отдел клинической патологии, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (г. Москва, Россия). SPIN-код: 5798-0749. Researcher ID (WOS): I-9035-2017. Author ID (Scopus): 57203900904. ORCID: 0000-0001-8020-369X.

**Олейникова Нина Александровна**, кандидат медицинских наук, научный сотрудник, отдел клинической патологии, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (г. Москва, Россия). SPIN-код: 4076-2637. Researcher ID (WOS): H-7672-2014. Author ID (Scopus): 55867516400. ORCID: 0000-0001-8564-8874.

**Мальков Павел Георгиевич**, доктор медицинских наук, заведующий отделом клинической патологии, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (г. Москва, Россия). SPIN-код: 5110-2301. Researcher ID (WOS): H-6672-2014. Author ID (Scopus): 35788548700. ORCID: 0000-0001-5074-3513.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

**Данилова Наталья Владимировна:** концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста.

**Хомяков Владимир Михайлович:** концепция и дизайн исследования.

**Чайка Анна Валентиновна:** сбор и обработка материала, редактирование.

**Михайлов Илья Александрович:** концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста.

**Олейникова Нина Александровна:** редактирование.

**Мальков Павел Георгиевич:** концепция и дизайн исследования, редактирование.

#### Финансирование

*Работа выполнена в рамках госзадания ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова».*

#### Конфликт интересов

*Все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

#### ABOUT THE AUTHORS

**Natalia V. Danilova**, MD, PhD, Senior researcher scientist, Department of Pathology, Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): H-6477-2014. Author ID (Scopus): 36613033400. ORCID: 0000-0001-7848-6707. E-mail: ndanilova@mc.msu.ru.

**Vladimir M. Khomyakov**, MD, PhD, Head of Department of thoracoabdominal surgical oncology, P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): W-4911-2019. Author ID (Scopus): 56740937000. ORCID: 0000-0001-8301-4528.

**Anna V. Chaika**, MD, PhD, Researcher, Department of thoracoabdominal surgical oncology, P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): AАН-1566-2020. Author ID (Scopus): 57200366803. ORCID 0000-0002-2178-9317.

**Ilya A. Mikhailov**, Trainee Researcher, Department of Pathology, Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): I-9035-2017. Author ID (Scopus): 57203900904. ORCID: 0000-0001-8020-369X.

**Nina A. Oleynikova**, MD, PhD, Researcher, Department of Pathology, Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): H-7672-2014. Author ID (Scopus): 55867516400. ORCID: 0000-0001-8564-8874.

**Pavel G. Malkov**, MD, ScD, Head of Department of Pathology, Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): H-6672-2014. Author ID (Scopus): 35788548700. ORCID: 0000-0001-5074-3513.

#### AUTHOR CONTRIBUTION

**Natalia V. Danilova**: the concept and design of the study, collection and processing of material, writing the text.

**Vladimir M. Khomyakov**: the concept and design of the study, editing.

**Anna V. Chayka**: collection and processing of material, editing.

**Ilya A. Mikhailov**: the concept and design of the study, collection and processing of material, statistical data analysis, writing the text.

**Nina A. Oleynikova**: editing.

**Pavel G. Malkov**: the concept and design of the study, editing.

#### ***Funding***

*This research was carried out as part of the state assignment of Lomonosov Moscow State University.*

#### ***Conflict of interest***

*All authors declare no conflict of interest.*