

РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

МАСЛЕННИКОВ

Владимир Валерьевич

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ PD-L1 В
ОПУХОЛИ, sPD-1 И sPD-L1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика
(медицинские науки)

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН
Н.Е. Кушлинский

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА I. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ (sPD-1, sPD-L1) КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА PD-1/PD-L1 ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ (обзор литературы)	11
1.1. Рецептор PD-1	13
1.2. Лиганд PD-L1	13
1.3. Роль сигнального пути PD-1/PD-L в иммунной системе	13
1.4. Маркеры системы PD-1/PD-L1 для оценки клинического течения, выбора лекарственной терапии и прогноза опухолей	16
1.5. Клиническая значимость ключевой точки иммунитета PD-1/PD-L1 у больных колоректальным раком	17
1.6. Факторы, влияющие на экспрессию PD-L1	26
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	29
2.1. Характеристика обследованных больных новообразованиями толстой кишки и здоровых доноров	29
2.2. Специальные лабораторные методы исследования	37
2.3. Статистические методы анализа	38
ГЛАВА III. СОДЕРЖАНИЕ sPD-1 и sPD-L1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ, БОЛЬНЫХ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ТОЛСТОЙ КИШКИ	40
3.1. Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров, больных доброкачественными новообразованиями толстой кишки и колоректальным раком	40
3.2. Содержание PD-1, PD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров и больных опухолями толстой кишки в зависимости от их пола и возраста	45
3.3. Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных злокачественными и доброкачественными опухолями толстой кишки с учетом клинико-морфологических характеристик опухоли	53
3.4. Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком в зависимости от клинических характеристик заболевания	56
3.5. Отдаленные результаты лечения больных колоректальным раком	70
3.6. Иммуногистохимический анализ экспрессии PD-L1 в строме и клетках опухоли больных колоректальным раком	72
3.7. Корреляционные связи между растворимыми формами sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови больных раком толстой кишки и экспрессией PD-L1 в клетках опухоли и строме	74
ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	78
ВЫВОДЫ	91
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	92
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	93
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	95

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Одним из значимых направлений научных исследований в области клинической лабораторной диагностики является определение клинической и диагностической значимости биологических маркеров патологических состояний. Особенно актуально решение этой задачи при онкологических заболеваниях в связи с необходимостью прогноза течения заболевания, оценки эффективности терапии и разработки новых патогенетически обоснованных методов лечения.

Наиболее частой опухолью желудочно-кишечного тракта является колоректальный рак (КРР) [2, 16, 81, 200], которой характеризуется агрессивным клиническим течением, низкой чувствительностью к химиотерапии и неблагоприятным прогнозом [41, 52].

Этиология и патогенез КРР практически не изучены, поэтому являются актуальной задачей онкологии и лабораторной диагностики [24, 27, 65, 86, 194].

Одним из перспективных направлений исследований в онкологии, в том числе и при КРР, является изучение роли контрольных точек иммунитета (КТИ) (immune checkpoint) [4, 116, 136] и среди них PD-1/PD-L1 [6, 63, 72, 209]. Основная роль КТИ – регуляция иммунного ответа [89, 125, 179].

Сигнальная система PD-1/PD-L1 обладает одновременно двойственным эффектом на иммунные клетки, с одной стороны – стимулирует апоптоз антиген-специфичных Т-клеток, а с другой – подавляет апоптоз регуляторных, супрессорных Т-клеток [51, 72, 170], что использует опухоль для «ускользания» от иммунного ответа и это показано при многих злокачественных новообразованиях [37, 103, 162, 224].

Таким образом, выявление возможности использования растворимых форм контрольных точек иммунитета в качестве биомаркеров течения и

прогноза заболевания при колоректальном раке представляется актуальной проблемой клинической лабораторной диагностики.

Степень разработанности темы исследования

При КРР связь sPD-1 и sPD-L1 с лечением и основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания можно найти в единичных работах [141], однако результаты их неоднозначны [49, 124, 203].

Хотя, достаточно широко применяют моноклональные антитела для подавления взаимодействия PD-1 с его лигандами при лечении КРР [162, 163]. При этом, уровень экспрессия PD-L1 при метастатических формах КРР может служить независимым фактором при выборе иммунотерапии [55, 159, 206]. Основной проблемой в клинике остается выбор препарата, выбор эпитопов антител к PD-L1 и нестандартизированный метод ИГХ, а также интерпретация полученных результатов [124, 198].

Однако в работе J. Verntsson et al. (2018) на большой когорте больных КРР показали, что высокая экспрессия PD-L1 на инфильтрирующих опухоль иммунных клетках может служить независимым фактором показателя продолжительной общей выживаемости [49].

Клинические исследования по исследованию sPD-1 и sPD-L1 при КРР малочисленны, хотя уже имеются фрагментарные данные о роли данных маркеров при опухолях различной локализации. Возможность определения растворимых форм контрольных точек иммунитета в сыворотке крови открывает перспективы более широкого их использования в клинической практике. Исследование sPD-L1 и sPD-1 при КРР требует дальнейшего изучения, особенно в их связи с механизмами иммунных нарушений [15], ангиогенными факторами [10], протеолитическими системами [21], генетическими нарушениями [212], при комбинированной иммунохимиотерапии [71, 159, 204].

Цель исследования

определить клинико-лабораторную значимость содержания растворимых форм sPD-1 и sPD-L1 контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови и показателей экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и ее стромы у больных колоректальным раком и установить их связь с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания.

Задачи исследования.

1. Определить содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови группы пациентов с колоректальным раком и проанализировать их частоту выявления и распределения.
2. Провести сравнительный анализ содержания sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных с колоректальным раком и доброкачественными новообразованиями толстой кишки до лечения, а также в группе здоровых лиц.
3. Проанализировать ассоциации сывороточных уровней sPD-1 и sPD-L1 у больных колоректальным раком с ключевыми клинико-морфологическими характеристиками опухоли.
4. С помощью иммуногистохимического метода изучить уровни экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и окружающей ее строме больных колоректальным раком, показать их связь с уровнями sPD-1, sPD-L1, морфологическими особенностями колоректального рака и прогнозом.
5. Оценить влияние содержания sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови и уровня экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и стромы на показатели общей выживаемости больных колоректальным раком.

Научная новизна исследования

Настоящее исследование sPD-1 и sPD-L1 у больных КРР проведено впервые в России.

Показано, у что здоровых людей медианы концентрации sPD-1 и sPD-L1 достоверно выше, чем у больных КРР.

Не выявлено различий в концентрациях sPD-1 и sPD-L1 при доброкачественных и злокачественных опухолях толстой кишки.

Обнаружено, что в отличие от sPD-1, концентрации sPD-L1 связаны с полом здоровых и больных КРР и достоверно снижены у женщин по сравнению с мужчинами независимо от характера выявленной опухоли. При этом, выявлена положительная корреляционная связь уровней рецептора и лиганда в сыворотке крови с возрастом больных КРР прямой корреляционной зависимостью.

Исходные концентрации исследованных маркеров не связаны с морфологическим строением опухоли, степенью дифференцировки и ее локализацией в толстой кишке. Однако в отличие от sPD-1 обнаружено статистически значимое повышение медианы sPD-L1 при увеличении критерия T и при наличии метастазов.

Коэффициент sPD-1/sPD-L1 не различался между здоровыми и больными опухолями толстой кишки всех групп. Однако выявлено статистически значимое снижение медианы коэффициента соотношения PD-1/PD-L1 с уменьшением степени дифференцировки КРР.

При КРР выявлена прямая корреляционная ассоциация между концентрациями sPD-1 и sPD-L1, которая ослабевала до незначимой величины при G-3, T4, N2, M1. В группе больных доброкачественными опухолями толстой кишки такая зависимость отсутствовала.

Иммуногистохимический анализ выявил экспрессию PD-L1 в 26% клеток опухоли больных КРР, уровни которой ассоциировали только со стадией новообразования. Высокая степень экспрессии PD-L1 в клетках стромы КРР обнаружена в 29% образцов, низкая - в 35% и не коррелировала с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания, за исключением стадии опухолевого процесса.

Не обнаружили ассоциации сывороточных показателей sPD-1, sPD-L1 с уровнями экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и стромы больных КРР.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные нами результаты свидетельствуют о важной роли лабораторных биохимических маркеров sPD-1, sPD-L1 в прогрессии КРР.

Изученные биомаркеры sPD-1 и sPD-L1 не могут быть использованы в качестве факторов оценки характера выявленного новообразования толстой кишки.

Анализ уровней сывороточных sPD-1 и sPD-L1 с клиническими и морфологическими характеристиками опухолей толстой кишки позволяет сделать заключение о связи sPD-L1 с агрессивным биологическим потенциалом КРР, а именно, с основными критериями распространенности опухолевого процесса согласно международной системе TNM и отдаленными результатами лечения.

Выделена группа больных КРР высокого риска с сывороточными уровнями sPD-L1 \Rightarrow 9,6 пг/мл, которые имеют крайне неблагоприятный прогноз выживаемости и нуждаются после хирургического удаления опухоли в адьювантной лекарственной терапии с последующим пристальным наблюдением.

Практическое значение полученных нами результатов определяется возможностью оптимизации процесса диагностики и терапии при опухолях толстой кишки на основе данных по содержанию растворимых форм рецептора PD-1 и его лиганда в крови больных, а также открытием перспективы новых направлений в клинической лабораторной диагностике.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы является комплексное изучение растворимых форм ключевых компонентов (sPD-1 и sPD-L1) контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови здоровых людей, больных доброкачественными и злокачественными новообразованиями толстой кишки, а также уровней экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и окружающей ее строме больных КРР с использованием

современных высокочувствительных тест-систем, ИГХ метода, лабораторного оборудования и программ статистической обработки результатов исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Для пациентов с опухолями толстой кишки независимо от степени злокачественности характерно снижение содержания растворимых форм рецептора PD-1 и его лиганда - PD-L1 в сыворотке крови по сравнению с лицами контрольной группы. Уровни sPD-L1 зависят от пола и возраста пациентов и лиц контрольной группы.
2. Уровни контрольных точек иммунитета - sPD-1 и sPD-L1 не обладают значимостью в качестве маркеров оценки характера выявленной опухоли, но являются значимыми и независимыми факторами прогноза у больных злокачественными опухолями толстой кишки.
3. Уровни экспрессии PD-L1 в клетках опухоли ассоциированы со стадией новообразования. Высокая инфильтрация PD-L1+ клеток стромы опухоли не коррелирует с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Уровни растворимых форм PD-1 и PD-L1 в сыворотке крови не связаны с уровнями экспрессии PD-L1 в первичной опухоли больных колоректальным раком.

Степень достоверности результатов

Достоверность данных, полученных в результате диссертационной работы, подтверждается большим объемом исследований на группе больных с опухолями толстой кишки – 145 человек и группе здоровых лиц. В работе использованы современные лабораторные методы исследования, обладающие приемлемыми аналитическими характеристиками. В процессе выполнения работы соблюдались принципы научной этики. Анализ результатов исследования был проведен с использованием адекватных поставленным задачам статистических методов, а интерпретация полученных

данных обоснована анализом данных 172 источников отечественной и зарубежной литературы. Выводы и практические рекомендации соответствуют поставленным задачам и цели исследования.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на: VII Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2021 г.); IV Всероссийской конференции: «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические исследования (Республика Алтай, Майминский район, с. Майма 2-6 августа 2022 г.); V Всероссийской конференции «Опухолевые маркеры»: молекулярно-генетические и клинические аспекты (Республика Алтай, Майминский район, с. Майма 26-29 июля 2023 г.).

Внедрение результатов работы в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в клиническую практику лаборатории клинико-диагностической централизованного научно-клинического лабораторного отдела консультативно-диагностического центра НИИ клинической онкологии им. академика РАМН и РАН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Материалы диссертации используются на лекционных, семинарских занятиях с курсантами циклов повышения квалификации врачей на кафедре клинической биохимии и лабораторной диагностики ГБОУ ВО Московского университета медицины.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнены все этапы диссертационной работы: провел анализ современной литературы по изучаемой проблеме, лично участвовал в заборе материала и проведении лабораторных исследований у больных первичными новообразованиями толстой кишки, осуществлял статистическую обработку, анализ и интерпретацию

материалов, сформулировал выводы и практические рекомендации, оформил диссертационную работу.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 7 печатных работ, 3 из них в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки)

Структура и объем диссертации

По структуре диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследований», глав «Результатов собственных исследований», обсуждения полученных результатов, выводов практических рекомендаций и указателя цитируемой литературы. Объем диссертации – 123 листов машинописного текста, включает 20 таблиц и 32 рисунка. Указатель литературы содержит 226 источников, из них 41 работа отечественных и 185 зарубежных авторов.

ГЛАВА I.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ (sPD-1, sPD-L1) КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА PD-1/PD-L1 ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ (обзор литературы)

По данным эпидемиологического исследования колоректальный рак (КРР) - занимает четвертое место среди всех злокачественных новообразований [11, 16, 81, 200] и в 2018 году были зарегистрированы примерно 1,5 млн новых случаев КРР в мире.

Большинство больных с КРР имеют весьма скромный прогноз в связи с высокой частотой лекарственной резистентности, метастазирования и рецидивирования. Общей выживаемость составляет около 30 мес [52, 75, 93].

Этиология не известна, патогенез КРР изучен не до конца, но связан с комплексом молекулярных и генетических факторов. Полагают, что трансформация слизистой оболочки поэтапный процесс, ассоциированный с генетическими механизмами, воспалением, нарушением иммунной системы и дисбиозом микробиома, анализ которых является актуальной задачей современной онкологии и лабораторной диагностики [27, 65, 86, 96].

«Контрольные точки иммунитета» (КТИ) считают наиболее перспективным направлением исследований при КРР. Среди КТИ особо выделяют PD-1/PD-L1, которая была открыта одной из первых. Сигнальный путь КТИ PD-1/PD-L1 включает белок программируемой клеточной гибели PD-1 (programmed cell death protein 1) и два лиганда PD-L1, PD-L2 [63, 101, 146, 159, 209]. Ингибиторы КТИ, становятся признанными способами лечения злокачественных опухолей [56, 60, 91, 136, 169, 181]. Лечение ингибиторами КТИ изменило клиническое течение и показатели выживаемости для многих онкологических больных, в том числе и для КРР [25, 30, 35, 119, 179].

Использование современных молекулярно-генетических технологий привело к открытию на клетках опухолей десятки новых молекул (cyclin B1,

p53, WT-1, PSA, HER-2/neu, MUC1), которые могут служить мишенями для CD8⁺ CTL (цитотоксические Т-лимфоциты), CD4⁺ Т-хелперов и антител [14, 31, 83, 91].

Представление о способности клеток опухоли уклоняться от иммунного контроля использовано при разработке таких препаратов как ниволумаб, алектузумаб, ритуксимаб [89, 125, 179]. В связи с этим внимание исследователей направлено на изучение ингибиторов рецепторов Т-клеток: CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 - CD152) [175, 187] и рецептор PD-1 (programmed cell death pathway 1) [36, 171].

По мнению Н.М. Волкова (2018), ингибиторы КТИ произвели в некотором роде революцию в онкологии и показали свою эффективность при различных злокачественных опухолях [4]. Однако современные иммунотерапевтические методы эффективны не у всех онкологических больных, а в некоторых ситуациях они уступают стандартным методам цитостатической терапии.

Появление ингибиторов КТИ принципиально изменили возможности иммунотерапии опухолей. Особо следует отметить адаптивную терапию Т-лимфоцитами с генетически модифицированным химерным антигенным рецептором (CAR) [37]. Сущность этого инжиниринга рецептора – внедрение опухоль-специфического фрагмента и ко-стимулирующих молекул в его структуру, при этом CAR-Т клетки способны генерировать мощную и длительную противоопухолевую реакцию [218]. Подходом к проблеме преодоления приобретенной опухолевой резистентности может служить двойное CAR-таргетирование – совмещение нескольких распознающих опухоль-ассоциированных антигенов [172].

Журнал «Science» в 2013 году назвал прорывом года достижения в области иммунологии опухолей [61], что продвигает исследователей к победе над злокачественными новообразованиями [54]. Следует отметить, что

идентификация неоантигенов – нетривиальная биоинформатическая задача [13, 152].

Настоящий литературный обзор посвящен рецептору PD-1 и его лигандам (PD-L1, PD-L2) при КРР.

1.1. Рецептор PD-1 – один из членов семьи B7/CD28, описан в 1992 году [70, 104], экспрессируется в активированных иммунных клетках [51, 112]. Рецептор кодируется геном *PDCDI* (CD279, PD-1, PD1, SLEB2, hSLE1), который был открыт в 1994 году [185]. PD-1 входит в семейство CD28/CTLA-4 регуляторов Т-клеток [104] и представляет собой мембранный белок I типа длиной 268 аминокислот. Рецептор имеет два лиганда запрограммированной смерти клетки 1 и 2 (PD-L1, PD-L2) [178, 214].

Рецептор PD-1 имеет три домена: внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный. Последний фосфорилирования передает сигнал ингибирующий активацию Т-лимфоцитов [47].

Как было указано выше к рецептору PD-1 на клетках опухоли и TILs экспрессируются два лиганда: PD-L1 [112] и PD-L2 [121].

1.2. Лиганд PD-L1 (CD 247) – гомолог B7-H1 [59] является лигандом рецептора PD-1 [69, 217] и представляет собой трансмембранный белок I типа 290 а.о., содержащий сигнальную последовательность, трансмембранный домен и внутриклеточный домен [224].

1.3. Роль сигнального пути PD-1/PD-L в иммунной системе. Активаторами экспрессии PD-L1 являются IFN- γ , IL-4, IL-10, VEGF. Экспрессия PD-L1 стимулируется следующими путями активации онкогенов: IFN- γ /JAK2/IFN, ALK/STAT3, PI3K и MEK/ERK/STAT1. HIF-1 α резко увеличивает экспрессию PD-L1 в клетках опухолей [70].

У здоровых людей обнаружена сывороточная форма PD-L1 (sPD-L1), основным источником которой считают мембранную форму белка [60]. Также известна внутриклеточная укороченная изоформа PD-L1, но она не может связываться с рецептором PD-1. По данным некоторых авторов sPD-1

и sPD-L1 являются продуктами гидролиза домена мембраносвязанной молекулы. Рассматривается также возможность образования sPD-1 и sPD-L1 в результате сплайсинга мРНК этой молекулы

Молекулярно-биологические свойства рецептора PD-1 и его лигандов PD-L1, PD-L2 приведены в таблице 1 [183].

Известно, что PD-1 экспрессируется недифференцированными CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитами, NK клетками, В-клетками, дендритными клеткам, регулирует активированные Т-клетки, ингибирует пролиферацию В-клеток [183, 196].

Доказано, что сигнальная система PD-1/PD-L функционирует опосредовано – взаимодействием Т-клеточного рецептора и комплекса антигена с главным комплексом гистосовместимости (МНС), а также с участием CD80 (CD86) и CD28. Показано, что активации Т-клеток начинается с «презентации» на поверхности антигенпрезентирующей клетки (АРС) антигена в виде пептида связанного с белком МНС (рисунок 1). Далее комплекс антиген/МНС взаимодействует с участком TCR Т-клетки, последние активируются и начинается пролиферация (этот процесс носит название прайминг).

Как было указано выше, несколько митогенных путей (PD-1, TCR, PI3K, АК, CD28) участвуют в активации Т-клеток (PD-1, TCR, PI3K, АК, CD28) [132]. Следовательно, сигнал от TCR запускает деление Т-клеток. В результате чего, Т-клетки уничтожают антигенпрезентирующие клетки. Большое значение имеет наличие на поверхности антигенпрезентирующей клетки лиганда PD-L1. Активация PD-1 пути реализуется в фосфорилировании тирозинового остатка в ITSM PD-1 и связывании с цитоплазматическим доменом PD-1 [219]. Описанный механизм нуждается в дальнейшем изучении и уточнении деталей [99, 160, 183] (рисунок 1).

Для экспрессии PD-1 необходима активация Т-клетки (таблица 1) [46, 62]. К числу дргих факторов, способствующих экспрессии рецептора

относятся ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT), факторы транскрипции FOXP1 и TBX21 [112, 178], а также метилированная форма промоторной области гена, кодирующего PD-1 [158, 180], а высокая метаболическая активность стимулирует экспрессию рецептора программируемой гибели клетки [48, 157, 177]. Кроме того на экспрессию рецептора влияет взаимодействие TCR/МНС [183]. PD-1 подавляет пролиферацию не только Т-клеток, но аналогичную функцию выполняет в В-клетках [148].

Известно, что транскрипционный фактор FOXA1 и интерфероны (IFN1, IFN2) также регулируют экспрессию PD-L1 [88, 139].

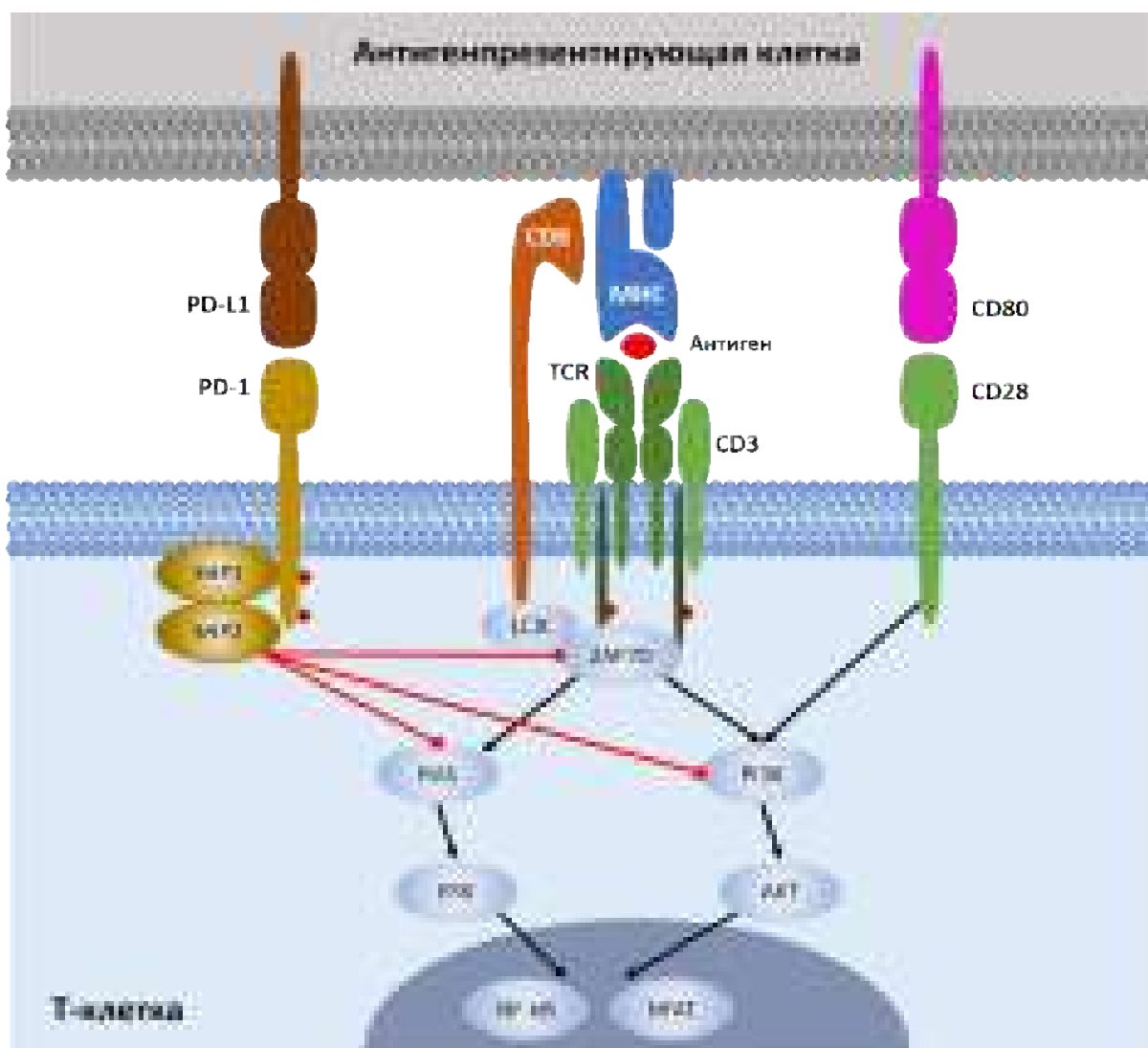


Рисунок 1. Схема активации и супрессии Т-клеток сигнальными путями TCR и PD-1 [адаптировано из [183] А.Н. Sharpe et al., 2018].

Согласно современным представлениям механизма действия сигнального пути PD-1/PD-L1, последний способен активировать апоптоз Т-клеток и подавлять их пролиферацию. Высокий уровень экспрессии PD-L1 подавляет иммунный ответ и обеспечивает механизм «ускользания» клетки опухоли от иммунологического надзора[18, 154, 156] (рисунок 2).

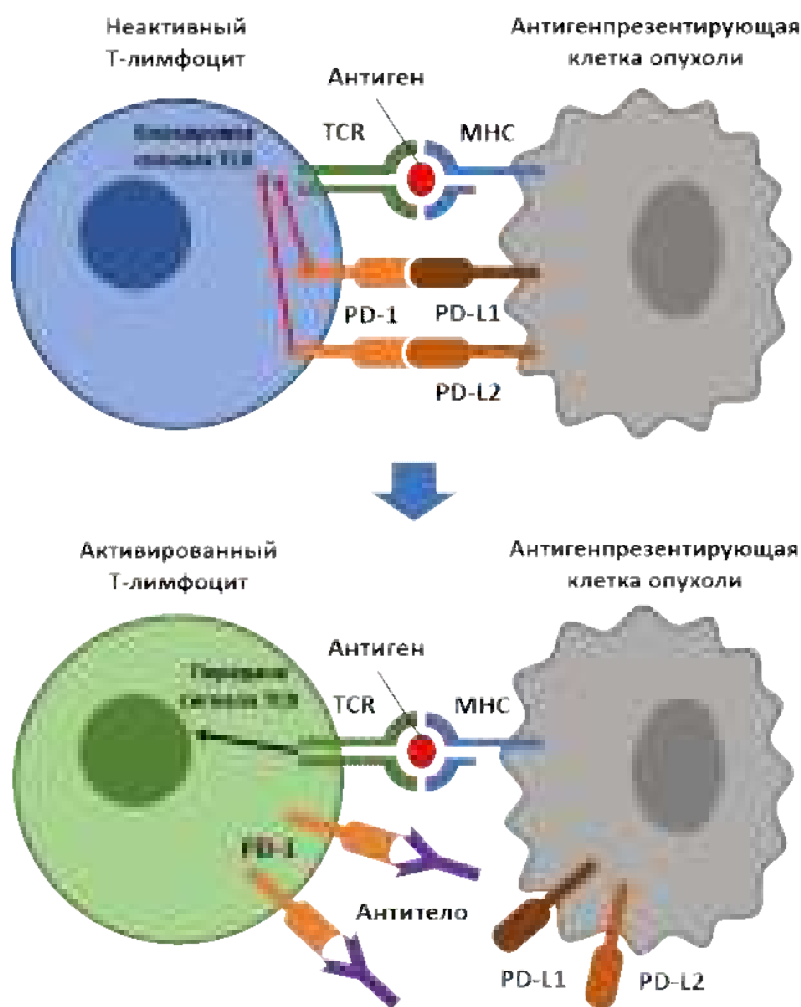


Рисунок 2. Механизм противоопухолевого действия специфичных к PD-1 антител. TCR – рецептор Т-лимфоцитов; МНС – главный комплекс гистосовместимости [29] [Матвеев В.Б., 2017].

1.4. Иммунные маркеры для оценки клинического течения, выбора лекарственной терапии и прогноза опухолей.

Пристальное внимание в клинике онкологических заболеваний уделяется экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках. Однако, одного тестирования лиганда недостаточно и это подтверждает обзор литературы

А.К. Носова и соавт. (2021), в котором авторы уделяют не только факторам противоопухолевого иммунитета, но и мутационной нагрузке, сигнатурам генов, а также микросателитной нестабильности [33].

1.5. Клиническая значимость ключевой точки иммунитета PD-1/PD-L1 у больных КРР.

Основные исследования посвящены ИГХ анализу ключевых компонентов системы PD-1/PD-L1 при КРР. Однако, в литературе представлены работы по анализу экспрессии PD-L1 не только клетками опухоли, но и иммунокомпетентными клетками, инфильтрирующими первичную опухоль и экспрессирующими PD-L1, а также связь выше указанных факторов с учетом фенотипа MSI-H недостаточно хорошо исследована в оценке прогноза КРР [131].

Насколько нам известно, влияние ТС, выражающих PD-L1 о выживаемости пациентов с КРР и ассоциациях между ТС, экспрессирующими PD-L1, или ТПС, экспрессирующими PD-L1 и фенотип MSI-H недостаточно хорошо выяснен, тогда как влияние ТПС, экспрессирующих PD-L1, на выживаемость пациентов с КРР последовательно считается положительным [73, 74, 103, 126-128].

При некоторых типах опухолей экспрессия лиганда PD-L1, выявленная методом ИГХ, оказалась полезной в качестве предикторного (предсказательного) маркера для анти-PD-1 терапии. Однако возможность использования PD-L1 в этой роли при КРР предстоит доказать [133]. Несмотря на то, что была показана связь повышенного количества ТИЛ с лучшим прогнозом КРР, прогностическое значение экспрессии PD-1 на этих лимфоцитах и ее взаимодействие с экспрессией PD-L1 все еще до конца не исследованы. Так, например, авторы выявили высокую экспрессию PD-L1 в опухолевых клетках в 5% (19/394) у больных КРР и увеличение числа PD-1-позитивных ТИЛs - в 19% (76/392) [124]. При этом уровни экспрессии PD-L1 коррелировали с экспрессией PD-1 ($p < 0,001$), а среди опухолей с нарушенной

репарацией неспаренных нуклеотидов доля образцов с повышенной экспрессией PD-L1 и PD-1 была достоверно выше, чем среди опухолей с нормальной репарацией этого дефекта ДНК (18% vs 2% и 50% vs 13% соответственно; $p < 0,001$ в обоих случаях). Окрашивания для обоих маркеров также было более интенсивным в опухолях с нарушенной репарацией неспаренных нуклеотидов. У больных КРР с нарушенной репарацией неспаренных нуклеотидов безрецидивная выживаемость (БРВ) зависела от соотношения экспрессии PD-1/PD-L1: взаимосвязь улучшения БРВ с высокой экспрессией PD-1 на TILs ($p = 0,041$) проявлялась только в тех случаях, когда экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках была снижена ($p = 0,006$). Пациенты, у которых одновременно наблюдали и высокую экспрессию PD-1 на TILs, и высокую экспрессию PD-L1 в опухоли имели статистически значимо худшую БРВ ($p < 0,001$). Данные, представленные L.H. Lee et al. (2016) проливают свет на роль TILs в прогнозе выживаемости различных подгрупп больных КРР с нарушенной репарацией неспаренных нуклеотидов [124].

Некоторые исследователи считают, что экспрессия PD-L1 в опухоли при распространенных формах КРР может служить независимым фактором при выборе иммунотерапии [55, 159, 206].

В ряде работ проводили анализ связи экспрессии PD-L1 и PD-1 в опухоли с клиническим течением, клинико-морфологическими и молекулярно-генетическими характеристиками КРР, а также эффектом таргетной терапии [44, 103]. Выше указанные авторы обнаружили, что точечные мутации, связаны со снижением экспрессии PD-L1 в первичной опухоли и ассоциированы с первичной резистентностью КРР к терапии, направленной на блокаду рецептора PD-1.

Также были получены данные, свидетельствующие о возможности применения таргетной анти-PD-1 терапии после проведения хирургического удаления рака толстой кишки.

M. Elfishawy et al. (2020) выявили достоверную связь между степенью злокачественности опухоли и экспрессией PD-L1 в опухоли, а также связь экспрессии данного лиганда с последующим эффектом таргетной химиотерапии у этой категории пациентов [76].

Другие авторы представили данные, свидетельствующие о возможности использования ИГХ исследования экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и TILs в диагностике КРР [186].

Однако неоднозначные результаты представлены в другой работе [109]. Так, экспрессия PD-L1 у больных КРР не выявлялась как до, так и после химиолучевого лечения, что свидетельствует о необходимости проведения анализа на большем клиническом материале.

Некоторые исследователи пытались изучать прогностическую роль ИГХ определения PD-1 или PD-L1 у больных КРР. Показано, что повышенная экспрессия PD-L1 в опухоли была ассоциирована с более благоприятным прогнозом заболевания на фоне химиолучевого лечения в комплексе с таргетной терапией [130, 147], а экспрессия PD-L1 и PD-1 в стромальных клетках КРР ассоциирована с менее агрессивным поведением опухоли [213].

H.L. Ho et al. (2019) выявили, что экспрессия PD-L1 может служить маркером неблагоприятного прогноза КРР, тогда как экспрессия PD-1 в опухоли – наоборот, как благоприятный прогностический фактор [97].

На основании выше указанного система PD-1/PD-L1 имеет значение в прогнозе КРР, однако ее связь с течением и терапевтической тактикой требует дальнейшего изучения [124, 223].

N. Shiraliyeva et al. (2017) с наследственным не полипозным КРР убедительно показали экспрессию PD-L1 в опухолевом эпителии и иммунных клетках у пациентов с наследственным не полипозным КРР, однако клиническая значимость определения статуса PD-L1 у данной категории больных требует продолжения исследования [186].

В последние годы активно исследуют связь системы PD-1/PD-L1 с молекулярно-генетическими характеристиками опухолей толстой кишки. Исследователи изучали связь уровня экспрессии PD-1 с гиперметилированием генов [176], а также микросателлитной нестабильностью при КРР [114, 135]. Считается, что генетические и эпигенетические изменения, хроническое воспаление и дисбиоз кишечной микробиоты приводит к возникновению КРР и является частью его патогенеза [80, 105, 120, 149, 150]. Так, накопительный 5-летний риск выявления воспалительного заболевания кишечника составляет 33%-54% [106-108]. Другие исследователи считают, что риск КРР при воспалительных процессах в толстой кишке увеличивается в несколько раз. При этом, его может ускорить хромосомные нарушения и изменение кишечной микробиоты [79, 117, 120]. Некоторые исследователи считают, что дисбактериоз микробиоты кишечника тесно связан с патогенезом колит-ассоциированного КРР [53, 102] и ответом на лечение ИКТ [165, 189, 211].

Подводя итог выше указанного следует отметить, что CTLA-4, PD-1, PD-L1, а также ряд цитокинов TGF- β [153], IL-10 [190], IL-17 [167], IL-6 играют непосредственную роль в отрицательной регуляции опухолевого иммунитета [145].

В регуляции противоопухолевого иммунитета особую роль играют семейства транскрипционных факторов Forkhead box O (FOXO). При раке (FOXO) могут действовать как репрессоры опухоли, в то же время, поддерживая раковые стволовые клетки [67]. FOXOs стимулируют противоопухолевую активность посредством негативного регулирования экспрессии иммуносупрессивных белков, таких как PD-L1 и VEGF в опухолевых или стромальных клетках, которые могут формировать иммунотолерантное состояние в микроокружении опухоли. Кроме того, FOXO также контролируют гомеостаз и развитие иммунных клеток, включая Т-клетки, В-клетки, естественные киллеры, макрофаги.

Данные о клинико-патологической значимости экспрессии PD-L1 были получены J.S. Puro et al. (2020) в 265 образцах КРР [166]. Авторы выявили, что PD-L1 экспрессирован у 25 (9,4%) и 41 (17,7%) пациента в опухолях и иммунных клетках соответственно, при этом экспрессия лиганда в иммунных клетках (I-PD-L1) достоверно коррелировала с меньшей инвазией метастазов в лимфоузлы, отдаленными метастазами и более низкими стадиями pT и pTNM. Дополнительно, наблюдали значительную корреляцию между экспрессией PD-L1 в опухолевых клетках (T-PD-L1) и локализацией опухоли (справые отделы толстой кишки), но не с другими клинико-патологическими характеристиками. Экспрессия pFOXO1 была значительно ниже у больных КРР с высокой экспрессией I-PD-L1, чем в КРР с низкой или отрицательной экспрессией I-PD-L1. Однако не было значимой корреляции между экспрессией pFOXO1 и T-PD-L1 в КРР. Авторы отметили худшие показатели выживаемости среди больных КРР с положительной экспрессией транскрипционного фактора pFOXO1 и низкой или отрицательной экспрессией I-PD-L1 [166]. Таким образом, данное исследование показало, что экспрессия I-PD-L1 значительно коррелирована с благоприятным биологическим поведением опухоли и лучшей выживаемостью. Кроме того, пациенты с высокой экспрессией I-PD-L1 и низкой pFOXO1 имели благоприятный прогноз, чем с другими паттернами экспрессии I-PD-L1 и pFOXO1 [166].

В работе T. Enkhbat et al. (2018) с помощью ИГХ метода изучена клиническая значимость экспрессии PD-1 и PD-L1 в первичной опухоли и проанализировать взаимосвязи между экспрессией PD-1, PD-L1, трансформирующим фактором роста- β (TGF- β) и транскрипционным фактором Forkhead box P3 (Foxp3) у 116 больных КРР II-III стадий после колэктомии [77]. Следует отметить, что Foxp3 является основным стимулятором регуляции Foxp3 Т-клеток (CD4+CD25+), которые подавляют противоопухолевый иммунный ответ [84, 184]. T. Enkhbat et al. (2018)

выявили, что экспрессия PD-1 коррелировала с экспрессией PD-L1, TGF- β и Foxp3 [77]. При этом общая выживаемость была значительно ниже в PD-1 и PD-L1-позитивных опухолях больных КРР. Многофакторный анализ выявил, что PD-L1-позитивный КРР следует считать независимый фактором риска. Авторы полагают, что выражения экспрессия PD-1 и PD-L1 были связаны с плохим прогнозом у больных КРР и коррелировали с выраженной экспрессией TGF- β и Foxp3 в опухоли.

Полагают, что основными факторами усиления иммунных контрольных точек (IC) в микроокружении опухоли (TME) могут быть изменения в структуре метилирования ДНК и обогащение метилированных меток гистонов в промоторных областях. В определенной степени это подтвердили исследования V. Sasidharan Nair et al. (2018), которые оценили с помощью qRT-PCR относительную экспрессию различных иммунных контрольных точек и лигандов в нормальных тканях толстой кишки и в КРР [176]. Это исследование показало, что как гипометилирование ДНК, так и репрессивные гистоны H3K9me3 и H3K27me3 участвуют в повышающей регуляции генов CTLA-4 и TIGIT. Однако репрессивные гистоны, но не гипометилирование ДНК, участвуют в повышающей регуляции генов PD-1 и TIM-3 в опухоли при КРР.

Известно, что STING (стимулятор генов интерферона) опосредует цитозольные ДНК-индуцированные сигнальные события и вовлечен в качестве медиатора процессов в иммунотерапии рака. Экзогенная или эндогенная ДНК может приводить к димеризации STING, активации Tank-связывающей киназы 1 (TBK1), активации регуляторного фактора интерферона 3 (регуляторный фактор 3 интерферона, IRF3) и ядерного фактора каппа В (киназа ядерного фактора каппа-В, NF- κ B) и, в конечном итоге, генерации интерферона (IFN) [94, 161]. IFN широко используют при лечении рака, поскольку регулирует иммунную функцию и, следовательно, ингибирует пролиферацию опухолевых клеток. Недавние исследования

показали, что IFN может индуцировать экспрессию PD-L1 при раке яичников и раке желудка [42, 139]. Обнаружено, что подавление STING может снизить индуцируемую цисплатином активацию PD-L1 при РМЖ [155], более того, сигнальный путь STING необходим для противоопухолевой эффективности блокады антител против PD-L1 [205]. G. Zhong et al. (2018) изучили экспрессию PD-L1 и STING в 87 опухолях и соответственно неизменной ткани толстой кишки у больных КРР и сравнили клинико-морфологические особенности заболевания и ее связи с прогнозом, что может дать некоторое представление об иммунотерапии колоректального рака в ближайшем будущем [223]. G. Zhong et al. (2018) выявили статистически значимое различие в экспрессии PD-L1 в опухоли и непораженной ткани толстой кишки соответственно 79,3% и 42,5% ($p < 0,05$) [223]. При этом, положительная экспрессия PD-L1 в опухоли не была связана с возрастом, полом, размером опухоли, дифференцировкой, клинической стадией TNM или глубиной инвазии ($p > 0,05$). Коэффициент положительной экспрессии STING в опухоли и соответствующей непораженной ткани толстой кишки составил 9,2% и 40,2% соответственно ($p < 0,05$). При этом, положительный уровень экспрессии STING в опухоли коррелировал с ее дифференцировкой, полом и возрастом ($p < 0,05$), но не был связан с размером опухоли, глубиной инвазии и клинической стадией TNM ($p > 0,05$). В отличие от STING ($p = 0,784$), выявлена статистическая значимая связь скорости экспрессии PD-L1 с прогнозом КРР ($p = 0,018$). В четырех независимых группах (группа PD-L1+/STING+, группа PD-L1-/STING-, группа PD-L1-STING+, группа PD-L1+/STING-) существенные различия в 5-летней выживаемости ($p = 0,047 < 0,05$), 5-летняя выживаемость в группе PD-L1-/STING+ была значительно выше, чем в других трех группах пациентов. В STING+ группе прогноз по группе PD-L1+/STING+ был хуже, чем в группе PD-L1-/STING+. В STING-отрицательной группе PD-L1-/STING- группа имела более высокую выживаемость, чем PD-L1+/STING- группа. Авторы полагают, что PD-L1

может способствовать возникновению заболевания, а STING может играть важную роль в противоопухолевом иммунитете, в отличие от STING экспрессия PD-L1 связана с прогнозом КРР. Кроме того, показатель выживаемости больных КРР был выше у пациентов с отрицательной экспрессией PD-L1 или положительной экспрессией STING. Когда экспрессия PD-L1 была отрицательной, а экспрессия STING была положительной, 5-летняя выживаемость пациентов с КРР была самой высокой.

Повышение эффективности химиотерапии КРР связывают с одновременным использованием ингибиторов КТИ, однако механизмы, с помощью которых химиопрепараты могут взаимодействовать с этими точками остаются неясными. Так, исследователи комбинация 5-фторурацил + оксалиплатин (схема FOLFOX) полностью излечивала опухоли у экспериментальных животных в сочетании с анти-PD-1, тогда как каждая схема монотерапии была не эффективной. Этот синергетический эффект связан с способностью препаратов схемы FOLFOX индуцировать инфильтрацию опухоли активированными Т-клетками PD-1 + CD8 в зависимости от T-bet. У больных КРР, получавших лечение по схеме FOLFOX, наблюдалась также индукция экспрессии PD-L1 и высокая инфильтрация CD8 Т-клеток в опухоли.

Известно, что отношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR) связано с исходами у пациентов с онкологическими заболеваниями. В исследовании K. Muneoka et al. (2018) оценили изменения уровней NLR и sPD-L1 у пациентов с метастатическим КРР и высказали предположение, что изменения уровней NLR и sPD-L1 во время химиотерапии могут иметь уникальную прогностическую ценность у пациентов с КРР, получавших химиотерапию [141].

H.L. Ho et al. (2019) изучили ассоциации между экспрессией PD-L1 на опухолевых клетках (TCs), инфильтрирующих опухоль иммунных клетках

(ТПС) с учетом состояния микросателлитной нестабильности (MSI) у 238 больных КРР [97] и выявили, что экспрессия PD-L1 действовала как маркер плохого прогноза; напротив, ТПС, экспрессирующие PD-L1, действовали как маркер хорошего прогноза. Более того, фенотип MSI-H был связано с наличием ТПС, экспрессирующих PD-L1, но не ТС, экспрессирующих PD-L1.

Как было указано выше, использование ингибиторов КТИ началось более 10 лет назад и первым препаратом, показавшим увеличение выживаемости больных диссеминированной меланомой было антитело к CTLA-4 – ипилимумаб. Однако эффекты от лечения получены только у 10,9% больных, хотя некоторые из них (около 20%) жили годами [98]. Вскоре, пристальное внимание исследователей привлек белок PD-1, который экспрессируется на активированных эффекторных Т-лимфоцитах. Убедительно доказано, что его взаимодействие с лигандами (PD-L1, PD-L2) активирует апоптоз Т-лимфоциты [69, 112]. В 2012 году появились первые ингибиторы PD-1 и PD-L1 и среди них ниволумаб [199], которые показали высокие уровни выживаемости у леченных больных, причем 40% пациентов были живы более 3-х лет [192]. Ингибиторы КТИ оказались эффективными при меланоме, почечно-клеточном раке, раке мочевого пузыря, желудка, печени, лимфоме Ходжкина [226]. Однако эффективность этих препаратов оказалась разной: 30-40% - при меланоме, 70% - при лимфоме Ходжкина, 20% - при других опухолях [215], а при РМЖ, КРР, раке яичников, поджелудочной железе лечение в монорежиме оказалось малоэффективным.

Одним из основных этапов в механизме действия ингибиторов КТИ считают присутствие в опухоли активированных Т-лимфоцитов, способных специфически распознавать антигены, отличающие злокачественные клетки от нормальных [58]. По типу инфильтрации опухолей Т-лимфоцитами R.S. Herbst et al. (2014) пытались выделить следующие профили новообразований: 1) «иммунно-инфильтративный фенотип» (опухоль инфильтрирована CD4+ и

CD8+ Т-лимфоцитами); 2) «иммунно-вытесняющий фенотип» (иммунные клетки присутствуют не в самой опухоли, а в ее окружении); 3) «иммунно-пустынный фенотип», при котором инфильтрация иммунными клетками опухоли отсутствует [95]. Оказалось, что эффекты ингибиторов КТИ наиболее вероятны при иммунно-инфильтративном фенотипе [4], а при отсутствии иммунных клеток в окружении опухоли, указывает на ее нечувствительность к ингибиторам КТИ [95, 216]. Стало быть, противоопухолевый эффект антител против PD-1 прежде всего связан с активацией клонов Т-лимфоцитов, существовавших в опухоли и распознающих эти антигены [90]. Однако, пока нет однозначного ответа – являются ли все опухоли потенциально иммуногенными. По данным A. Snyder et al. (2014) клиническая эффективность анти-CTLA-4 антител (ипилимумаб, тремелимумаб) положительно коррелировала с мутационной нагрузкой [188].

На основании анализа данных литературы обосновано заключение о том, что не все опухоли иммуногенны. Тем не менее, в настоящее время ингибиторы КТИ как по эффективности, так и по переносимости показали свое преимущество перед стандартными методами [215]. Однако, проблема о предиктивных маркерах эффективности иммунотерапии по-прежнему не решена, а высокая экспрессия PD-L1 в опухоли не гарантирует ответа [156]. Остается также открытым вопрос об увеличении скорости роста опухоли у ряда больных после начала иммунотерапии [57, 82, 173], особенно о предикторах гиперпрогрессирования. Некоторые авторы связывают повышенный риск этого явления с амплификацией гена *MMD2* [111].

1.6. Факторы, влияющие на экспрессию PD-L1.

Эффект иммунотерапии на систему PD-1/PD-L1 прежде всего зависит от препарата и типа опухоли, не стандартизованного метода ИГХ оценки экспрессии PD-L1 в опухоли, а также данных интерпретации полученных результатов [198]. Все выше указанные факторы могут влиять на показатели

экспрессии PD-L1. Кроме того, на результаты экспрессии PD-L1 влияют гетерогенность опухоли, используемые в лечении ингибиторы тирозин-киназ, подавляющих активность EGFR, ALK, VEGF [85], степень выраженности инфильтрации опухоли клетками иммунной системы, экспрессирующих PD-L1 [50], возможность цитоплазматической экспрессии PD-L1, что приводит к ложно положительным результатам [168], используемых эпитопов антител [198], наличие генетических мутаций в генах *PTEN*, *ALK*, *LKB1*, которые могут оказаться причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов при ИГХ исследовании PD-L [134], при нарушении системы репарации неспаренных оснований (МСН) [123], при инфильтрации опухоли Т-киллерами типа CD8+ [123, 202], а также поиск новых биомаркеров эффективности иммунотерапии помимо экспрессии PD-L1 [222].

В связи с выше указанным, все больше исследователей привлекает анализ уровня sPD-1 и sPD-L в крови при разных онкологических заболеваниях, в том числе и КРР, и это направление продолжает активно развиваться [113, 141, 195, 197]. Интерес исследователей к s-формам sPD-1 и sPD-L1 не случаен, а связан с тем, возможно, что эти белки могут служить факторами при выделении группы пациентов, опухоли которых чувствительны для проведения иммунотерапии, а также оценить их роль в прогнозе заболевания и самое важное то, что анализ sPD-1 и sPD-L1 можно проводить многократно в динамике малоинвазивными ИФА методами в крови. В настоящее время уже многие авторы отметили противоречивость результатов ИГХ экспрессии PD-L1 в оценке эффективности анти-PD-1/PD-L1 терапии у больных КРР, а также экспрессии лиганда от распространенности опухолевого процесса [64, 72], биологических особенностей опухоли, наличия мутаций генов *BRCA1/2* и *TP53* [191, 212] и микросателлитной нестабильности, которые могут служить показателями чувствительности к ингибиторам КТИ [100], а стало быть выступать предикторами эффективности анти-PD-1/PD-L иммунотерапии [220]. Кроме

того, в не все авторы не выявили связь экспрессии PD-L1 с показателями общей выживаемости онкологических больных [138, 140]. Ряд исследователей указали на неблагоприятное значение КТИ PD-1/PD-L1 в клиническом течении НМРЛ, меланомы, РМЖ, рака почки, нейроэндокринных опухолей, лимфомы Ходжкина, рака яичников [72, 208, 224]. Поэтому клиническая роль sPD-1 и sPD-L1 при вышеуказанных нозологических формах опухолей, в том числе и КРР, требует дальнейшего изучения [15, 92], анализ их связи с ангиогенными факторами [10], протеолитическими системами [21], генетическими нарушениями [122, 212], лучевой [66, 182], комбинированной иммуно-химиотерапией [204] и комбинированной иммунолучевой терапией [142].

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.2. Характеристика обследованных больных новообразованиями толстой кишки и здоровых доноров.

В исследование включено 160 больных опухолями толстой кишки (из них 15 с доброкачественными новообразованиями и 145 с колоректальным раком - КРР) и 52 практически здоровых донора (25 мужчин и 27 женщин), составивших группу контроля (рисунок 3).

У всех больных клинико-рентгенологический диагноз «рака толстой кишки» подтвержден данными гистологического исследования удаленной хирургическим методом опухоли и регионарных метастазов, согласно Международной гистологической классификации опухолей желудочно-кишечного тракта (ВОЗ, 2021).

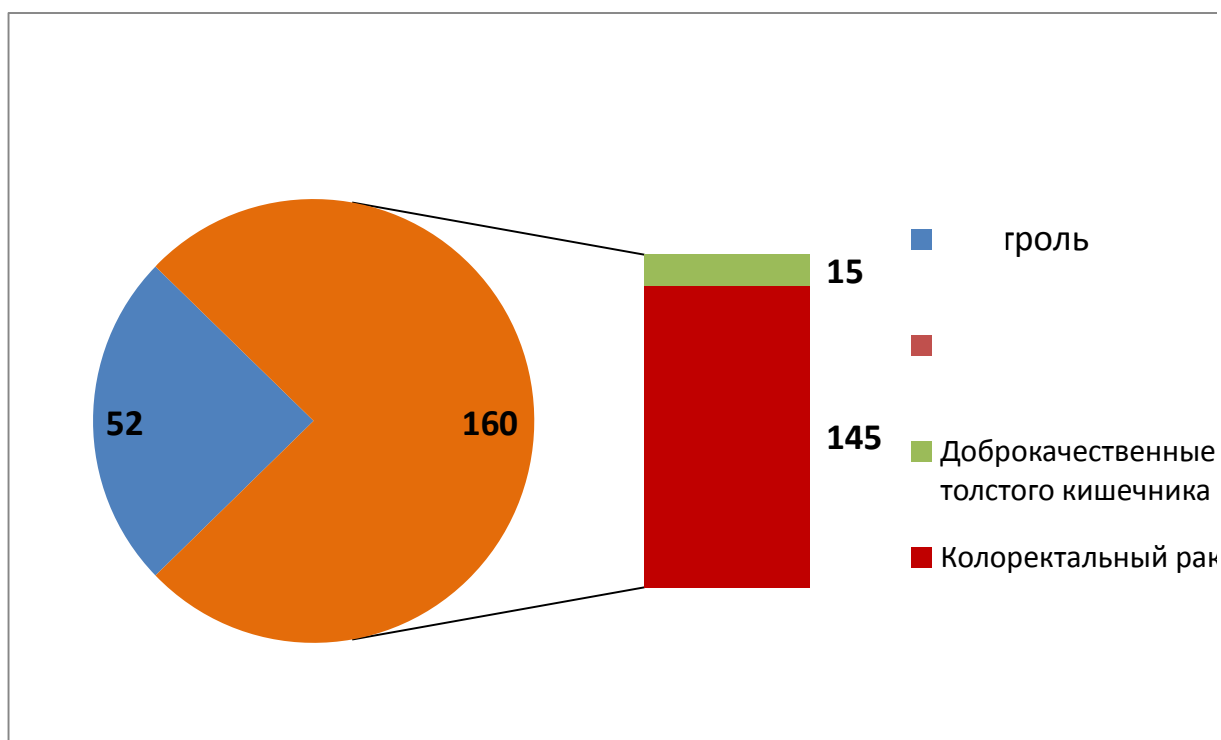


Рисунок 3. Распределение обследованных доноров и больных новообразованиями толстой кишки по группам.

В таблице 1 представлено распределение групп обследованных здоровых доноров, больных доброкачественными и злокачественными новообразованиями толстой кишки с учетом их пола и возраста.

Таблица 1.

Распределение обследованных здоровых доноров и больных опухолями толстой кишки по полу и возрасту

Группы	Число наблюдений	Возраст, лет		Пол	
		М±m	Пределы	Мужской	Женский
Контроль	52	36,6±2,4	19-82	25 (48,1%)	27 (51,9%)
Больные опухолями толстой кишки	160	64,0±0,9	27-85	83 (51,9%)	77 (48,1%)
p		p<0,0000001		p>0,05	

На рисунке 4 представлено распределение больных опухолями толстой кишки по возрасту. Из них 7/4,4% больных были в возрасте до 40 лет, 7/4,4% – в возрасте от 40 до 49 лет, 41/25,6% – в возрасте от 50 до 59 лет, 59/36,8% – в возрасте 60-69 лет, 36/22,5% – в возрасте 70-79 лет, 10/6,3% – в возрасте от 80 лет и старше.

Следует отметить, что в обеих группах больных преобладали пациенты старше 60 лет (66,7% в группе больных доброкачественными опухолями толстой кишки и 69,7% в группе больных КРР).

Частота распределения больных с учетом их пола в группе больных КРР была сопоставимой (54,5% - мужского пола и 45,5% женского). Средний возраст пациентов с КРР мужчин составил 65,5±1,1 лет, женщин – 62,9±1,5 лет, различия статистически незначимы (p>0,05) (таблица 2).

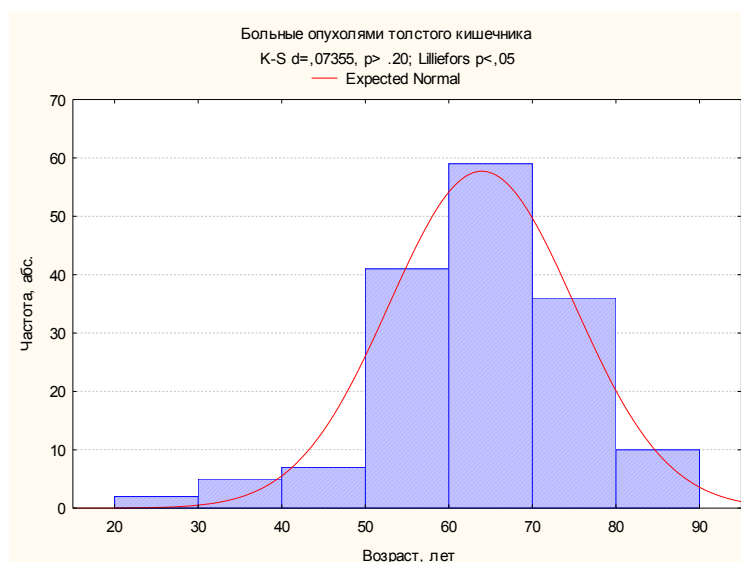


Рисунок 4. Распределение больных опухолями толстой кишки по возрасту.

Таблица 2.

Распределение обследованных больных опухолями толстой кишки основных групп по полу и возрасту

Группы	N	Возраст, лет		Пол	
		М±m	Пределы	Мужской	Женский
Доброкачественные опухоли толстой кишки	15 (10,5%)	60,4±2,2	39-72	4 (26,7%)	11 (73,3%)
Колоректальный рак	145 (77,4%)	64,3±0,9	27-85	79 (54,5%)	66 (45,5%)
p		>0,05		<0,05	

В таблице 3 представлены данные по распределению больных новообразованиями толстой кишки в зависимости от гистологического строения опухоли. У больных доброкачественными новообразованиями толстой кишки преобладала тубулярная аденома (60%). Больные КРР были представлены аденокарциномой.

Таблица 3.

Распределение обследованных больных опухолями толстого кишечника с учетом гистологического строения опухоли

Обследованные группы	Гистологическое строение новообразования	Частота	
		Абс.	(%)
Доброкачественные новообразования толстой кишки (n=15)	Тубулярная аденома	9	60,0
	Зубчатая аденома	1	6,7
	Тубуло-ворсинчатая аденома	5	33,3
Колоректальный рак (n=145)	Аденокарцинома	145	100

В таблице 4 представлено распределение больных с учетом локализации опухоли в толстой кишке. Преобладали пациенты с опухолями прямой кишки (n=70/43,8%) и сигмовидной кишки (n=39/24,4%).

Таблица 4.

Распределение обследованных больных опухолями толстой кишки основных групп с учетом их локализации

Локализация опухоли	Частота	
	Абс.	(%)
Сигмовидная ободочная кишка	39	24,4%
Поперечная ободочная кишка	4	2,5%
Прямая кишка	70	43,8%
Слепая кишка	8	5,0%
Селезеночный изгиб ободочной кишки	5	3,1%
Ректосигмоидный отдел ободочной кишки	4	2,5%
Нисходящий отдел ободочной кишки	4	2,5%
Печеночный изгиб ободочной кишки	4	2,5%
Восходящая ободочная кишка	15	9,4%
Ректосигмоидный отдел толстой кишки	6	3,7%
Колоректальный рак	1	0,6%

В группе доброкачественных опухолей у 6 пациентов опухоль локализовалась в сигмовидной кишке, у 5 – в прямой кишке, у 2 – в поперечном отделе ободочной кишки, по 1 наблюдению опухоль локализовалась в селезеночном изгибе и восходящем отделе ободочной кишки.

На рисунке 5 представлено распределение больных КРР с учетом критериев системы TNM. Преобладали пациенты с распространенностью Т3 (57,9%). У 62 (42,8%) больных выявлены метастазы в региональных лимфоузлах, у 23 (15,9%) обнаружены отдаленные метастазы (рисунок 5).

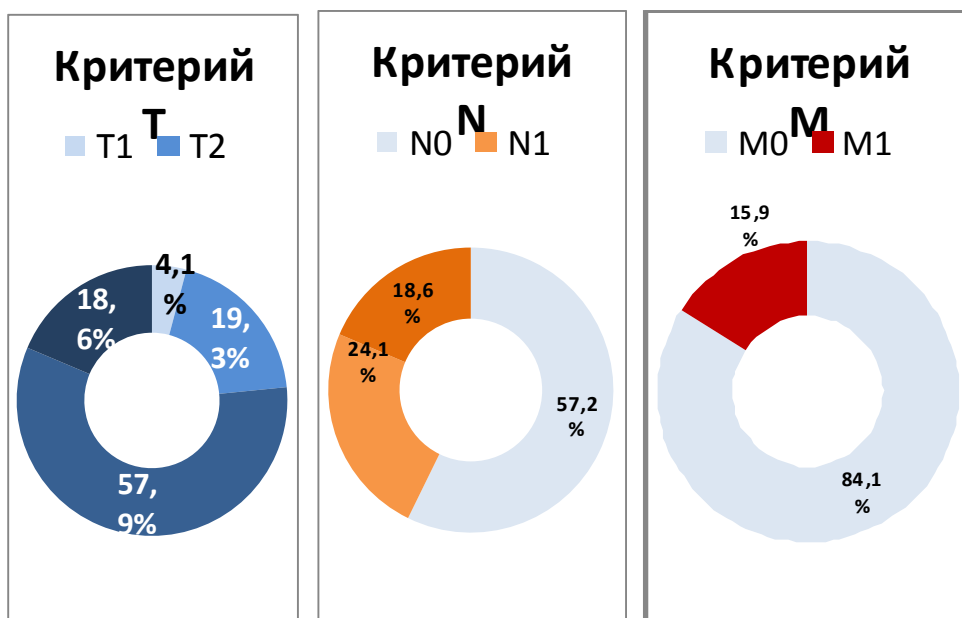


Рисунок 5. Распределение больных колоректальным раком по критериям системы TNM.

При этом только у 6 больных КРР выявлено наиболее благоприятное сочетание критериев T1N0M0 (4,1%). Преобладали пациенты с T3N0M0 (n=44/30,3%) и T2N0M0 (n=23/15,9%) (таблица 5).

Таблица 5.

Распределение обследованных больных колоректальным раком с учетом стадии заболевания согласно системе TNM

Критерии TNM	Частота, абс.	Частота, отн.
T1N0M0	6	4,1%
T2N0M0	23	15,9%
T2N0M1	1	0,7%
T2N1M0	4	2,8%
T3N0M0	44	30,3%
T3N0M1	5	3,4%
T3N1M0	13	9,0%
T3N1M1	8	5,5%
T4N0M0	3	2,1%
T4N0M1	1	0,7%
T4N1M0	9	6,2%
T4N1M1	1	0,7%
T4N2M0	10	6,9%
T4N2M1	3	2,1%

На рисунке 6 более наглядно представлено распределение больных КРР по стадиям опухолевого процесса. Преобладали пациенты с IIa стадией (31,7%).

Отдаленные метастазы чаще локализовались в печени – 19 из 23 наблюдений (82,6%), еще у двух пациентов метастазы были выявлены одновременно в печени и легких, еще у двух – только в легких.

В таблице 6 представлено распределение больных КРР в зависимости от степени дифференцировки опухоли. Преобладали больные с умеренной степенью дифференцировки G-2 новообразования (74,5%).

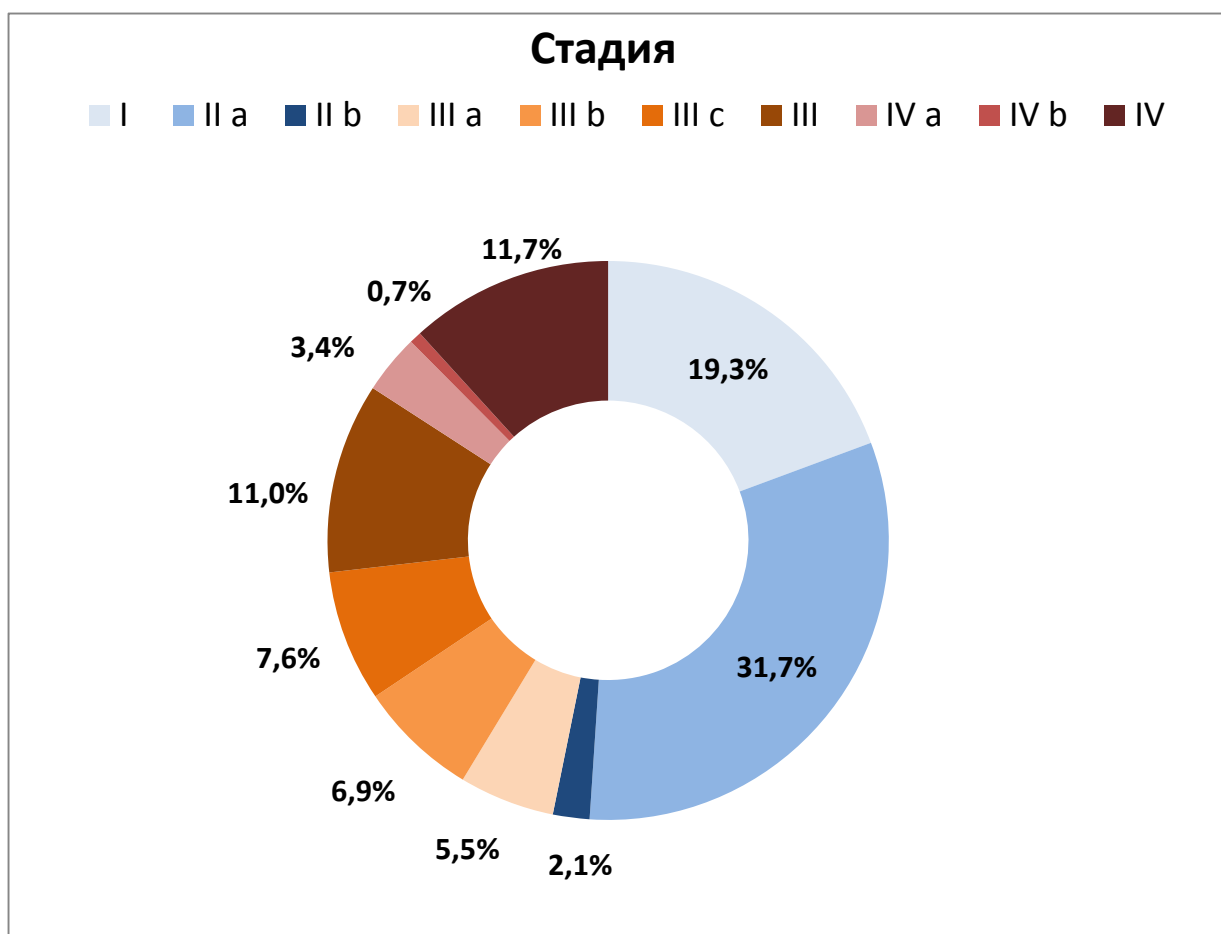


Рисунок 6. Распределение больных колоректальным раком с учетом стадии заболевания.

Таблица 6.

Распределение больных колоректальным раком с учетом степени дифференцировки опухоли

Степень дифференцировки опухоли		
Частота (абс., отн.)		
G-1	G-2	G-3
29	108	8
20,0%	74,5%	5,5%

В таблице 7 представлено распределение обследованных больных КРР с учетом критериев системы TNM и степени дифференцировки опухоли.

Таблица 7.

Распределение больных колоректальным раком с учетом критериев системы TNM и степени дифференцировки опухоли

Критерии TNM	N	G-1	G-2	G-3	P
T1	6	4 (66,7%)	3 (33,3%)	-	0,03
T2	28	6 (21,4%)	20 (71,4%)	2 (7,1%)	
T3	84	17 (20,2%)	81 (72,6%)	6 (7,1%)	
T4	27	2 (7,4%)	25 (92,6%)	-	
N0	83	16 (19,2%)	61 (73,5%)	6 (7,2%)	>0,05
N1	35	9 (25,7%)	25 (71,4%)	1 (2,9%)	
N2	27	4 (14,8%)	22 (81,5%)	1 (3,7%)	
M0	122	24 (19,7%)	91 (74,6%)	7 (5,7%)	>0,05
M1	23	5 (21,7%)	17 (73,9%)	1 (4,4%)	

В группе больных КРР с распространенностью T1 частота выявления опухолей с высокой степенью дифференцировки новообразования G-1 была наибольшей и составила 66,7%, но снижалась до 21,4%-20,2% в группах больных с распространенностью T2-T3 и была наименьшей в группе пациентов с распространенностью T4 (7,4%) ($p=0,03$). В то же время критерии N и M не были связаны со степенью дифференцировки КРР.

Лечение. У 114 больных КРР выполнено хирургическое удаление опухоли, 32 пациентам провели химиотерапию, 1 больному - лучевое лечение. Неoadьювантную химиотерапию получали 32 больных КРР.

У всех 15 больных доброкачественными новообразованиями толстой кишки выполнено хирургическое удаление опухоли.

2.2. Специальные лабораторные методы исследования.

Концентрации sPD-1 и sPD-L1 определяли в образцах сыворотки крови здоровых доноров (группа контроля), больных доброкачественными и злокачественными опухолями толстой кишки (колоректальный рак) до начала специфического лечения.

Метод исследования растворимых форм sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови

Пробы крови для определения концентрации sPD-L1 и sPD-1 забирали утром натощак из кубитальной вены с 8.00 до 9.00 в сухие пробирки и центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин, разливали на 3-4 аликвоты объемом 300-400 мкл в пластиковые пробирки и хранили при -40° С до проведения иммуноферментного анализа.

Использовали наборы для прямого иммуноферментного анализа «Human PD-L1 Platinum ELISA» и «Human PD-1 ELISA kit» (Affimetrix, eBioscience, США).

Принцип метода. Для начала исследования необходимо подготовить реактивы, требующие разведения (моющий буфер - Wash Buffer, калибровочные стандарты). Отмыть микропланшету 2 раза моющим раствором. Biotin-Conjugate и Streptavidin-HRP готовятся непосредственно перед использованием. Диапазон концентраций калибровочных растворов представлен в таблице 8.

Таблица 8.

Диапазон концентраций калибровочных стандартов

Исследуемые белки	Диапазон	Количество калибровочных стандартов
sPD-L1	От 0 пг/мл до 300 пг/мл	8
sPD-1	От 0 пг/мл до 150 пг/мл	8

Методика определения sPD-1 и sPD-L1 практически одинаковая, за исключением небольших этапов.

Принцип метода состоит в связывании определяемого белка со специфическими антителами, адсорбированными на поверхности лунок микропланшет. Детекцию результата после развития цветной реакции вследствие связывания специфического антитела с пероксидазой хрена проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Измеряли оптическую плотность при 450 нм с коррекцией при 620 нм. Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг) на 1 мл сыворотки крови.

Иммуногистохимический анализ экспрессии PD-L1 в образцах колоректального рака

Оценку уровня экспрессии PD-L1 в опухолях проводили методом иммуногистохимии (ИГХ) по стандартной методике с использованием антител к PD-L1 (клон 4E12; Р-Фарм, Россия). Экспрессию PD-L1 оценивали в опухолевых клетках и окружающей строме. В зависимости от экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках образцы разделены на 2 группы: с наличием и отсутствием экспрессии. При оценке стромы образцы опухолей разделили на 3 группы с учетом количества PD-L1+ клеток: 0 – отсутствие PD-L1+ клеток, 1 – низкое содержание PD-L1+ клеток, 2 – высокое содержание PD-L1+ клеток.

2.3. Статистические методы анализа.

В результате работы была сформирована база данных, содержащая показатели лабораторных и клинических исследований.

Для анализа данных использовали персональный компьютер с операционной системой Windows 7 и прикладными программными пакетами Statistica 7.0, MS Office XP: MS Word и MS Excel.

Проверку нормальности распределения проводили двумя методами: графическим (с помощью построения «графиков нормального

распределения»), математическим (с помощью вычисления статистик Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса и Шапиро-Уилке) [34]. Средние выборочные значения количественных признаков приведены в тексте в виде: нижний квартиль (25% выборки) – медиана – верхний квартиль (75% выборки). Были проведены однофакторный и многофакторный дисперсионный анализы [28].

Статистическую значимость различий показателей оценивали с помощью непараметрических критериев – медианного, Колмогорова-Смирнова, Mann-Whitney. Статистическую значимость различий частот в изучаемых признаках оценивали с помощью критерия χ^2 , для малых выборок рассчитывали непараметрический точный критерий Фишера. Меру линейной связи оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона, коэффициента корреляции рангов Spearman. Принимали критический уровень статистической значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА III.

СОДЕРЖАНИЕ sPD-1 и sPD-L1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ, БОЛЬНЫХ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Концентрации sPD-1 и sPD-L1 изучали в 3 группах – в контроле, у больных доброкачественными опухолями толстой кишки и в группе больных колоректальным раком.

3.1. Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров, больных доброкачественными новообразованиями толстой кишки и колоректальным раком

Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в контроле у здоровых доноров, у больных доброкачественными и злокачественными опухолями толстой кишки представлены в таблице 9.

Таблица 9.

Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров,
больных доброкачественными опухолями толстой кишки и КРР

Группа	N	sPD-L1, пг/мл		sPD-1, пг/мл	
		Пределы; 95% ДИ	Медиана; квартили	Пределы; 95% ДИ	Медиана; квартили
Контроль ⁰	52	0,28-56,6; 10,1-15,7	9,2; 6,7-17,4	11,4-138; 47,7-60,2	51,9; 39,1-61,9
Опухоли толстой кишки (общая группа) ¹	160	0,3-32,8; 4,3-17,4	8,3; 6,4-10,4	9,5-287; 19,0-91,7	37,0; 29,7-51,0
Mann-Whitney U test		p0vs1=0,023		p0vs1=0,00006	
Доброкачественные новообразования толстой кишки ¹¹	15	0,3-12,0; 0,3-11,9	8,1; 6,3-9,7	19,0-58,3 18,9-55,0	32,8; 27,9-46,9
Колоректальный рак ¹²	145	1,9-32,8; 4,4-17,8	8,3; 6,4-10,4	9,5-287; 19,1-86,5	38,0; 29,9-51,6
P		Kruskal-Wallis p=0,28; p0vs11=0,1 M-W; p0vs12=0,03 M-W; p11vs12>0,05 M-W		Kruskal-Wallis p=0,0015; p0vs11=0,0005 M-W; p0vs12=0,00019 M-W; p11vs12>0,05 M-W	

Изучили распределение sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных КРР (рисунок 7а,б).

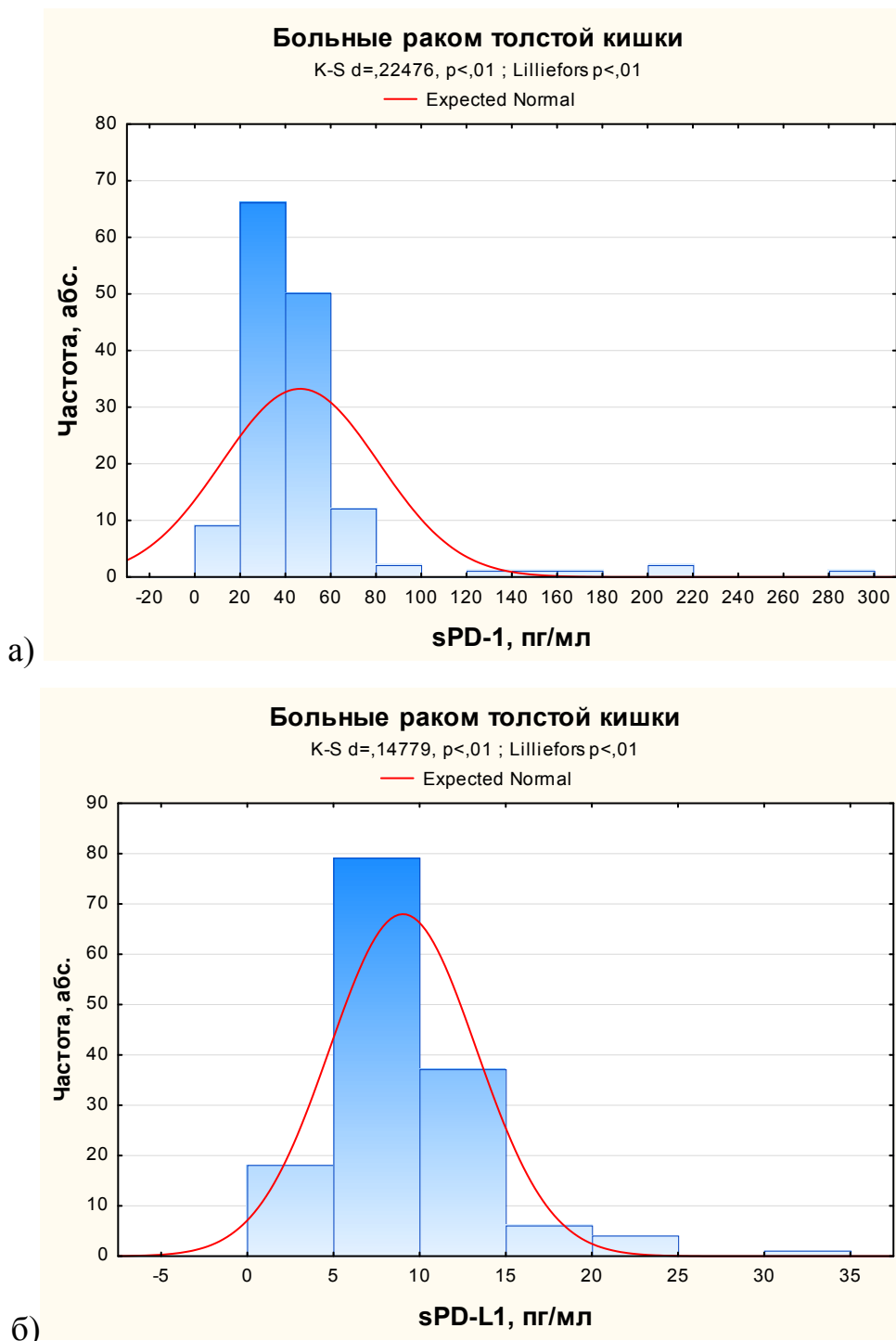


Рисунок 7. Распределение а) sPD-1 и б) sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком.

Концентрации sPD-1 в сыворотке крови общей группы больных КРР колебались в широких пределах от 9,5 до 287 пг/мл. Так, у 9/6,2% больных выявлены значения sPD-1 менее 20 пг/мл. Наиболее часто выявляли значения

маркера в диапазоне от 20 до 40 пг/мл – у 67/46,2%, и в диапазоне от 40 до 60 пг/мл – у 51/35,2% пациентов. Показатели белка от 60 до 80 пг/мл обнаружены у 12/8,3%, а значения маркера более 80 пг/мл выявлены у 6/4,1% пациентов. Показатель оценивали непараметрическими критериями.

Содержание sPD-L1 в сыворотке крови больных КРР колебались в пределах от 1,9 до 32,8 пг/мл. При этом, у 18/12,4% больных колоректальным раком выявлены значения sPD-L1 менее 5 пг/мл, наиболее часто выявляли значения в диапазоне от 5 до 10 пг/мл – у 79/54,5%, и в диапазоне от 10 до 15 пг/мл – у 37/25,5%, показатели лиганда от 15 и более пг/мл обнаружены у 11/7,6%. Показатель оценивали непараметрическими критериями.

Как следует из данных таблицы 9, медиана концентрации sPD-L1 в группе контроля была статистически значимо выше, чем в общей группе больных опухолями толстой кишки (9,9 и 8,3 пг/мл соответственно; $p=0,023$), как и sPD-1 (51,3 и 37,0 пг/мл соответственно; $p=0,00006$) (рисунки 8а и 8б).

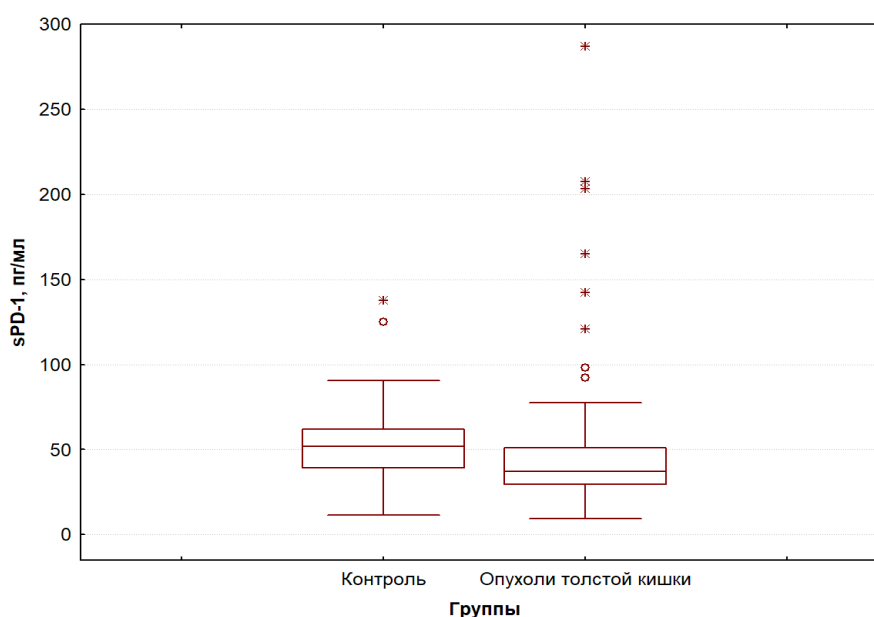


Рисунок 8а. Медианы, квантили и пределы колебания концентраций sPD-1 в сыворотке крови здоровых доноров и общей группы больных опухолями толстой кишки.

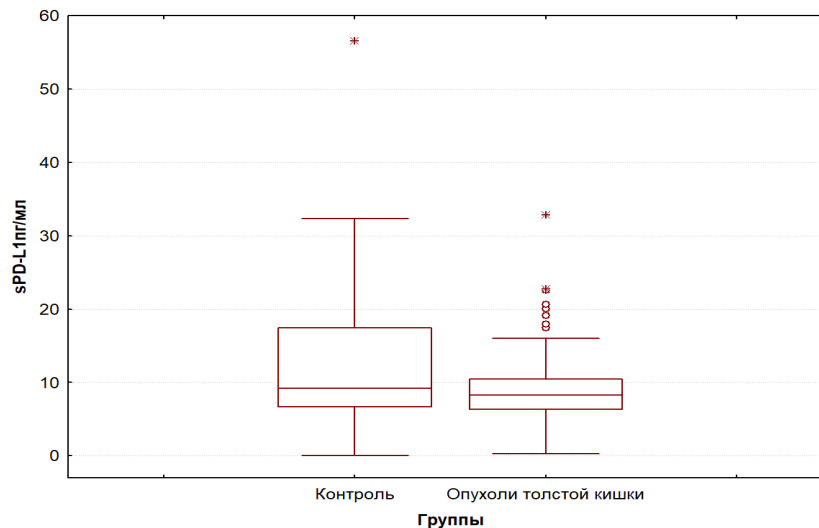


Рисунок 8б. Медианы, квартили и пределы колебания концентраций sPD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров и общей группы больных опухолями толстой кишки.

При этом не установлено достоверных различий в уровнях обоих белков (sPD-1, sPD-L1) у больных доброкачественными новообразованиями толстой кишки и КРР ($p > 0,05$), однако каждый из маркеров в группе доброкачественных опухолей толстой кишки и КРР статистически значимо отличался от контроля (рисунки 9а, 9б).

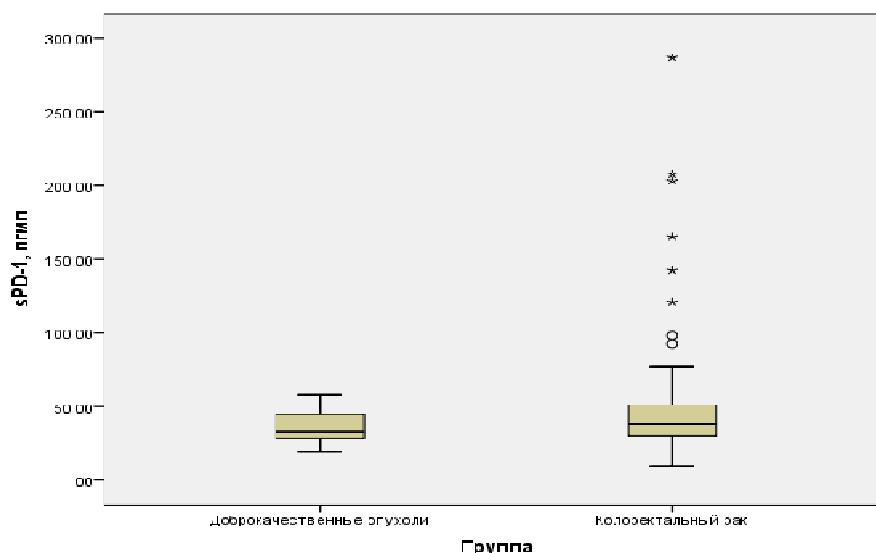


Рисунок 9а. Медианы, квартили и пределы колебания концентраций sPD-1 в сыворотке крови больных доброкачественными и злокачественными опухолями толстой кишки.

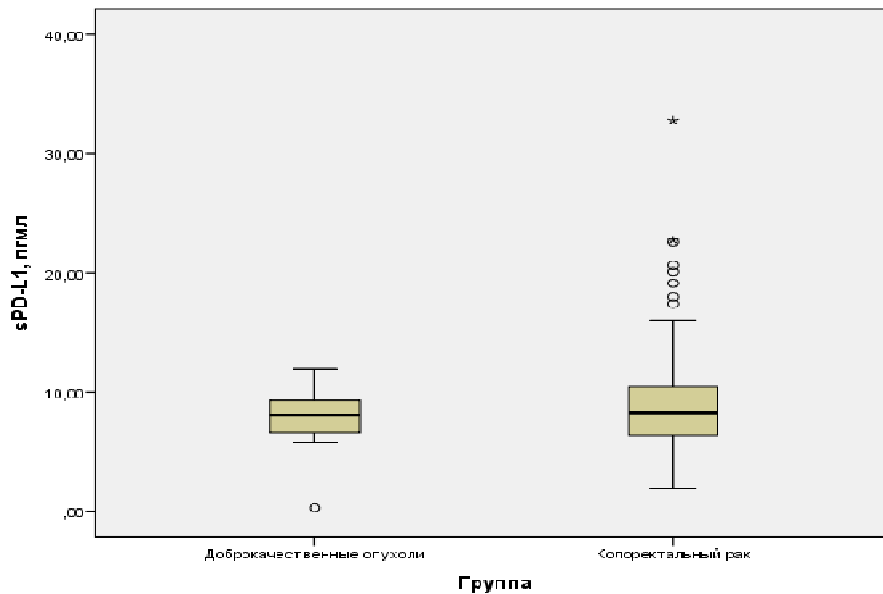


Рисунок 9б. Медианы, кватили и пределы колебания концентраций sPD-L1 в сыворотке крови больных доброкачественными и злокачественными опухолями толстой кишки.

В то же время нами не найдены пороговые значения для обоих белков, разделяющих здоровых доноров и больных опухолями толстой кишки с приемлемой точностью. Таким образом, изучаемые белки sPD-1 и sPD-L1 не обладают диагностической ценностью при новообразованиях толстой кишки.

Рассчитанное нами соотношение sPD-1/sPD-L1 не различалось статистически значимо в группе контроля и больных доброкачественными и злокачественными новообразованиями толстой кишки (медианы равнялись 4,2; 3,3-6,0 – в контроле; 4,2; 3,2-4,9 – у больных доброкачественными опухолями толстой кишки и 4,8; 3,6-6,5 – у больных КРР).

3.2. Содержание PD-1, PD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров и больных опухолями толстой кишки в зависимости от их пола и возраста

В таблице 10 представлены данные концентраций sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови обследованных мужчин и женщин в группе контроля и больных доброкачественными и злокачественными опухолями толстой кишки.

Таблица 10.

Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров, больных доброкачественными опухолями толстой кишки и колоректальным раком с учетом их пола

Группа	Пол	N	sPD-L1, пг/мл	sPD-1, пг/мл
			Медиана; квартили	Медиана; Квартили
Контроль ⁰	муж	25	9,9; 6,1-16,1	53,2; 49,2-62,1
	жен	27	9,2; 7,1-20,1	48,7; 30,7-61,5
P			0,56	0,07
Опухоли толстой кишки (общая группа) ¹	муж	83	9,2; 6,2-10,9	38,4; 29,9-52,0
	жен	77	7,6; 6,4-9,4	36,3; 29,5-48,9
P			0,031	>0,05
Доброкачественные новообразования толстой кишки ¹¹	муж	4	8,8; 0,3-9,7	29,0; 27,9-29,3
	жен	11	8,1; 6,3-8,6	33,4; 27,3-46,9
P			>0,05	>0,05
Колоректальный рак ¹²	муж	79	9,2; 6,2-10,9	39,2; 30,2-52,0
	жен	66	7,5; 6,4-9,4	36,3; 29,5-50,0
P			0,044;	>0,05

Как следует из данных таблицы 10, концентрации sPD-L1 в сыворотке крови обследованных женщин достоверно ниже в общей группе пациенток с опухолями толстой кишки независимо от характера выявленного новообразования (статистически значимо только в общей группе и группе КРР) (рисунок 10).

Также следует отметить, что в группе обследованных мужчин различия медиан sPD-1 в контроле и у больных опухолями толстой кишки были более выраженными (медианы различались в 1,4 раза, $p=0,027$), чем в группе обследованных женщин - только в 1,3 раза, $p=0,02$).

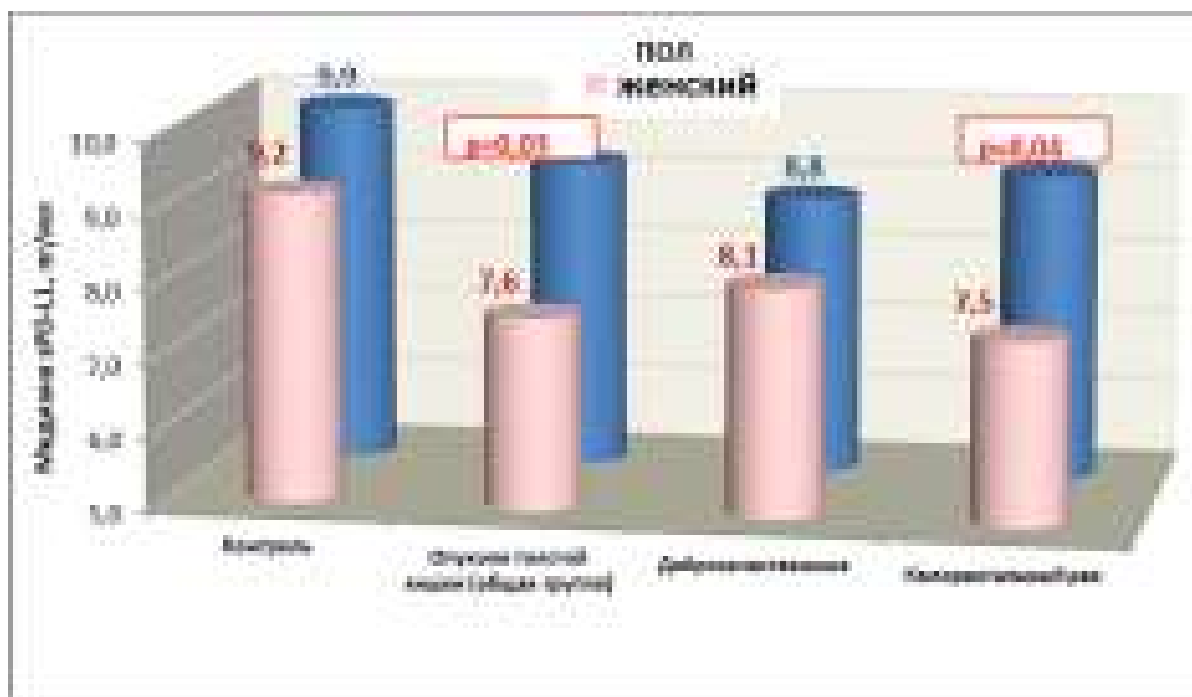


Рисунок 10. Медианы содержания sPD-L1 в сыворотке крови обследованных здоровых доноров и больных опухолями толстой кишки разных групп в зависимости от их пола.

При этом в группе обследованных мужчин чувствительность порогового значения sPD-L1 <10 пг/мл (верхняя квартиль в контроле) равнялась 59,0% (49 из 83) при специфичности 66,7% (8 из 12), то есть также была недостаточной. В группе обследованных женщин чувствительность и специфичность этого теста равнялись 79,2% и 33,3%, то есть 2/3 женщин

контрольной группы могут быть ошибочно приняты за больных опухолями толстой кишки.

Такую же закономерность наблюдали и для концентраций sPD-1 (рисунок 11), однако различия не были статистически значимыми.

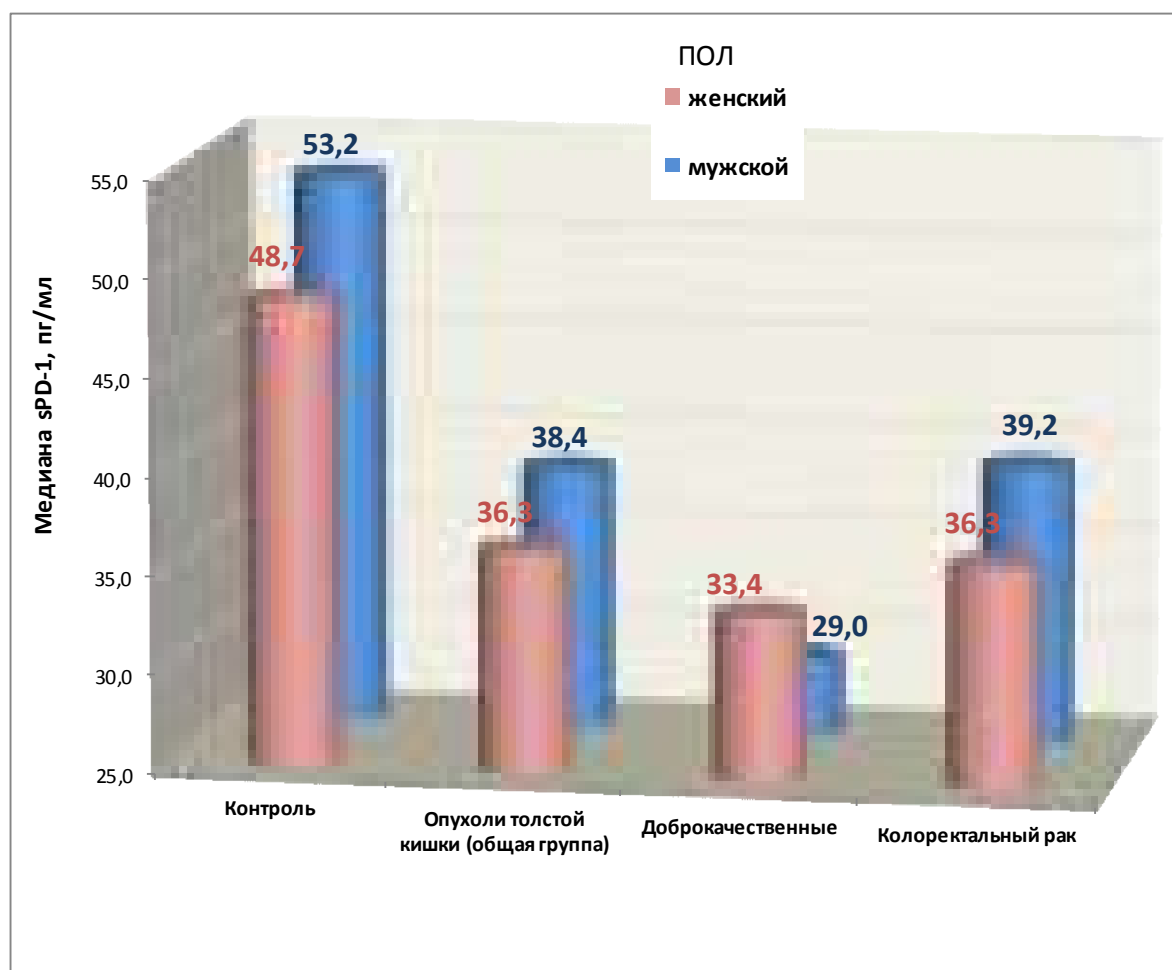


Рисунок 11. Медианы содержания sPD-1 в сыворотке крови обследованных здоровых доноров и больных опухолями толстой кишки разных групп в зависимости от пола.

Рассчитали корреляционную зависимость между концентрациями sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови обследованных доноров в группе контроля и больных доброкачественными и злокачественными опухолями толстой кишки с их возрастом (таблица 11).

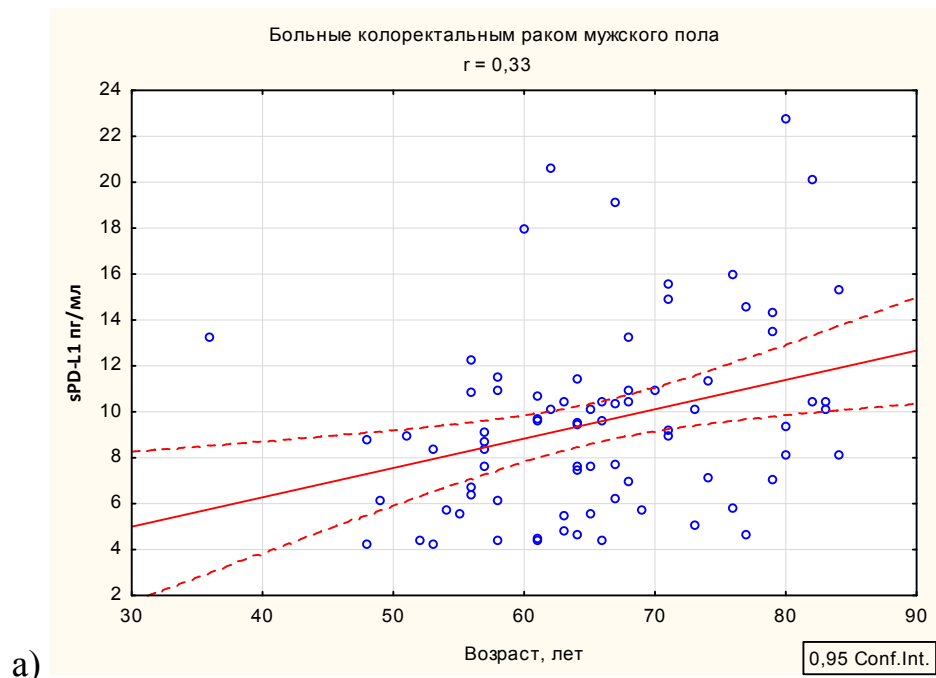
Таблица 11.

Корреляционные зависимости между возрастом и концентрациями sPD-1 и sPD-L1 у здоровых доноров, больных злокачественными и доброкачественными опухолями толстой кишки с учетом их пола

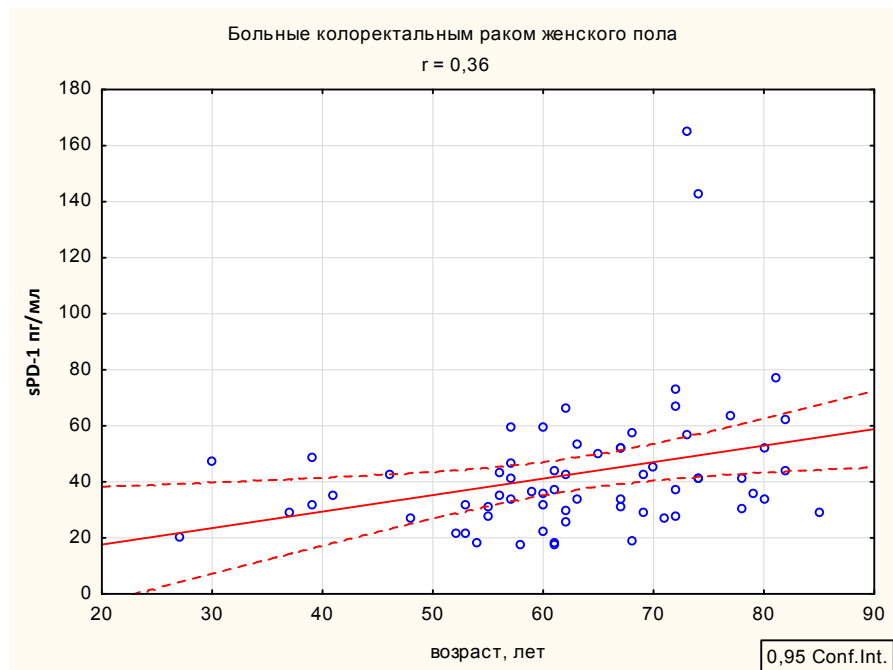
Группа	Пол	N	sPD-L1		sPD-1	
			r Spearman	p	r Spearman	P
Контроль	Общ.	52	0,053	0,7	-0,11	0,4
	муж	25	0,05	>0,05	-0,57	0,05
	жен	27	0,49	0,06	0,47	0,08
Больные новообразованиями толстой кишки	Общ.	160	0,24	0,002	0,26	0,001
	муж	83	0,29	0,008	0,15	0,17
	жен	77	0,21	0,007	0,35	0,002
Больные колоректальным раком	Общ.	145	0,26	0,001	0,24	0,004
	муж	79	0,33	0,003	0,11	0,3
	жен	66	0,21	0,09	0,36	0,003

Так, концентрации sPD-1 и sPD-L1 связаны с возрастом обследованных слабой прямой корреляционной зависимостью. На рисунке 12а,б представлены наиболее выраженные корреляционные зависимости.

Рассчитали концентрации изучаемых маркеров в сыворотке крови обследованных групп с учетом их возраста (таблица 12). Дисперсионным анализом выявлена тенденция к повышению концентраций sPD-L1 в сыворотке крови с увеличением возраста обследованных здоровых доноров, больных злокачественными и доброкачественными новообразованиями толстой кишки (рисунок 13а). Концентрации sPD-1 в сыворотке крови больных опухолями толстой кишки независимо от характера опухоли также незначимо повышались при увеличении возраста пациентов (рисунок 13б).



а)



б)

Рисунок 12. Корреляционная зависимость а) между концентрациями sPD-L1 и возрастом больных колоректальным раком у мужчин и б) между концентрациями sPD-1 и возрастом больных колоректальным раком у женщин.

Таблица 12.

Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров, больных доброкачественными и злокачественными новообразованиями толстой кишки с учетом их возраста

Группа	Возраст, лет	N	sPD-L1, пг/мл	sPD-1, пг/мл
			Медиана; квартили	Медиана; квартили
Контроль ⁰	<30	27	9,0; 7,0-15,7	53,2; 38-70,5
	30-39	25	15,0; 6,4-20,1	50,1; 39,2-55,4
P			0,48	0,27
Опухоли толстой кишки (общая группа) ¹	<30	1	4,5*	20,4*
	30-39	6	7,1; 6,3-8,5	46,9; 31,5-48,9
	40-49	7	7,5; 6,2-8,8	32,2; 26,8-42,6
	50-59	35	7,3; 6,1-9,1	32,7; 27,9-48,9
	60-69	63	9,2; 5,8-10,4	35,7; 29,5-50,0
	70-79	33	8,9; 6,5-10,9	44,5; 35,8-58,3
	≥80	15	9,4; 8,0-15,3	43,9; 33,8-52,0
P			0,09	0,019
Доброкачественные новообразования толстой кишки ¹¹	<30	-	-	-
	30-39	1	6,3*	46,9*
	40-49	1	8,1*	32,2*
	50-59	3	8,8; 8,1-9,7	27,9; 18,9-29,0
	60-69	8	7,7; 5,8-9,9	32,8; 27,3-36,8
	70-79	2	4,4; 0,3-8,6	55,6; 52,8-58,3
	≥80	-	-	-
P			>0,05	>0,05

Колоректальный рак ¹²	<30	1	4,5*	20,4*
	30-39	5	7,1; 7,1-8,5	47,3; 31,5-48,9
	40-49	6	6,4; 6,2-8,8	30,0; 26,8-42,6
	50-59	32	7,2; 5,7-8,9	34,0; 28,1-48,9
	60-69	55	9,2; 5,7-10,4	37,1; 29,7-50,8
	70-79	31	9,2; 6,5-11,3	41,6; 35,5-63,6
	≥80	15	9,4; 8,0-15,3	43,9; 33,8-52,0
P			p=0,07	0,1

Примечание: * - абсолютное значение.

Так, в группе контроля медиана sPD-L1 у больных в возрасте до 30 лет и 30-39 лет равнялась 9,3 и 15,0 пг/мл соответственно; в группе больных колоректальным раком в возрасте от 30 до 39 лет и у пациентов от 80 лет и старше составила 7,1 и 9,4 пг/мл соответственно.

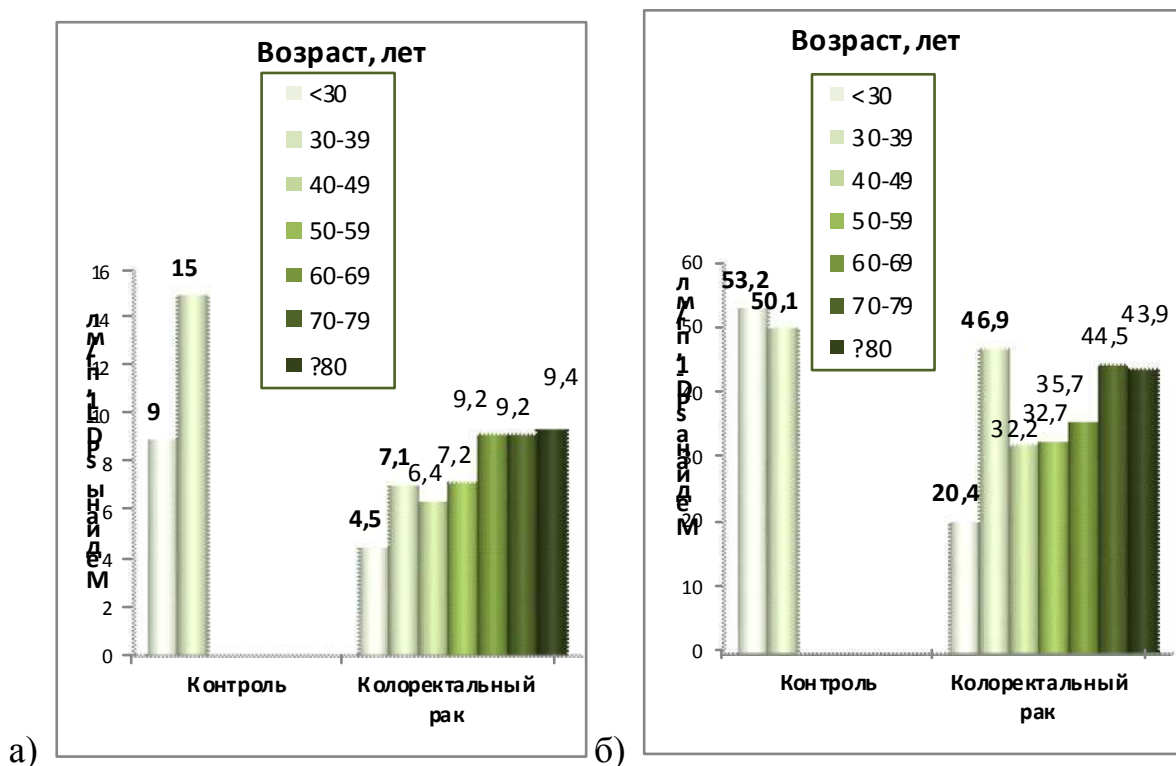


Рисунок 13. Медианы концентрации а) sPD-L1 и б) sPD-1 в сыворотке крови обследованных здоровых доноров и больных колоректальным раком.

Рассчитали корреляционные зависимости между концентрациями изучаемых маркеров и размером первичной опухоли толстой кишки: наименьшим, и наибольшим (таблица 13). Зависимости между выше указанными показателями были положительными, но слабыми, стало быть по уровню сывороточных sPD-1 и sPD-L1 нельзя предположить размер первичного опухолевого узла.

Таблица 13.

Корреляционные зависимости между сывороточными уровнями sPD-1, sPD-L1 минимальным и наибольшим размером опухоли толстой кишки

Показатели	N	r Spearman
sPD-L1 & наименьший размер опухоли (см)	41	0,32; p=0,04
sPD-L1 & наибольший размер опухоли (см)	56	0,31; p=0,02
sPD-1 & наименьший размер опухоли (см)	41	0,21; p=0,2
sPD-1 & наибольший размер опухоли (см)	56	0,21; p=0,12

Следует указать, что только в группе больных раком толстой кишки мужчин обнаружена статистическая значимость связь уровнями sPD-L1 в сыворотке крови с минимальным и максимальным размером опухоли: для sPD-L1 и наименьшего размера опухоли ($r_s=0,44$; $p=0,04$); для sPD-L1 и наибольшего размера опухоли ($r_s=0,46$; $p=0,007$). В качестве примера на рисунке 14 приведен график корреляционной зависимости между концентрациями лиганда sPD-L1 в сыворотке крови и размерами (наименьшим и наибольшим) опухоли у мужчин, больных раком толстой кишки. В группе больных КРР женщин указанные связи были слабыми и незначимыми и равнялись соответственно (при наименьшем размере опухоли - $r_s=0,28$; $p>0,05$) и (при наибольшем размере опухоли - $r_s=0,16$; $p>0,05$).

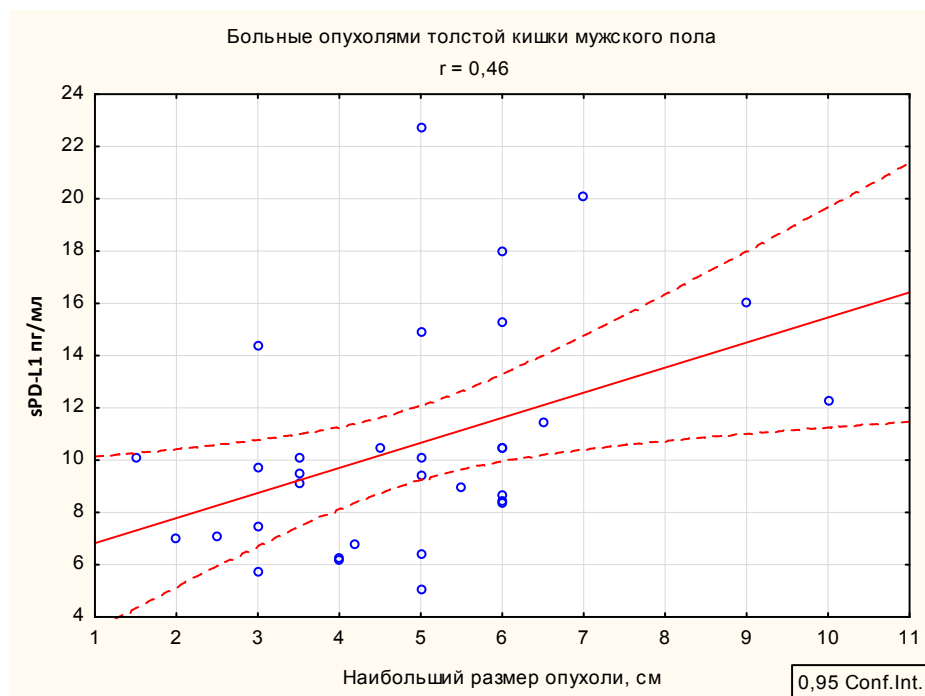


Рисунок 14. Корреляционная зависимость между концентрацией sPD-L1 в сыворотке крови и наибольшим размером первичной опухоли у мужчин, больных раком толстой кишки.

3.3. Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных злокачественными и доброкачественными опухолями толстой кишки с учетом клинико-морфологических характеристик опухоли.

Рассчитали концентрации sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови больных опухолями толстой кишки в зависимости от их гистологического строения; данные представлены в таблице 14. Статистически значимых различий между группами не выявили.

Провели анализ концентраций sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови больных аденокарциномой толстой кишки в зависимости от ее анатомической локализации в пораженном органе (таблица 15). Статистически значимых различий между группами также не выявили.

Таблица 14.

Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных опухолями толстой кишки с учетом их гистологического строения

Гистологический вариант	N	sPD-1, пг/мл	sPD-L1, пг/мл
		Медиана; квартили	Медиана; квартили
Тубулярная аденома	9	8,6; 8,1-9,7	32,2; 29,0-46,9
Зубчатая аденома	1	0,3*	58,3*
Тубуло-ворсинчатая аденома	5	7,7; 6,7-8,8	32,8; 27,9-33,4
Аденокарцинома	145	8,3; 6,4-10,4	38,0; 30,0-51,3
P		>0,05	>0,05

Примечание: *- абсолютное значение.

Таблица 15.

Уровни sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных опухолями толстой кишки с учетом их локализации в пораженном органе

Гистологический вариант	N	sPD-L1, пг/мл	sPD-1, пг/мл
		Медиана; квартили	Медиана; квартили
Сигмовидная ободочная кишка	39	9,1; 7,4-10,2	41,1; 32,7-55,3
Поперечная ободочная кишка	4	6,5; 5,7-8,1	28,8; 18,9-52,8
Прямая кишка	70	7,6; 5,8-10,7	35,8; 27,3-50,8
Слепая кишка	8	7,5; 6,8-7,9	36,3; 31,8-41,6
Селезеночный изгиб ободочной кишки	5	7,7; 5,7-8,8	61,9; 44,8-67,1
Ректосигмоидный отдел ободочной кишки	4	8,3; 7,2-9,7	43,2; 30,8-54,2
Нисходящая ободочная кишка	4	6,4; 4,1-6,8	31,2; 29,8-32,7
Печеночный изгиб ободочной кишки	4	7,6; 5,1-8,0	33,8; 19,0-45,1
Восходящий отдел ободочной кишки	15	9,9; 7,6-10,9	35,2; 30,2-50,1
Ректосигмоидный отдел толстой кишки	7	4,9; 4,7-8,5	31,5; 23,7-33,6
P		>0,05	>0,05

Наименьшие концентрации sPD-L1 выявлены у 7 больных с локализацией опухоли в ректосигмоидном отделе толстой кишки (медиана 4,9 пг/мл), а наибольшие – у 15 больных с локализацией опухоли в восходящем отделе ободочной кишки (медиана 9,9 пг/мл). Данные этого раздела исследований представлены на рисунке 15.

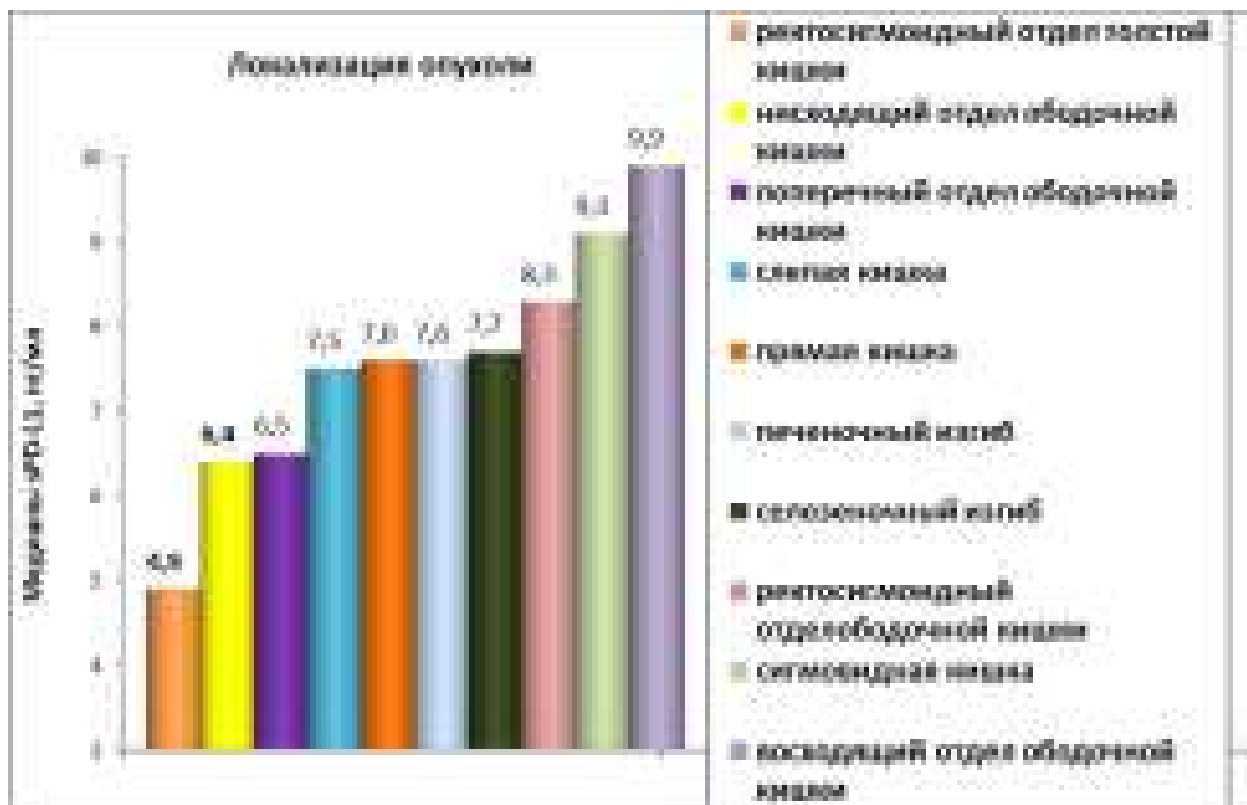


Рисунок 15. Медианы концентрации sPD-L1 в сыворотке крови больных раком толстой кишки в подгруппах с различной локализацией опухоли.

Наименьшие концентрации sPD-1 выявлены у 4 больных с локализацией опухоли в поперечном отделе ободочной кишки (медиана 28,8 пг/мл), а наибольшие – у 5 больных с локализацией опухоли в области селезеночного изгиба ободочной кишки (медиана 61,9 пг/мл) (рисунок 16).



Рисунок 16. Медианы концентрации sPD-1 в сыворотке крови больных раком толстой кишки в подгруппах с различной локализацией опухоли.

3.4. Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания.

Рассчитали концентрации sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком в зависимости от критериев системы TNM, данные представлены в таблице 16.

Как следует из данных, представленных в таблице 16, концентрации sPD-L1 у больных КРР статистически значимо отражали критерий T ($p=0,022$). Так, медианы показателя при распространенности T1 равнялись 7,1 пг/мл, повышались при распространенности T3 до 8,1 пг/мл и были наибольшими при распространенности T4 (9,7 пг/мл).

Таблица 16.

Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком с учетом критериев системы TNM

Критерии системы TNM	N	sPD-L1, пг/мл	sPD-1, пг/мл
		Медиана; квартили	Медиана; квартили
T1	6	7,1; 5,1-8,2	43,7; 28,6-58,6
T2	28	7,2; 5,6-10,1	37,5; 30,8-56,5
T3	84	8,1; 6,2-10,4	35,6; 29,4-50,7
T4	27	9,7; 8,4-10,8	42,6; 33,8-51,3
P		0,022	>0,05
N0	83	7,6; 6,1-10,1	35,5; 29,3-50,0
N1	35	9,2; 6,4-10,9	44,2; 31,3-56,3
N2	27	9,3; 7,2-10,9	43,2; 30,8-51,9
P		0,11	0,2
M0	122	8,1; 6,4-10,3	38,8; 30,1-51,4
M1	23	9,4; 6,4-11,4	35,4; 29,3-55,4
P		0,19	>0,05
N0M0	76	7,5; 5,7-10,1	35,5; 28,9-47,5
N1 либо M1	69	9,4; 7,2-10,9	42,8; 31,3-52,0
P		0,011	0,09

Аналогичная тенденция в показателях sPD-L1 в сыворотке крови выявлена и при обнаружении метастазов в региональных лимфоузлах: при N0 - 7,6 пг/мл (n=83), при N1 - 9,2 пг/мл (n=35), при N2 - 9,3 пг/мл (n=27) (p=0,11).

Такая же закономерность выявлена и при обнаружении отдаленных метастазов колоректального рака. Уровни sPD-L1 в сыворотке крови больных раком толстой кишки составили 8,1 пг/мл - при отсутствии отдаленных

метастазов (n=122 при M0) и 9,4 пг/мл - при их выявлении (n=23, M1) (p=0,19).

При сопоставлении концентраций sPD-L1 в сыворотке крови больных без метастазов (n=76) и с таковыми (n=69) выявлено статистически значимое различие (7,5 пг/мл против 9,4 пг/мл соответственно; p=0,011) (рисунок 17).

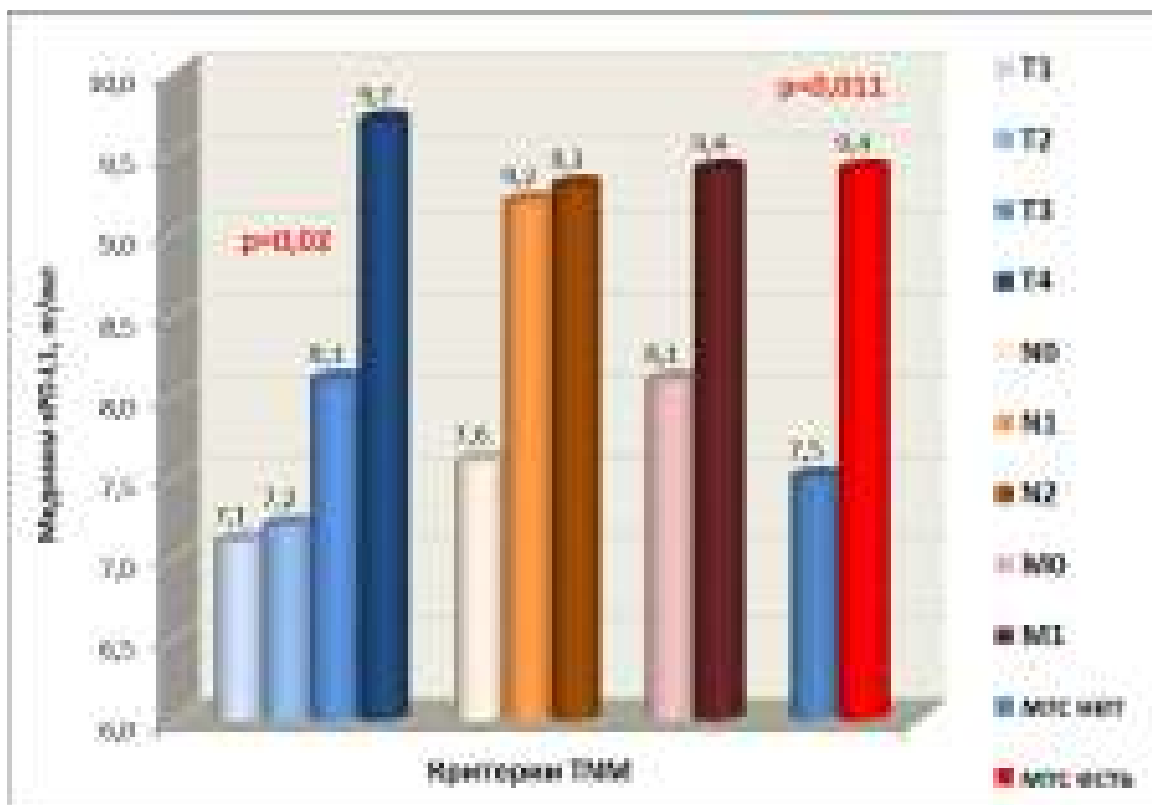


Рисунок 17. Медианы sPD-L1 у больных колоректальным раком в зависимости от критериев TNM.

Следует отметить, что в группе из 9 больных колоректальным раком с наименьшей распространенностью опухолевого процесса T1-T2N0M0 выявлены наиболее низкая медиана концентрации лиганда sPD-L1 (7,1 пг/мл), а наибольшие концентрации маркера обнаружены в многочисленной группе (n=72) пациентов с большими размерами опухоли (T4) либо с наличием метастазов в регионарных лимфоузлах (N1-N2), либо с наличием метастазов в отдаленных органах.

Таким образом, высокие концентрации sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком свидетельствуют о распространенности опухолевого процесса и, стало быть, их следует считать неблагоприятными показателями.

Согласно критериям системы TNM не было выявлено значимых различий в концентрациях sPD-1 у больных колоректальным раком с различной распространенностью опухолевого процесса, однако отмечена тенденция к большим значениям маркера при выявлении метастазов в региональных лимфоузлах. Так, медиана концентрации sPD-1 в сыворотке крови пациентов составила 35,5 пг/мл - при N0 против 44,2 пг/мл 43,2 пг/мл – соответственно при N1-N2 ($p=0,1$) (рисунок 18).

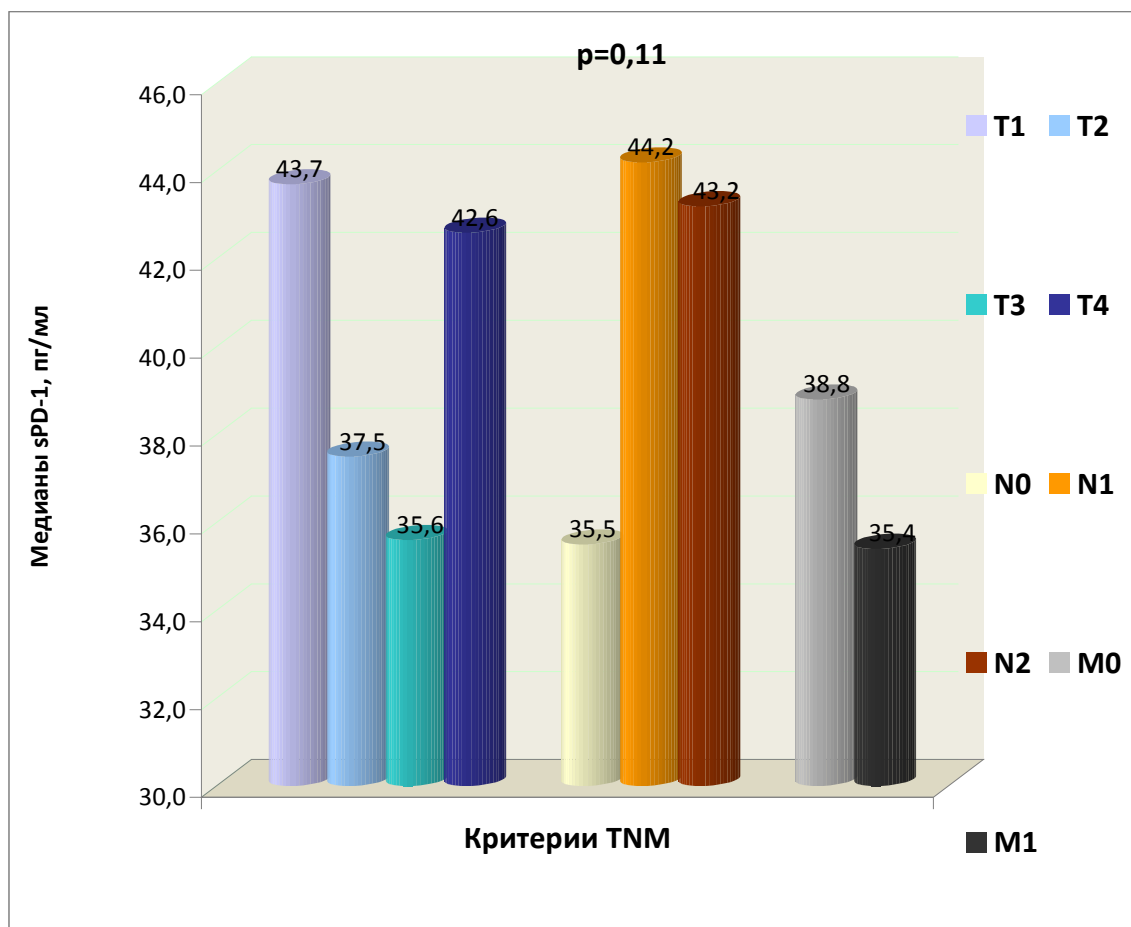


Рисунок 18. Медианы sPD-1 у больных колоректальным раком в зависимости от критериев системы TNM.

Представленные нами данные свидетельствуют о том, что уровни sPD-1 в сыворотке крови больных колоректальным раком не отражали критерии Т и М системы TNM.

Рассчитали концентрации sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком в зависимости от стадии заболевания, данные представлены в таблице 17 и на рисунках 19. Анализ результатов обнаружил постепенное повышение уровней sPD-L1 при I стадии с 7,1 пг/мл до 10,9 пг/мл - при IV стадии ($p=0,1$).

Таблица 17.

Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком с учетом стадии заболевания

Стадия колоректального рака	N	sPD-L1, пг/мл	sPD-1, пг/мл
		Медиана; квартили	Медиана; квартили
I	28	7,1; 5,5-9,5	38,6; 29,9-55,8
IIa	46	7,9; 6,4-10,3	34,3; 28,8-46,1
IIb	3	10,1; 7,5-14,1	37,0; 22,6-41,6
IIIa	8	7,0; 5,2-12,0	41,6; 31,4-58,8
IIIb	10	9,3; 7,3-10,5	43,5; 31,4-50,3
IIIc	11	9,2; 8,0-10,9	48,9; 34,9-53,5
III	16	9,5; 6,6-14,7	46,0; 28,7-51,9
Iva	5	6,4; 5,0-9,9	31,7; 28,4-38,3
IV	18	10,9; 7,7-14,9	37,5; 29,3-61,7
P		0,1	>0,05

Нами не выявлено связи концентраций sPD-1 в сыворотке крови больных колоректальным раком со стадией заболевания.

На рисунке 19 показано, что у больных колоректальным раком с IIIa и Iva стадиями обнаружены наиболее низкие уровни sPD-L1 в сыворотке крови (соответственно 7,0 и 6,4 пг/мл). Тогда как при большей распространенности опухолевого процесса с наличием метастазов концентрации маркера заметно увеличивались.

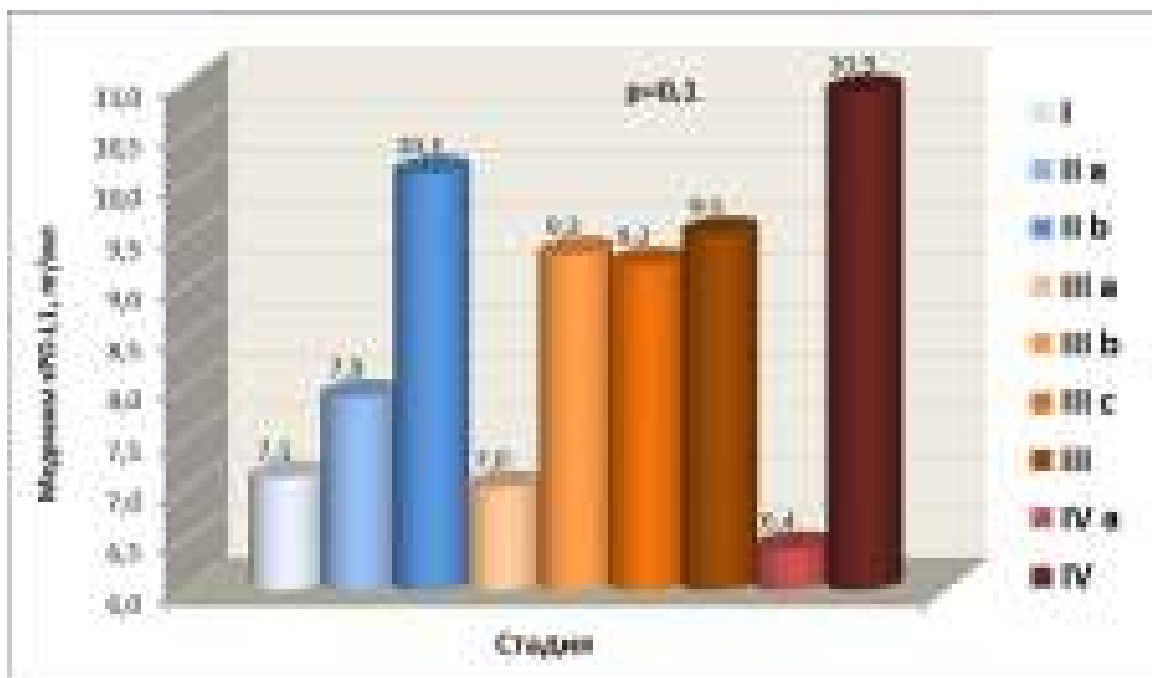


Рисунок 19. Медианы sPD-L1 у больных колоректальным раком в зависимости от стадии заболевания.

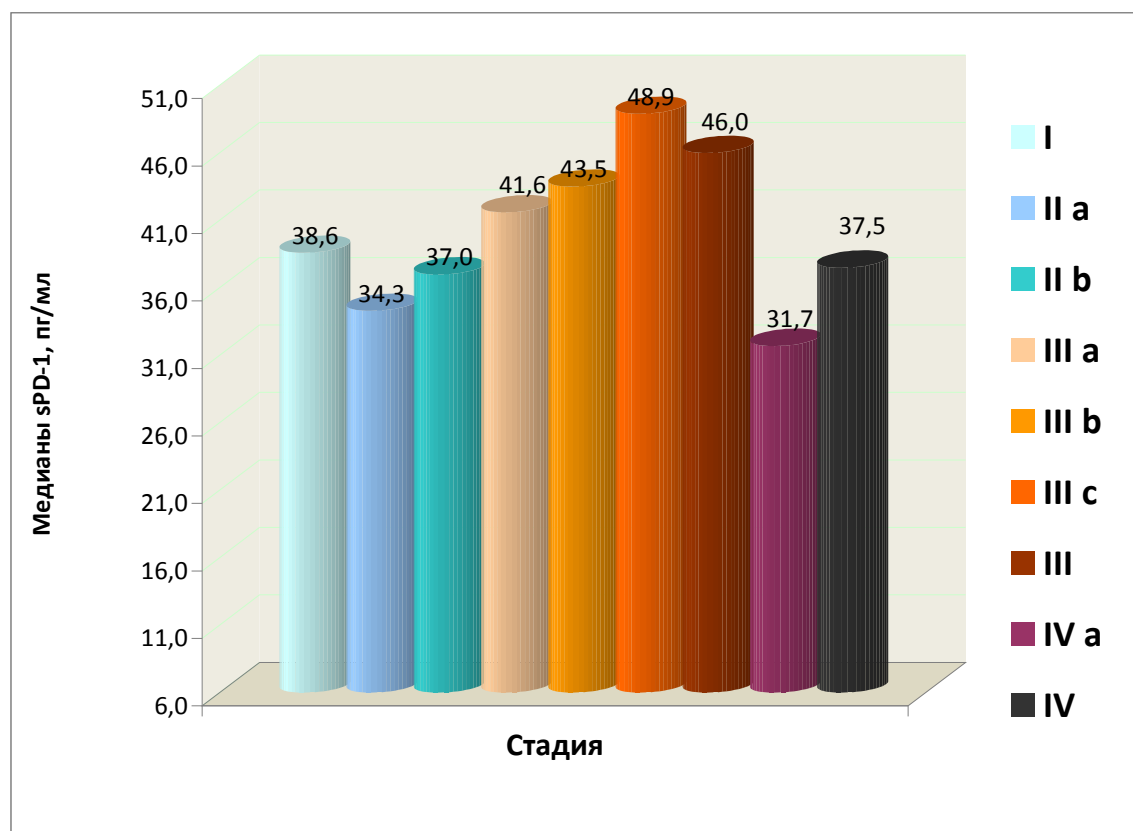


Рисунок 20. Медианы sPD-1 у больных колоректальным раком в зависимости от стадии заболевания.

В то же время концентрации sPD-1 были наибольшими в группе больных колоректальным раком с IIIb и IIIc стадиями, но вновь снижались у пациентов с IV стадией (рисунок 20).

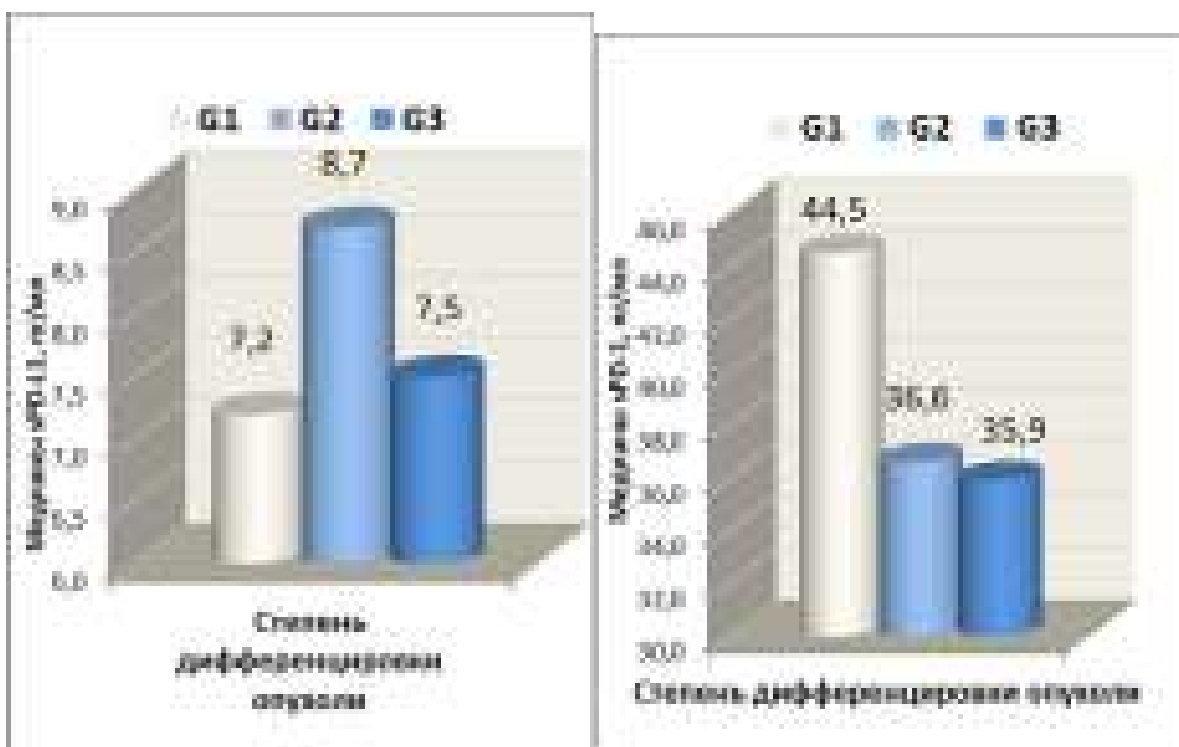
Провели анализ исходных уровней маркеров sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных КРР в зависимости от степени дифференцировки опухоли (таблица 18).

Таблица 18.

Содержание sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком с учетом степени дифференцировки опухоли

Степень дифференцировки опухоли	N	sPD-L1, пг/мл	sPD-1, пг/мл
		Медиана; квантили	Медиана; квантили
G-1	29	7,2; 6,0-10,2	44,5; 31,8-58,9
G-2	108	8,7; 6,6-10,5	36,6; 29,5-50,3
G-3	8	7,5; 6,5-10,3	35,9; 28,4-41,4
P		>0,05	>0,05

Нами не обнаружено статистически значимой зависимости исходных концентраций изучаемых маркеров со степенью дифференцировки рака толстой кишки. При этом, в малочисленной группе пациентов с неблагоприятной низкодифференцированной аденокарциномой толстой кишки G-3 были выявлены наименьшие медианы обоих маркеров в сыворотке крови (sPD-1 - 7,5 пг/мл и sPD-L1 - 35,9 пг/мл), данные представлены на рисунке 21 а,б.



а)

б)

Рисунок 21. Медианы маркеров: а) sPD-L1 и б) sPD-1 у больных колоректальным раком в зависимости от степени дифференцировки опухоли.

В то же время обнаружено статистически значимое снижение медианы коэффициента соотношения маркеров sPD-1/sPD-L1 с 5,6 (4,7-7,5) в группе из 29 пациентов со степенью дифференцировки первичной опухоли G-1 до значения с 4,5 (3,4-5,9) в группе из 108 пациентов с G-2, а также в группе из 8 пациентов с G-3 до 4,4 (2,8-5,3) ($p=0,013$; рисунок 22). Следовательно, при снижении степени дифференцировки аденокарциномы толстой кишки отмечается постепенное повышение концентрации рецептора sPD-1 и снижение уровня лиганда sPD-L1, что отражается на показателях коэффициента соотношения sPD-1/sPD-L1.



Рисунок 22. Медианы коэффициента соотношения sPD-1/sPD-L1 у больных колоректальным раком в зависимости от степени дифференцировки опухоли.

Провели анализ корреляционной зависимости между концентрациями sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови разных обследованных нами групп: здоровых доноров, больных доброкачественными и злокачественными опухолями толстой кишки, данные представлены в таблице 19.

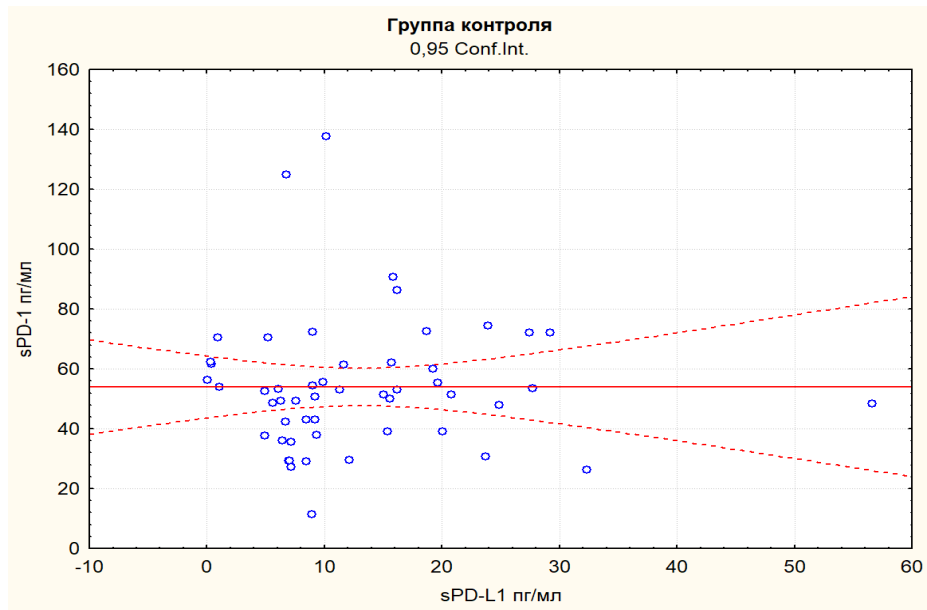
В группе контроля выявлена слабая положительная зависимость между концентрациями изученных маркеров sPD-1 и sPD-L1 ($r_s=0,35$; $p=0,07$) (рисунок 23а).

В группе больных доброкачественными опухолями толстой кишки не выявлено корреляционной зависимости между уровнями sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови. В группе больных аденокарциномой толстой кишки обнаружена прямая статистически значимая корреляционная зависимость между уровнями sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови (рисунок 23б).

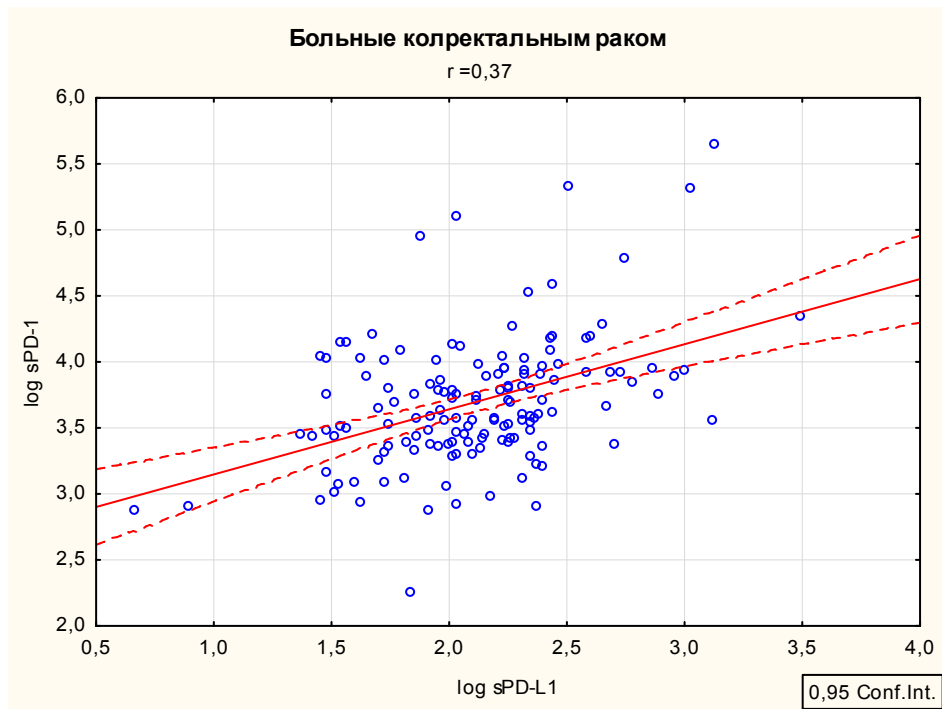
Таблица 19.

Корреляционные зависимости между концентрациями sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови у здоровых доноров, больных злокачественными и доброкачественными опухолями толстой кишки

Обследованные группы		Число наблюдений	r Spearman	P
Группа контроля		52	0,07	0,6
Доброкачественные новообразования толстой кишки		15	0,08	>0,05
Колоректальный рак	Общая группа	145	0,37	<0,0001
	Муж	79	0,34	0,002
	Жен	66	0,41	0,0007
	Моложе 50 лет	12	-0,1	>0,05
	Старше 50 лет	133	0,39	<0,0001
	T1-T2	6	0,34	0,048
	T3	84	0,41	<0,0001
	T4	27	0,22	0,3
	N0	83	0,35	0,001
	N1	35	0,41	0,014
	N2	27	0,25	0,2
	M0	122	0,39	<0,0001
	M1	23	0,31	0,14
	G-1	25	0,58	0,001
	G-2	108	0,35	0,0002
G-3	8	0,14	>0,05	



а)



б)

Рисунок 23. Корреляционная зависимость между sPD-1 и SPD-L1 в сыворотке крови: а) в группе контроля; б) в группе больных колоректальным раком.

Особенностью данной связи является заметное ее ослабление по мере снижения степени дифференцировки опухоли со значения ($r_s=0,58$; $p=0,001$) до незначимого уровня ($r_s=0,14$; $p>0,05$). На рисунке 24 в качестве примера

представили данные по корреляционной зависимости между маркерами sPD-1 и sPD-L1 у больных аденокарциномой толстой кишки со степенью дифференцировки опухоли равной G-1.

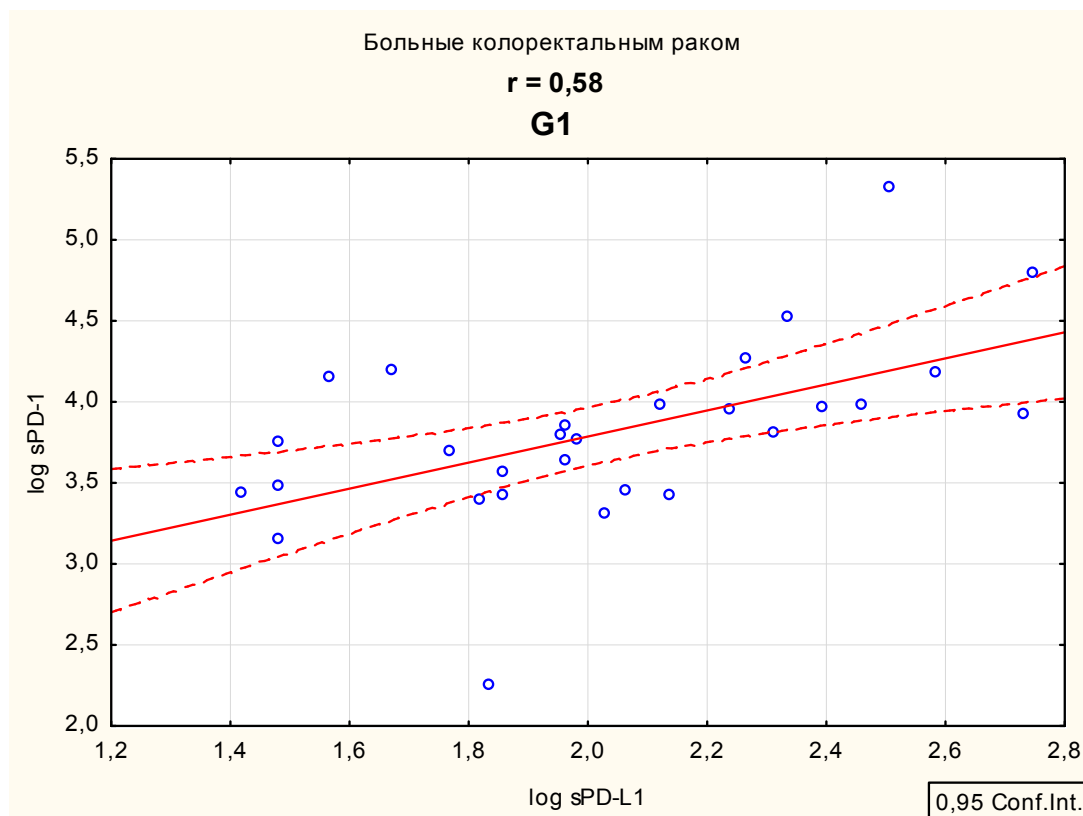


Рисунок 24. Корреляционная зависимость между sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных аденокарциномой толстой кишки со степенью дифференцировки опухоли G-1.

Корреляционная зависимость между уровнями sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови отсутствовала в группе больных колоректальным раком в возрасте до 50 лет.

Кроме того, эта корреляционная зависимость между маркерами sPD-1 и sPD-L1 заметно ослабевала при критериях T4 и N2 (системы TNM), а также была незначимой при критерии M1 (таблица 19).

Таким образом, анализ полученных нами результатов у больных при прогрессировании колоректального рака показал, что корреляционная связь

между уровнями сывороточных sPD-1 и sPD-L1 ослабевает до незначимой величины.

Подводя итоги анализа концентраций sPD-L1 в сыворотке крови в группах обследованных здоровых доноров, больных доброкачественными и злокачественными опухолями толстой кишки следует отметить, что медиана концентрации sPD-L1 в контроле была статистически значимо выше, чем в общей группе больных новообразованиями толстой кишки (9,9 и 8,3 пг/мл соответственно, $p=0,006$). При этом медианы sPD-L1 в сыворотке крови больных доброкачественными новообразованиями толстой кишки и колоректальным раком не отличались и составили 8,1 и 8,3 пг/мл соответственно ($p>0,05$).

Кроме того, нами обнаружено, что медианы концентраций sPD-L1 статистически значимо ниже у женщин по сравнению с мужчинами как в группе контроля (15,0 и 8,9 пг/мл соответственно), так и в группе больных новообразованиями толстой кишки (9,2 и 7,6 пг/мл соответственно) и не зависели от характера выявленной опухоли, будь то рак или доброкачественная опухоль ($p<0,05$).

Нами также не выявлено связи между уровнями sPD-L1 и возрастом больных опухолями толстой кишки, вместе с тем, концентрации лиганда sPD-L1 были статистически значимо связаны с наименьшим ($r_s=0,32$; $p=0,04$) и наибольшим размером новообразования толстой кишки прямой корреляционной зависимостью ($r_s=0,31$; $p=0,02$). Следует отметить, что у больных мужчин выше указанные зависимости были более выраженными и равнялись соответственно ($r_s=0,44$; $p=0,04$) и ($r_s=0,46$; $p=0,007$).

При этом уровни sPD-L1 сыворотки крови не отражали гистологический вариант строения новообразования толстой кишки и ее локализацию в разных анатомических отделах толстой кишки. Однако наименьшая медиана концентрации маркера была выявлена у больных с локализацией новообразования в ректосигмоидном отделе толстой кишки

(4,9 пг/мл), а наибольшая – в восходящем отделе ободочной кишки (9,9 пг/мл).

Следует также отметить, что концентрации sPD-L1 статистически значимо повышались при увеличении критерия T системы TNM с 7,1 пг/мл при T1 до 9,7 пг/мл при T4 ($p=0,02$), но не были связаны с критериями N (с 7,6 пг/мл - при N0 и 9,3 пг/мл - при N2; $p=0,11$) и M (7,5 пг/мл - при M0 и 9,4 пг/мл - при M1; $p=0,19$), степенью дифференцировки колоректального рака.

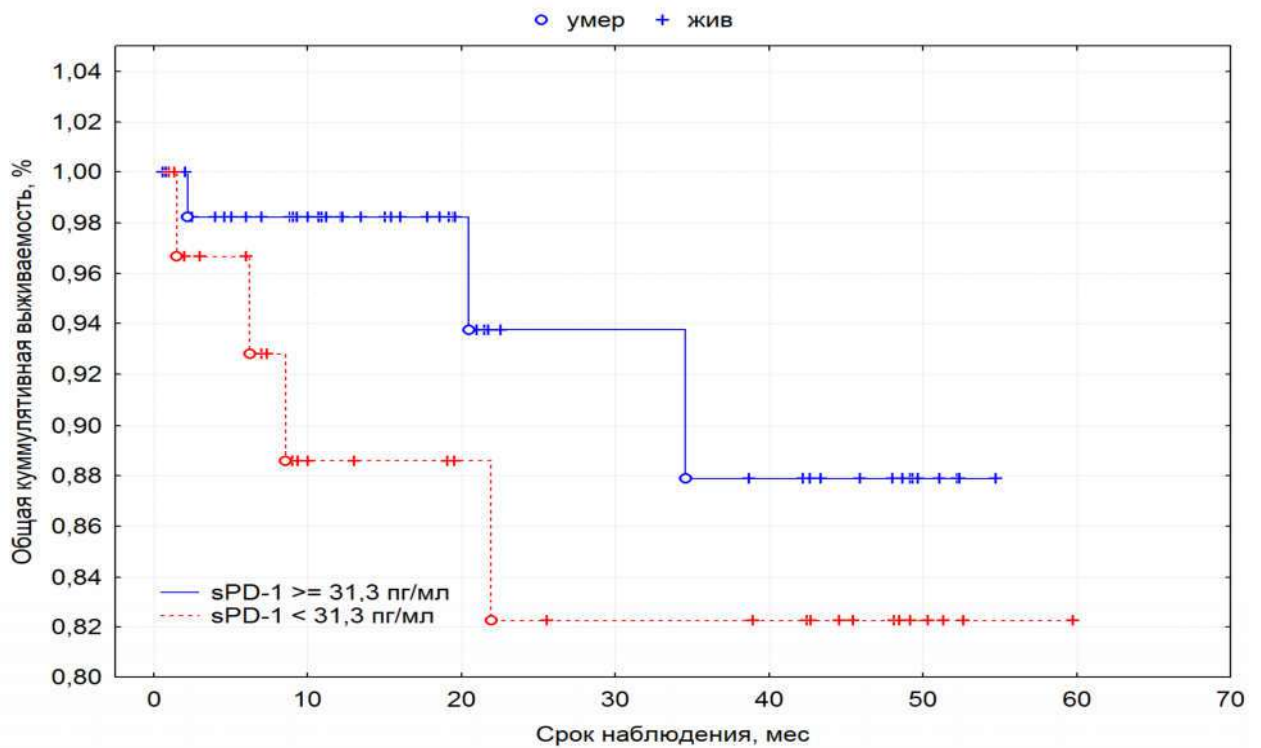
Вместе с тем, в общей группе больных аденокарциномой толстой кишки уровни sPD-L1 статистически значимо повышались в сыворотке крови при выявлении метастазов (7,5 пг/мл - при их отсутствии и 9,4 пг/мл - при их наличии; $p=0,01$), поэтому высокие значения сывороточного маркера следует считать неблагоприятным фактором.

Подводя итоги анализа концентраций sPD-1 у здоровых доноров и больных новообразованиями толстой кишки выявлено, что медиана концентрации sPD-1, как и sPD-L1 в группе контроля (здоровые доноры) была статистически значимо выше, чем у больных новообразованиями толстой кишки (51,3 и 37,0 пг/мл соответственно; $p=0,007$). При этом медианы рецептора sPD-1 у больных доброкачественными опухолями толстой кишки и колоректальным раком не отличались (32,8 и 38,0 пг/мл соответственно, $p>0,05$), не зависели от пола во всех обследованных группах, но были связаны с возрастом больных опухолями толстой кишки прямой корреляционной зависимостью ($r_s=0,26$; $p=0,002$): медиана маркера sPD-1 значимо повышалась с возрастом пациентов (в возрасте 40-49 лет - 32,2 пг/мл; в возрасте от 80 лет и старше - 43,9 пг/мл; $p=0,019$). При этом уровни sPD-1 не отражали гистологический вариант строения опухоли толстой кишки и ее локализацию. Показано, что уровни sPD-1 не отражали критерии T, N, M и степень дифференцировки опухоли. В группе контроля выявлена положительная корреляционная зависимость между концентрациями изученных маркеров sPD-1 и sPD-L1 ($r_s=0,35$; $p=0,07$), при

доброкачественных опухолях эта зависимость отсутствовала, а у больных колоректальным раком была положительной и статистически значимой ($r_s=0,37$; $p<0,0001$), ослабевающая до незначимой величины при критериях G-3, T4, N2 и M1.

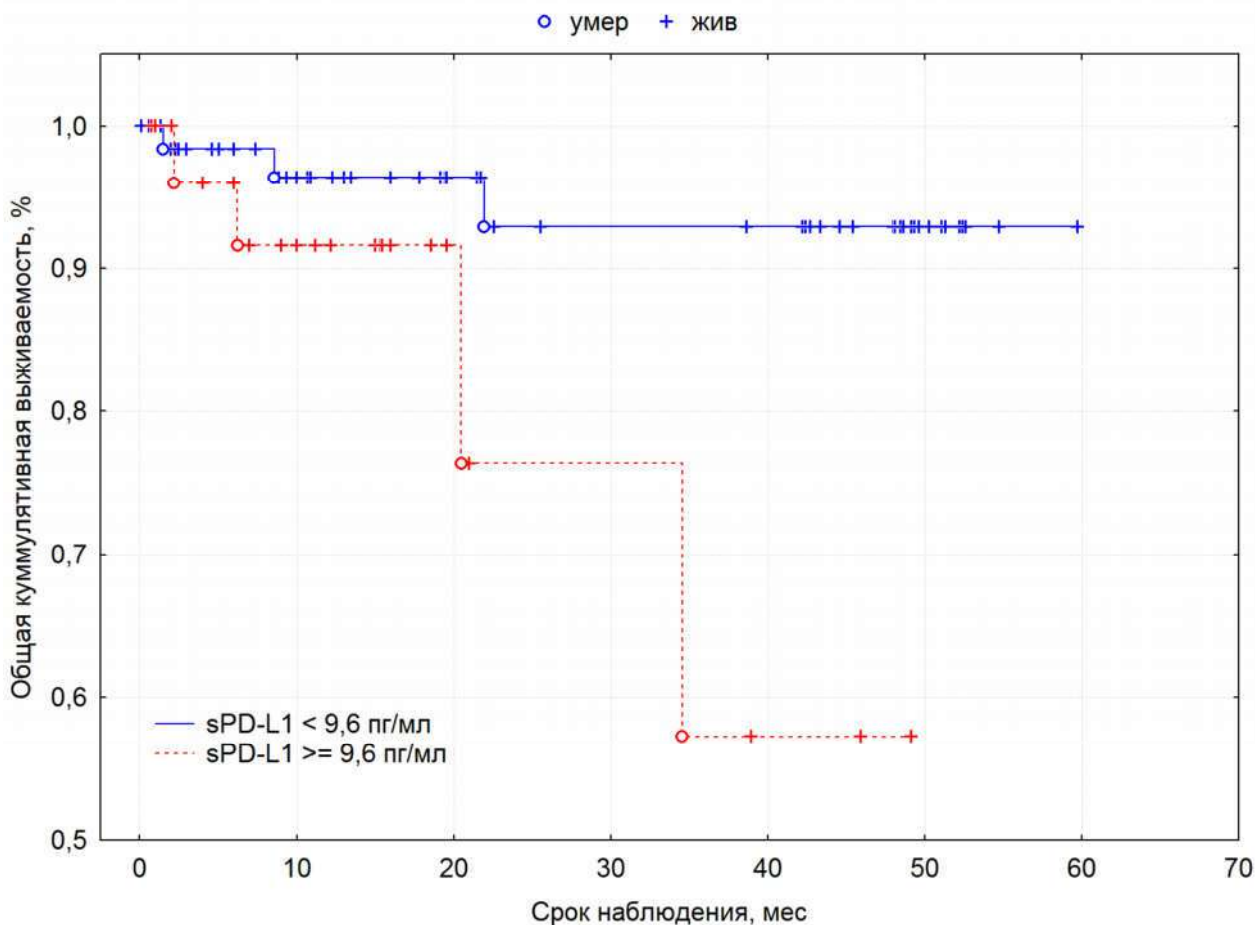
3.5. Отдаленные результаты лечения больных колоректальным раком.

Провели анализ общей выживаемости у 103 больных колоректальным раком с учетом исходных уровней sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови. Данные представлены на рисунках 25 и 26.



P=0,24

Рисунок 25. Общая выживаемость больных колоректальным раком с учетом порогового уровня sPD-1 (31,3 пг/мл) в сыворотке крови.



P<0,05

Рисунок 26. Общая выживаемость больных колоректальным раком с учетом порогового уровня sPD-L1 (9,6 пг/мл) в сыворотке крови.

Как видно из данных, представленных на рисунке 25, нами не выявлено статистически значимой зависимости показателей общей выживаемости больных колоректальным раком при учете исходного порогового уровня растворимой формы рецептора программируемой гибели клеток sPD-1 (<31,3 пг/мл и ≥31,3 пг/мл; p>0,24) в сыворотке крови обследованных пациентов (рисунок 25).

В то же время у больных колоректальным раком при пороговом уровне концентрации лиганда sPD-L1 в сыворотке крови ≥9,6 пг/мл отмечено статистически значимое снижение показателей общей выживаемости (p<0,05) по сравнению с пациентами, у которых выявлены концентрации

sPD-L1 <9,6 пг/мл ($p < 0,05$). Данные этого вывода представлены на рисунке 26.

3.6. Иммуногистохимический анализ экспрессии PD-L1 в опухоли и строме больных колоректальным раком

Данный раздел работы посвящен иммуногистохимическому исследованию экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и микроокружении (строме) опухоли у больных аденокарциномой толстой кишки.

Обнаружено, что в опухолевых клетках PD-L1 экспрессируется в 26% случаев (22 из 85). В 55 образцах из 85 (64,7 %) была выявлена экспрессия PD-L1 в микроокружении (в стромальных клетках) опухоли. При этом 35,3% образцов (30 из 85) составили группу с низкой экспрессией PD-L1+ на клетках стромы и 29,4% образцов (25 из 85) составили группу с высокой экспрессией PD-L1+ на клетках стромы. Показано, что 35,3% образцов (30 из 85) не содержали PD-L1+ клеток в опухолевой строме. Пример содержания окрашенных PD-L1+ клеток в строме аденокарциномы толстой кишки представлен на рисунках 27 а,б,в.

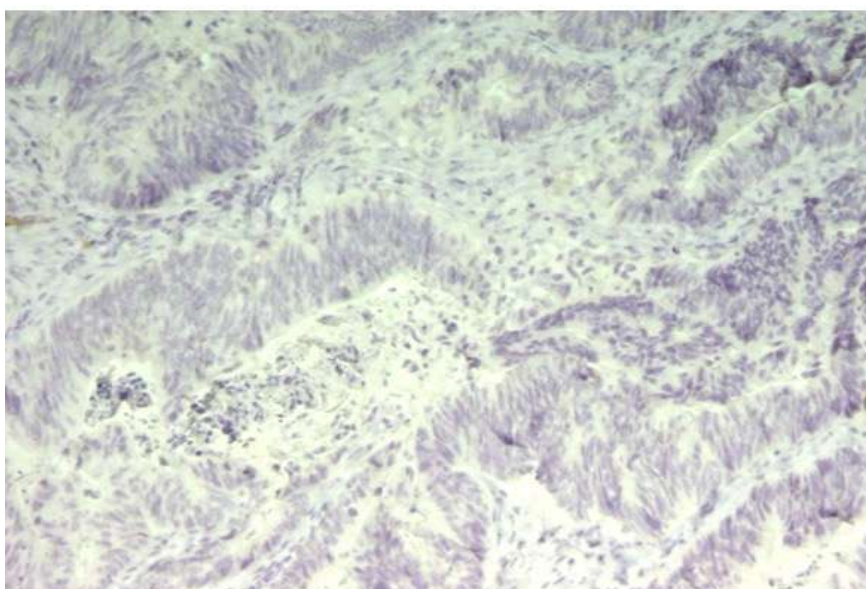


Рисунок 27а. Больной М. Возраст 73 года. Аденокарцинома толстой кишки. Отсутствие экспрессии PD-L1+ клеток в строме опухоли (ув. x100).

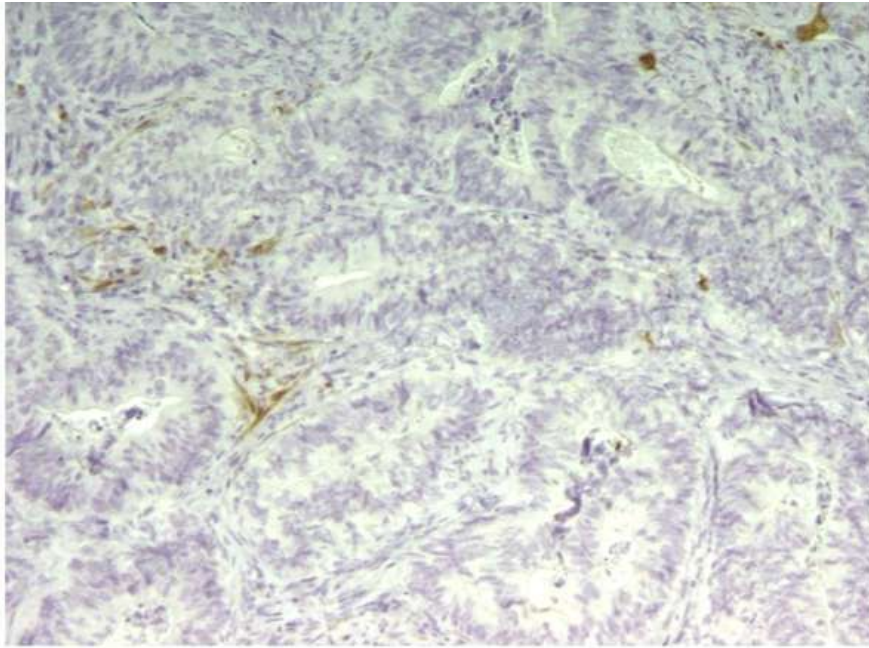


Рисунок 27б. Больная С. Возраст 66 лет. Аденокарцинома толстой кишки. Низкий уровень экспрессии PD-L1+ клеток в строме опухоли (ув. x100).

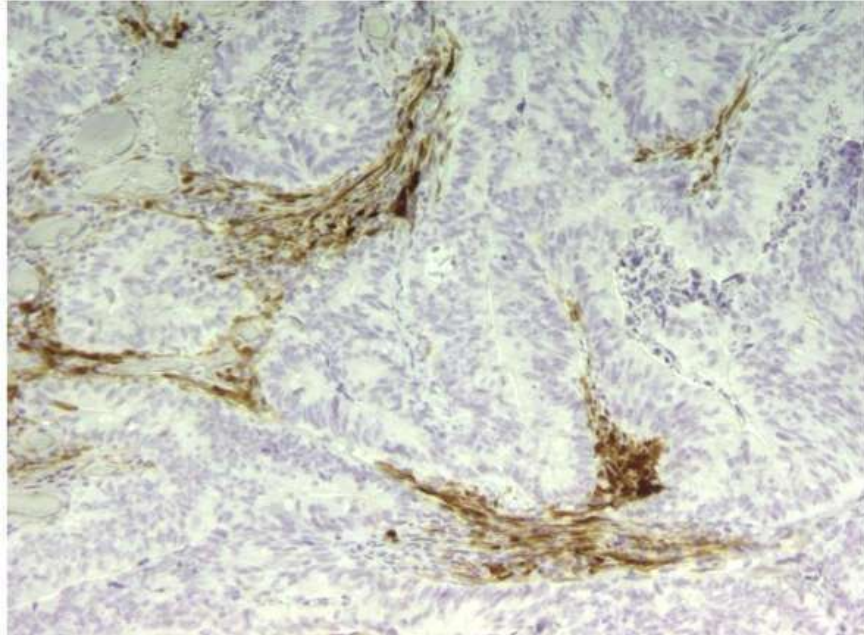


Рисунок 27в. Больная Н. Возраст 57 лет. Аденокарцинома толстой кишки. Высокий уровень экспрессии PD-L1+ клеток в строме опухоли (ув. x100).

Провели анализ ассоциации уровней экспрессии PD-L1 в опухолях больных раком толстой кишки с учетом основных клинических и морфологических характеристик колоректального рака. Результаты представлены в таблице 20. Нами выявлено, что только содержание PD-L1+ клеток в строме опухоли ассоциировалось со стадией колоректального рака. На начальных I-II стадиях заболевания чаще наблюдали высокую инфильтрацию стромы опухоли PD-L1+ клетками по сравнению с поздними III-IV стадиями.

3.7. Корреляционные связи между растворимыми формами sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови больных раком толстой кишки и экспрессией PD-L1 в клетках опухоли и строме

Провели корреляционный анализ экспрессии исследуемых белков sPD-1 и sPD-L1 с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены в таблице 20.

Таблица 20.

Ассоциация уровня экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и строме опухоли больных колоректальным раком с учетом клинико-морфологических характеристик заболевания

Факторы	PD-L1 (опухоль)			PD-L1 (строма)		
	низкий	высокий	P	низкий	высокий	P
Возраст						
≤60	24	6	0,44	12	18	0,63
>60	39	16		18	37	
Пол						
мужской	34	12	>0,99	16	30	>0,99
женский	29	10		14	25	
Стадия						
I-II	41	16	0,66	16	41	<0,05
III-IV	22	6		14	14	
Критерий T						
T1-T2	8	19	0,60	8	19	0,63
T3-T4	14	44		22	36	
Критерий N						
No	44	18	0,40	19	43	0,20
N+	19	4		11	12	

Критерий М						
Mo	55	18	0,49	23	50	0,10
M+	8	4		7	5	
Степень дифференцировки опухоли						
G-1	15	6	0,78	19	43	0,20
G-2-3	48	16		11	12	
Локализация опухоли:						
прямая кишка	23	8	>0,99	10	21	0,81
ободочная кишка	40	14		20	34	

Как следует из представленных данных на рисунке 28, концентрации растворимых форм исследованных нами маркеров в сыворотке крови (sPD-1 и sPD-L1) статистически значимо коррелировали между собой ($r=0,34$; $p=0,001$).

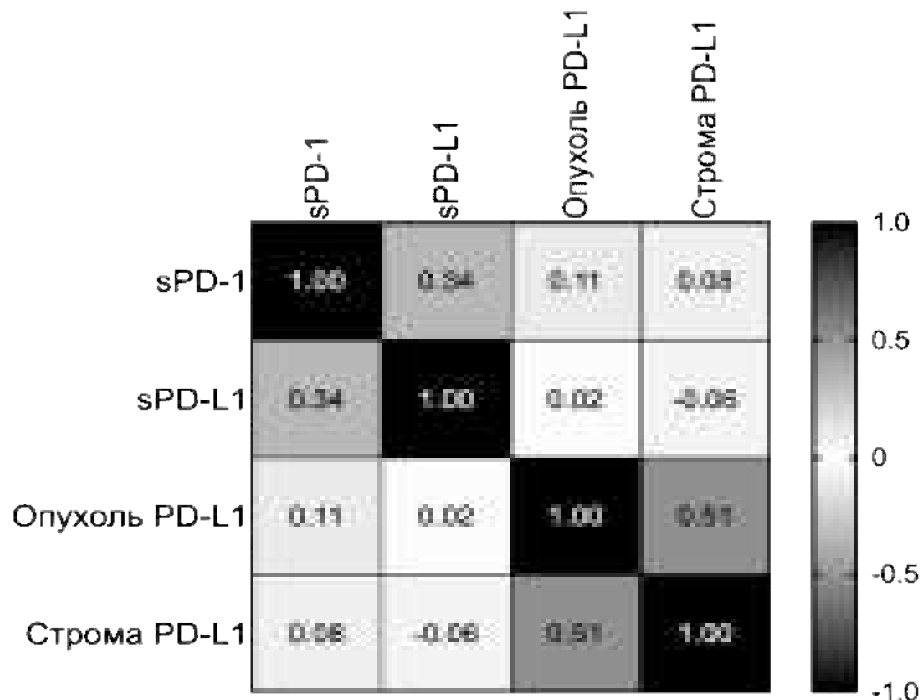


Рисунок 28. Корреляционный анализ экспрессии sPD-1 и sPD-L1 в опухоли и строме у больных колоректальным раком с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Корреляционных зависимостей между концентрациями sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком и уровнями экспрессии маркера PD-L1 в первичной опухоли нами не было выявлено. Полученные данные указывают на необходимость дополнительных исследований с целью определения их клинической роли у данной категории пациентов.

Таким образом, данные иммуногистохимического исследования экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и стромы у больных колоректальным раком, а также корреляционный анализ между концентрациями sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови и уровнями экспрессии PD-L1 в первичной опухоли и ее строме выявил определенные закономерности. На рисунках 29-32 в качестве примера представлены результаты иммуногистохимического исследования PD-L1 в строме опухоли и опухолевых клетках больных колоректальным раком.

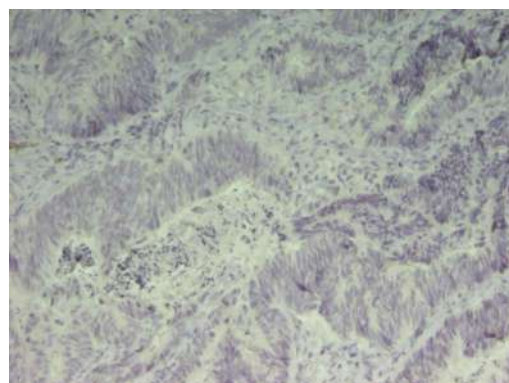
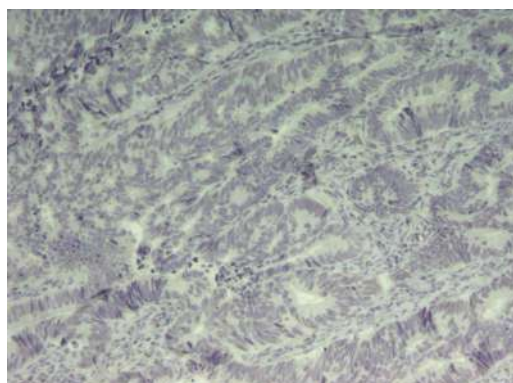


Рисунок 29. Больная А. Возраст 49 лет. Отсутствие экспрессии PD-L1 в строме опухоли и в опухолевых клетках. Ув. x 100.

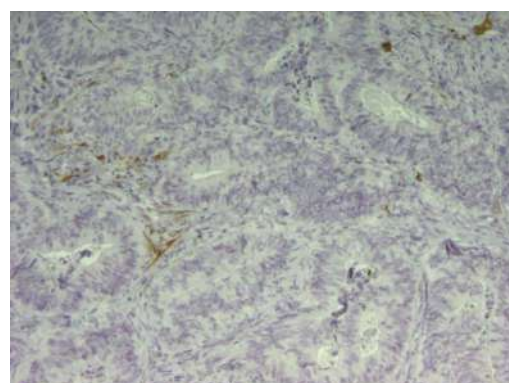
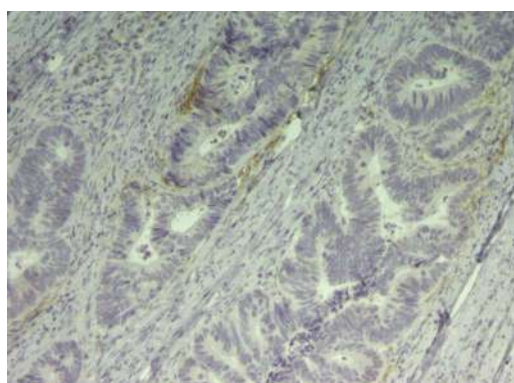


Рисунок 30. Больной В. Возраст 44 года. Низкая экспрессии PD-L1 в строме опухоли. Ув. x 100.

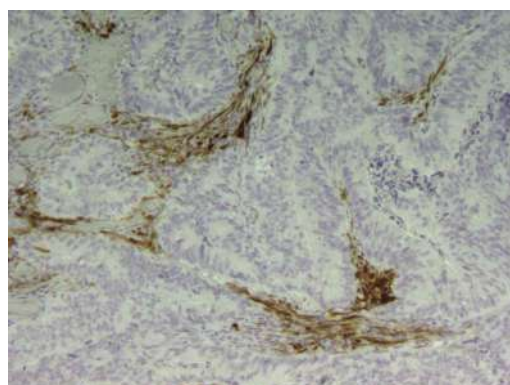
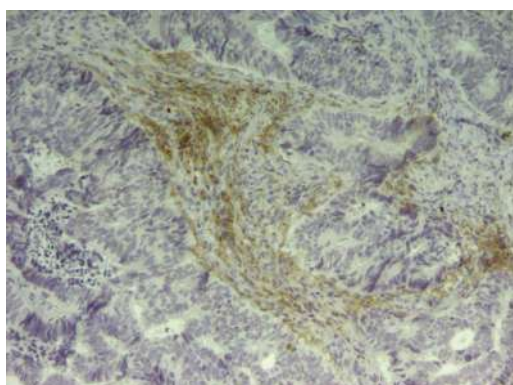


Рисунок 31. Больная С. Возраст 56 лет. Высокая экспрессии PD-L1 в строме опухоли. Ув. x 100.

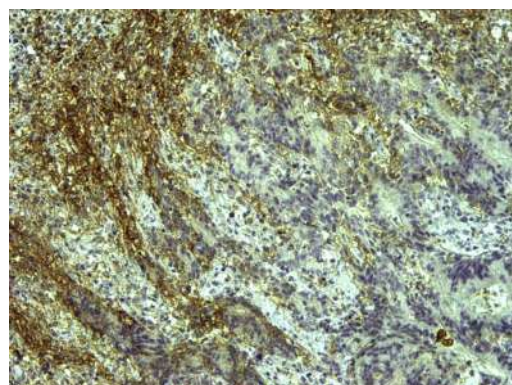
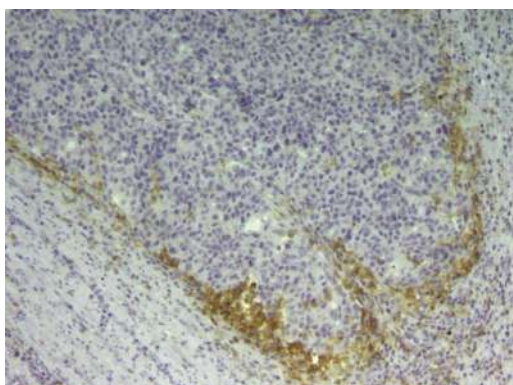


Рисунок 32. Больной Б., 42 года. Экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках. Ув. x 100.

Прежде всего, следует отметить, что экспрессия PD-L1 клетками аденокарциномы толстой кишки выявлена только в 26% наблюдений (22 из 85 опухолей). В тоже время экспрессия PD-L1+ клеток обнаружена в микроокружении (в стромальных клетках) колоректального рака в 64,7% образцов (55 из 85 образцов опухоли). При этом отмечена разная способность аденокарцином толстой кишки экспрессировать PD-L1 клетками стромы. Обнаружено, что 35,3% образцов (30 из 85) составили группу с низкой экспрессией PD-L1+ на клетках стромы, 29,4% образцов (25 из 85) составили группу с высокой экспрессией PD-L1+ клетками стромы и 35,3% образцов (30 из 85) не содержали PD-L1+ клеток в опухолевом микроокружении.

Кроме того, нами не обнаружено связи между уровнями экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и концентрациями sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком и клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Исключение составила только выявленная нами связь экспрессии PD-L1+ клеток в строме опухоли со стадией колоректального рака. При начальных I-II стадиях колоректального рака чаще наблюдали высокую экспрессию PD-L1 в клетках стромы опухоли по сравнению с поздними III-IV стадиями.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В России КРР по показателям распространенности и смертности начинает занимать лидирующие позиции среди различных опухолей [2, 11, 12, 41], а в XXI веке ожидают рост рака толстой кишки в России [9].

По данным эпидемиологических исследований ежегодно в России регистрируется 50 тыс. новых случаев КРР, а умирают около 35 тыс. человек [5].

Высокие показатели заболеваемости КРР многие исследователи связывают с тем, что его этиология и патогенез, как и большинства злокачественных опухолей, остаются не изученными, методы профилактики рака толстой кишки окончательно не разработаны. Кроме того, отсутствуют программы выявления ранних форм заболевания и это подтверждают результаты клинических наблюдений, которые указывают на факт обнаружения у 15-25% первичных больных метастатического КРР (наиболее часто в печени) [1, 12, 20, 38, 110]. Все это неблагоприятно сказывается на общем прогнозе заболевания.

Хирургический метод остается ведущим в лечении больных КРР. Кроме того, используют различные схемы химиотерапевтических препаратов, таргетную и биотерапию при распространенных формах заболевания [1, 45]. Однако низкая эффективность и побочные эффекты

лекарственных методов лечения рака толстой кишки являются важной проблемой у этих больных [32, 164]. Поэтому поиск и выявление современных биологических маркеров [23, 144] в диагностике, терапии и оценке прогноза КРР не теряет своей актуальности в настоящее время [8, 87, 118, 137, 151].

В последние годы большой интерес клиницистов и экспериментаторов прикован к изучению контрольных точек иммунитета при различных злокачественных опухолях: раке легкого [174] почки [78, 115, 116]], молочной железы [201], желудка [6, 7, 40], поджелудочной железы [207], яичников [22, 39, 162, 163, 225], саркомах костей [26], а также при раке толстой кишки [19] и опухолях у детей [17]. Это, прежде всего, связано с нарушением иммунных процессов в организме этих больных, что приводит к активации клеточной пролиферации, инвазии и метастазирования. Клинические наблюдения свидетельствуют о том, что система PD-1/PD-L1 играет важную роль в механизмах регуляции противоопухолевого иммунитета у больных КРР [6].

Особый интерес в последнее десятилетие представляют исследования растворимых форм рецептора программируемой гибели клетки sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в крови больных доброкачественными новообразованиями и раком толстой кишки в различных стадиях опухолевого процесса.

И несмотря на тот факт, что истинное происхождение этих маркеров (sPD-1, sPD-L1) в сыворотке крови пока точно не установлено, полагают, что они способны подавлять активность пути PD-1/PD-L1(2).

В проведенном нами исследовании с помощью высокочувствительного ИФА метода изучали исходные до начала специфического лечения уровни sPD-1 и sPD-L1 в крови у 37 здоровых доноров и у 160 больных различными новообразованиями толстой кишки (15 - доброкачественными новообразованиями и 145 - раком толстой кишки в различных стадиях опухолевого процесса).

Также провели анализ уровня экспрессии PD-L1 в первичных опухолях больных КРР с помощью иммуногистохимического (ИГХ) метода по стандартной методике с использованием антител к PD-L1 (клон 4E12; Р-Фарм, Россия). При этом, экспрессию PD-L1 оценивали в опухолевых клетках и строме. В зависимости от экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках образцы разделены на 2 группы: с наличием и отсутствием экспрессии PD-L1. При оценке стромы образцы опухолей разделили на 3 группы с учетом количества PD-L1+ клеток: 0 – отсутствие PD-L1+ клеток, 1 – низкое содержание PD-L1+ клеток, 2 – высокое содержание PD-L1+ клеток.

В работе использовали однофакторный и многофакторный статистический анализ полученных результатов.

В обсуждении остановимся на основных разделах проведенного нами исследования и соответствующих полученных результатах, которые могут иметь значение в клинике, а также представлять возможную перспективу для дальнейшего проведения исследований по данной проблеме.

Прежде всего, анализ полученных нами данных выявил широкие пределы колебания концентраций sPD-1 и sPD-L1 в крови здоровых людей, больных доброкачественным и злокачественными опухолями толстой кишки. При этом, обнаружено, что уровень sPD-L1 в группе здоровых людей достоверно выше, чем в общей группе больных опухолями толстой кишки (9,9 и 8,3 пг/мл соответственно). Эта же зависимость показана и для рецептора sPD-1 (51,3 и 37,0 пг/мл соответственно).

В тоже время, не установлено достоверных различий в показателях обоих маркеров между больными доброкачественными и злокачественными новообразованиями толстой кишки ($p > 0,05$). При этом, как было указано выше, концентрации исследованных маркеров в этих группах статистически значимо отличались от контроля (здоровых доноров).

Полученные в настоящем исследовании данные о снижении sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных КРР, в сравнении с результатами

исследований других авторов, не в полной мере подтверждаются ранее проведенными исследованиями при других нозологических формах онкологических опухолей.

Анализ литературы свидетельствует о том, что результаты большинства исследований sPD-1 и sPD-L1 носят противоречивый характер и все зависимости от типа опухоли. Так, например, при саркомах костей в отличие от показателей при КРР, наоборот, отмечено статистически значимое повышение концентрации лиганда sPD-L1, при этом уровень sPD-1 не отличался от здоровых людей [24]. В тоже время, у больных раком желудка и здоровых людей концентрации sPD-L1 в плазме крови не различались, концентрации рецептора sPD-1 были достоверно ниже у пациентов, чем в здоровых лиц [7]. При раке яичников уровни sPD-L1 в плазме крови также не отличались от контроля, но при доброкачественных опухолях были резко снижены в сравнении с группами контроля и злокачественными новообразованиями яичников. Содержание sPD-1 у больных раком яичников практически не отличалось от уровня маркера в плазме крови здоровых женщин. Например, при раке и доброкачественных новообразованиях почки содержание sPD-L1 в сыворотке крови было достоверно выше, чем у здоровых людей [25]. Анализ выше указанных данных указывает на связь продукции этих маркеров с иммунологическими особенностями выше указанных опухолей, а также недостаточным числом наблюдений и разными выборками пациентов. Стало быть, обнаруженные нами факты, а также данные других авторов указывают на разнонаправленный характер продукции маркеров sPD-1 и sPD-L1 у пациентов с различной онкологической патологией.

Попытка определить пороговые уровни исследованных нами маркеров в сыворотке крови больных раком толстой кишки, которые позволили бы отделить здоровых доноров группы контроля от больных опухолями толстой кишки с приемлемой точностью, не были нами обнаружены. Следовательно,

изученные нами сывороточные маркеры контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 и коэффициент их соотношения (sPD-1, sPD-L1, sPD-1/sPD-L1) не обладали диагностической ценностью при новообразованиях толстой кишки.

Анализ исходных уровней сывороточных маркеров с учетом пола здоровых доноров и больных новообразованиями толстой кишки обнаружил следующую особенность. Так, оказалось, что у женщин как в группе здоровых доноров (контроль), так и в группах пациенток с опухолями толстой кишки независимо от характера выявленного новообразования, уровни лиганда sPD-L1 были статистически значимо ниже по сравнению с мужчинами. Выявленный нами факт, может свидетельствовать о гормонозависимой продукции sPD-L1 у здоровых женщин и больных новообразованиями толстой кишки. Этот факт может свидетельствовать о гормонозависимой продукции этих маркеров, при этом в более ранних исследованиях чувствительности злокачественных опухолей толстой кишки к эстрогенам, прогестерону и андрогенам выявлена их связь с полом пациентов [3].

Подобная тенденция отмечена нами и для sPD-1 в группах здоровых доноров и больных раком толстой кишки, в отличие от доброкачественных новообразований толстой кишки. В последней группе пациентов не отмечено разницы в уровне sPD-1 в крови между мужчинами и женщинами. Стало быть, нами выявлена гендерная связь продукции sPD-1 и sPD-L1, что, вероятно, имеет тесную связь с гормонозависимостью КРР ранее доказанной при исследовании рецепторов половых стероидных гормонов в цитозольной фракции этих опухолей [3].

Следующим этапом нашей работы был анализ содержания sPD-1 и sPD-L1 с учетом возраста здоровых доноров и больных новообразованиями толстой кишки. Проведенный нами дисперсионный анализ позволил выявить тенденцию к повышению концентраций sPD-L1 в сыворотке крови с увеличением возраста обследованных здоровых доноров, больных

злокачественными и доброкачественными новообразованиями толстой кишки. Уровни sPD-1 у больных повышались независимо от характера новообразования, но незначимо при увеличении возраста пациентов. Вместе с тем, по данным T. Tominaga et al. (2019) высокие уровни лиганда sPD-L1 до лечения были ассоциированы с молодым возрастом, при этом, высокие уровни sPD-L1 после лечения проявили себя как факторы неблагоприятного прогноза безрецидивной выживаемости [197].

Рассчитали показатели корреляционной зависимости между уровнями sPD-1 и sPD-L1 в крови и возрастом обследованных здоровых людей, больных доброкачественными и злокачественными опухолями толстой кишки. Оказалось, что концентрации sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови были связаны с возрастом обследованных, но слабой прямой корреляционной зависимостью. Следует отметить, что данный факт выявлен другими авторами [68].

Наиболее важным разделом работы был анализ ассоциации исследуемых маркеров у больных новообразованиями толстой кишки с их клиническими и морфологическими характеристиками.

Поскольку у всех 145 больных КРР была выявлена аденокарцинома, то установить связь исследованных нами показателей в сыворотке крови с учетом гистологического строения опухоли не представляло возможным. Что касается двух небольших групп пациентов с доброкачественной опухолью толстой кишки: 9 больных тубулярной аденомой и 5 больных тубуло-ворсинчатой аденомой, то различий в исходных до операции уровнях sPD-1 и sPD-L1 между выше указанными группами пациентов нами не были обнаружены.

Не отмечено также связи уровней sPD-L1 с анатомической локализацией первичной опухоли в толстой кишке. Однако, у 5 больных КРР при локализации опухоли в ректосигмоидном отделе выявлены наименьшие уровни sPD-L1 (медиана 4,9 пг/мл), а наибольшие – у 15 больных с

локализацией опухоли в восходящем отделе ободочной кишки (медиана 9,9 пг/мл). Что же касается уровней рецептора sPD-1, то самые низкие его показатели обнаружены при локализации опухоли в поперечном отделе ободочной кишки (медиана 28,8 пг/мл), а наибольшие – при локализации КРР опухоли в области селезеночного изгиба ободочной кишки (медиана 61,9 пг/мл). Сделать окончательные выводы о клинической значимости исследованных растворимых форм маркеров контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в зависимости от локализации первичной опухоли в толстой кишке не представляется возможным, ввиду небольших по числу наблюдений в группах. Необходимо проведение дальнейших исследований.

Следует обратить внимание на раздел исследований, посвященных связи изученных маркеров у больных КРР с показателями системы TNM. Так, нами убедительно доказано, что концентрации sPD-L1 статистически значимо отражали критерий T ($p=0,022$). Например, медианы показателя sPD-L1 при распространенности процесса T1 равнялись 7,1 пг/мл, повышались при распространенности T3 до 8,1 пг/мл и были наибольшими при распространенности T4 (9,7 пг/мл). Полученные нами результаты находят подтверждение в работах других авторов [7, 25, 68].

Следует отметить аналогичную связь исходных уровней sPD-L1 с выявлением метастазов в регионарных лимфоузлах, однако эта зависимость имела только тенденцию: 7,6 пг/мл - при N0, 9,2 пг/мл - при N1 и 9,3 пг/мл - при N2 ($p=0,11$). Сходная закономерность отмечена нами и при обнаружении метастазов КРР в отдаленных органах: 8,1 пг/мл - при отсутствии отдаленных метастазов и 9,4 пг/мл - при их выявлении ($p=0,19$). Необходимо подчеркнуть, что в группе из 9 больных КРР с наименьшей распространенностью опухолевого процесса T1-T2N0M0 выявлены наиболее низкие уровни sPD-L1 (медиана 7,1 пг/мл), а наибольшие уровни сывороточного маркера обнаружены у 72 пациентов с наибольшими размерами первичной опухоли (T4) либо с наличием метастазов в

регионарных лимфоузлах (N+) или с наличием метастазов в отдаленных органах (M+). На основании представленных нами данных можно заключить, что распространенность рака толстой кишки сопровождается увеличением в сыворотке крови уровней лиганда sPD-L1 и этот маркер следует считать неблагоприятным фактором у данной категории больных. В отличие от лиганда, концентрации сывороточного рецептора sPD-1 у больных раком толстой кишки не отражали значимо критерии системы TNM. Следует отметить, что некоторые авторы выявили увеличение продукции sPD-L1 в плазме крови с увеличением стадии рака желудка [7].

Не отмечено зависимости исходных концентраций изученных маркеров sPD-1 и sPD-L1 со степенью дифференцировки рака толстой кишки, однако это подтверждается не всеми авторами. Так, например, в работе Y. Li et al. (2019) зависимость степени дифференцировки КРР и уровней выше указанных маркеров в сыворотке крови носила обратный характер у больных КРР [129]. В немногочисленных исследованиях у больных раком яичников также показана положительная ассоциация экспрессии PD-1 и/или PD-L1 с распространенностью и степенью дифференцировки опухоли [64, 72].

Вместе с тем, нами выявлены при низкодифференцированной аденокарциноме толстой кишки (G-3) наиболее низкие показатели медиан рецептора sPD-1 (7,5 пг/мл) и его лиганда sPD-L1 (35,9 пг/мл) в сыворотке крови. Кроме того, со степенью дифференцировки КРР связан коэффициент соотношения sPD-1/sPD-L1. Так, нами выявлено статистически значимое снижение медианы коэффициента соотношения sPD-1/sPD-L1 с 5,6 до 4,5 и до 4,4 пг/мл соответственно в группах пациентов со степенью дифференцировки первичной опухоли G-1, G-2 и G-3 соответственно ($p=0,013$). Необходимо отметить, что при низкодифференцированной аденокарциноме толстой кишки (G-3) у пациентов обнаружены наиболее низкие показатели рецептора sPD-1 (7,5 пг/мл) и его лиганда sPD-L1 (35,9 пг/мл). Следовательно, при наиболее агрессивных

низкодифференцированных опухолях толстой кишки (G-3) отмечено снижение продукции sPD-1 и sPD-L1. Выявленный нами факт, вероятно, связан и характерен для опухолевой прогрессии.

Особо необходимо отметить корреляционную связь между концентрациями sPD-1 и sPD-L1 в обследованных нами групп: здоровых люди, больные доброкачественными и злокачественными опухолями толстой кишки. В группе контроля у 37 здоровых доноров эта связь между концентрациями маркеров была положительной, но слабой ($r_s=0,35$; $p=0,07$), у больных доброкачественными опухолями толстой кишки такая зависимость отсутствовала, а при КРР была прямой и статистически значимой ($r_s=0,58$; $p=0,001$). Однако в последней группе пациентов данная связь между сывороточными маркерами заметно ослабевала по мере снижения степени дифференцировки опухоли ($r_s=0,14$; $p>0,05$). Таким образом, при прогрессировании КРР в организме пациентов отмечается дисбаланс в продукции sPD-1 и sPD-L1. Механизм этого дисбаланса до конца не изучен.

Нами проведен анализ общей выживаемости 103 из 145 (прослеженность 71%, сроки наблюдения от 5 до 60 месяцев) первичных больных раком толстой кишки с учетом исходных уровней изученных маркеров. К сожалению мы не обнаружено достоверной зависимости показателей общей выживаемости больных КРР от исходного уровня рецептора программируемой гибели клеток sPD-1 ($<31,3$ пг/мл и $\geq 31,3$ пг/мл; $p>0,95$). Пороговым уровнем этого маркера послужил уровень маркера 31,3 пг/мл.

Вместе с тем, у больных КРР нами отмечена связь высоких уровней лиганда с показателями общей выживаемости. Так, выявлено, что высокие ($\geq 9,6$ пг/мл) до лечения уровни лиганда sPD-L1 в сыворотке крови больных КРР статистически значимо связаны с неблагоприятным прогнозом общей выживаемости.

В работе T. Tominaga et al. (2019) выявили изменения уровней sPD-L1 и sPD-1 после проведенного лечения у больных КРР и показали их связь с клинико-патологическими характеристиками и безрецидивной выживаемостью онкологических больных пациентов [197].

Интерес представлял раздел по исследованию методом ИГХ экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках первичных новообразований толстой кишки и в клетках стромы (микросреде) опухоли больных КРР. Так, нами обнаружено, что в опухолевых клетках рака толстой кишки PD-L1 экспрессируется в 26% случаев, что также подтверждают исследования других авторов [49, 203].

Кроме того, в исследованных нами образцах КРР в 35,3% образцов не выявлено PD-L1+ клеток в опухолевой строме. В 35,3% образцов (30 из 85) отмечено наличие PD-L1+ клеток в строме, что составило группу с низкой продукцией PD-L1+ клеток и 29,4% образцов (25 из 85) составили группу с высоким обнаружением в строме PD-L1+ клеток. Полученные нами результаты согласуются с результатами исследования других авторов [43]. Эти авторы, используя образцы только целых срезов, провели тщательный анализ количества иммунных клеток, экспрессирующих PDCD1 и CD274. При этом, перекрытие экспрессии CD274 в опухолевых и иммунных клетках было почти полным (95%). Исследователи отметили, что оценка иммунных клеток и положительная экспрессия CD274/PDCD1 значительно чаще выявлялась при высокой микросателлитной нестабильности опухоли, чем при опухолях с хорошей репарацией несовпадений (70% против 41% (высокий показатель иммунных клеток); 81% против 49% (PDCD1high), 23% против 1% (CD274 на опухолевых клетках) и 68% против 30% (CD274 на иммунных клетках) ($p < 0,001$) и были сильно связаны друг с другом. Другие исследователи изучали экспрессию PD-L1 в неопластических клетках (NC) и иммунных клетках (лимфоцитах), опухоль инфильтрирующих иммунных клетках (ИИК). Все образцы PD-L1+ на NC также были на ИС. Три типа

раковых заболеваний можно сгруппировать: группа А (NCs- / ICs-); группа В (NCs- / ICs+); группа С (NC+ / IC+). К группе А относятся опухоли, характеризующиеся слабоиммуногенной компетентностью, слабый иммунный ответ, но массивный инфильтрат гранулоцитов, оправдание отсутствие PD-L1 в качестве рецептора иммуноингибитора. К группе В, вероятно, принадлежат больше иммуногенных CRC, оправдывая сильный иммунный ответ, опосредованный ICs, и повышающая регуляция экспрессии PD-L1 только на IC. К группе С принадлежат, вероятно, CRC характеризуется большим количеством неоантигенов опухоли, что приводит к выраженной инфильтрации лимфоцитов и активации PD-L1 также в NC.

Нами был проведен анализ ассоциации уровней экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и клетках стромы, с учетом основных клинических и морфологических характеристик рака толстой кишки. При этом не выявили связи между уровнем экспрессии PD-L1 в клетках опухоли с клинико-морфологическими характеристиками КРР.

Кроме того, мы не обнаружили связей между концентрациями sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови и показателями экспрессии PD-L1 в клетках опухоли больных КРР. Полагаем, что отсутствие корреляций между растворимыми формами белков (sPD-1, sPD-L1) и тканевой формой PD-L1 (экспрессией в опухоли) исследованных нами маркеров указывает на наличие независимых механизмов иммуносупрессии при КРР, что может объяснять неэффективность иммунотерапии при определенных типах этих опухолей.

Вместе с тем, нами обнаружено, что уровень экспрессии PD-L1+ клеток в строме опухолей был ассоциирован только со стадией КРР. На начальных I-II стадиях заболевания чаще наблюдали высокую инфильтрацию стромы опухоли PD-L1+ клетками, по сравнению с поздними III-IV стадиями.

В определенной степени, полученные нами результаты подтверждены в работе [129]. Авторы этого исследования провели всесторонний поиск в базах данных Medline / PubMed, Embase, Cochrane Library, Web of Science

(WoS) и Scopus с указанием типа опухоли, количества случаев, метода окрашивания, пороговых значений, положительной экспрессии PD-L1, клинико-патологических параметров, при этом статистический метаанализ результатов и их оценку проводили с использованием Review Manager версии 5.3 (Revman, Cochrane Collaboration; Оксфорд, Англия) и STATA версии 14 (Stata Corporation; College Station, TX, США). На основании этого исследования Y. Li et al. (2019) сделали убедительный вывод о том, что экспрессия PD-L1 не зависела от пола, возраста, размера опухоли, стадии опухолевого процесса, наличия метастазов в регионарных лимфоузлах [129]. При этом, проведенный метаанализ показал, что высокий уровень экспрессии PD-L1 в опухоли может быть биомаркером плохого прогноза у больных КРР. Авторы полагают, что эта информация может быть полезна для практических онкологов при стратификации пациентов с КРР для анти-PD-1/PD-L1 терапии, особенно у пациентов с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H).

В другом исследовании была выявлена связь уровней экспрессии PD-L1 в первичной опухоли больных КРР с прогнозом общей выживаемости, наилучшие показатели отмечены у больных с низким уровнем экспрессии лиганда [221]. В работе J. Verntsson et al. (2018) с использованием одномерного и многомерного регрессионного анализа Кокса с поправкой на возраст, пол, стадию TNM, степень дифференцировки опухоли и сосудистую ее инвазию, авторы убедительно доказали влияние экспрессия биомаркера на 5-летнюю общую выживаемость не только во всей исследованной когорте, но и при анализе подгрупп пациентов с локализацией в правых и левых отделах толстой кишки, а также прямой кишки [49]. J. Verntsson et al. (2018) показали, что высокая экспрессия PD-L1 на инфильтрирующей опухоли иммунных клетках может служить независимым фактором пролонгированной общей выживаемости, как во всей когорте, так и при локализации опухоли в правой и левой половине ободочной кишки, но не при раке прямой кишки [49].

Провели корреляционный анализ экспрессии исследуемых белков с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Как следует из полученных нами данных, концентрации растворимых форм исследованных нами маркеров (sPD-1, sPD-L1) статистически значимо коррелировали между собой ($r=0,34$; $p=0,001$). Статистически значимых корреляционных зависимостей не выявлено между концентрациями sPD-L1 в сыворотке крови больных КРР и уровнями экспрессии этого маркера в первичной опухоли.

Таким образом, анализ растворимых форм рецептора PD-1 и его лиганда sPD-L1 у больных КРР выявил определенные закономерности и прежде всего их связь с некоторыми клиническими и морфологическими признаками заболевания, а также общим прогнозом. Однако, полученные нами данные указывают на необходимость дальнейших исследований с целью подтверждения возможности использования исследованных маркеров в онкологической клинике.

ВЫВОДЫ

1. Концентрации sPD-L1 и sPD-1 в сыворотке крови здоровых людей достоверно выше, по сравнению с больными колоректальным раком и не отличались при доброкачественных и злокачественных опухолях толстой кишки.

2. Выявлено, что концентрации sPD-L1 были достоверно ниже у женщин, по сравнению с мужчинами, как в контроле, так и у больных новообразованиями толстой кишки независимо от характера выявленной опухоли.

3. Показано, что уровни sPD-L1 связаны прямой корреляционной зависимостью с возрастом пациентов и размером опухоли, не отражали гистологическое строение и степень дифференцировки колоректального рака, не были связаны с критериями N и M, однако достоверно повышались при выявлении метастазов, что позволяет заключить о неблагоприятном значении высоких уровней сывороточного маркера sPD-L1.

4. Концентрации sPD-1 не зависели от пола во всех обследованных группах пациентов и здоровых доноров, но были связаны прямой корреляционной зависимостью с возрастом больных опухолями толстой кишки, не отражали ее морфологию и степень дифференцировки, а также критерии системы TNM и ее локализацию в толстой кишке.

5. Обнаружена прямая статистически значимая ассоциация между концентрациями sPD-1 и sPD-L1, которая ослабевала до незначимой величины при G-3, T4, N2, M1 в группе больных колоректальным раком.

6. Выявлена экспрессия PD-L1 в 26% клеток опухоли больных колоректальным раком, уровни которой ассоциировали только со стадией новообразования. Высокая инфильтрация PD-L1+ клеток стромы опухоли обнаружена в 29% образцов и низкая - в 35% и коррелировали только со стадией заболевания: при начальных I-II стадиях колоректального рака чаще

наблюдали высокую экспрессию PD-L1 в клетках стромы опухоли по сравнению с поздними III-IV стадиями.

7. Не обнаружено достоверной ассоциации между концентрациями sPD-L1 и уровнями экспрессии PD-L1 в опухоли больных колоректальным раком.

8. Установлено, что с неблагоприятным прогнозом общей выживаемости больных КРР связаны высокие ($\geq 9,6$ пг/мл) до лечения уровни лиганда sPD-L1.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Врачам клинической лабораторной диагностики, онкологам, работающим в специализированных онкологических стационарах, рекомендуется:

1. Использовать значение содержания sPD-L1 в сыворотке крови пациентов с колоректальным раком до лечения $\geq 9,6$ пг/мл в качестве маркера оценки прогноза общей выживаемости, так как это значение является независимым фактором неблагоприятного прогноза.

2. Включить в программы аспирантуры и ординатуры по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» курс лекций и семинары, посвященных клиническому значению определения контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 и ее растворимых форм при онкологических заболеваниях, в том числе у больных колоректальным раком.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Данные о клинико-диагностической значимости растворимых форм контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1, полученные в результате диссертационного исследования, формируют основу для дальнейших перспективных исследований по использованию данных маркеров в диагностике и оценке прогноза при колоректальном раке, а также для определения эффективности терапии опухолей толстой кишки.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АКТ – протеинкиназа В

МНС – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС)

ОВ – общая выживаемость

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

КРР – колоректальный рак

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

ПКР – почечно-клеточный рак

РМЖ – рак молочной железы

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

АРС – антигенпрезентирующие клетки (antigen-presenting cell, APC)

CRAG – генетически модифицированный химерный антиген-рецептор

CTLA-4 – цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4 – CD152

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

HSCT – гемопоэтические стволовые клетки

irAE – (immune-related adverse event) (неблагоприятное событие, связанное с иммунитетом)

Jak2 – Janus киназа 2

MSI-H – высокая микросателлитная нестабильность

mTOR – мишень рапамицина для млекопитающих

PD-1 – (programmed cell death receptor) рецептор программируемой гибели клетки

PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1

PI3K – фосфатидилинозитол-3 киназа

sPD-1 – programmed cell death pathway 1 (растворимая форма рецептора программируемой клеточной гибели)

sPD-L1 – растворимая форма лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1

Stat3 – преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3

TAA – опухолевые антигены

TCR – T-клеточный рецептор (T-cell receptor, TCR)

TIC – иницирующие опухолевые клетки

TIL – инфильтрирующие опухоль лимфоциты

TIMP-1 – тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы 1

TIMP-2 – тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы 2

Treg – регуляторные T-лимфоциты

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиев, В.А. Метастатический колоректальный рак. Эволюция лечебных подходов: взгляд хирурга-онколога / В.А. Алиев, З.З. Мамедли, Ю.А. Барсуков, З.А. Дудаев, П.А. Тихонов, Д.В. Подлужный, С.Г. Гайдаров / Тазовая хирургия и онкология. – 2021. – Том 11, № 1. – С. 42–59.
2. Барсуков, Ю.А. Рак прямой кишки и анального канала: перспективы комбинированного лечения / Ю.А. Барсуков, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России // М. – ООО «МК». – 2019. – 856 с.
3. Бассалык, Л.С. Рецепторы стероидных гормонов в опухолях человека / Л.С. Бассалык (Под ред.) // М. – Медицина. – 1987. – 190 с.
4. Волков, Н.В. Иммуноterapia / Н.В. Волков // Практическая онкология. – 2018. – Том 19, № 3. – С. 226-233.
5. Гарин, А.М. Заболеваемость, смертность, отдаленные результаты и последствия лечения онкологических больных в разных странах мира / А.М. Гарин, И.С. Базин // Российский онкологический журнал. – 2016. – Том 21, № 1-2. – С. 11–18.
6. Герштейн, Е.С. Клиническое значение белка программируемой клеточной гибели PD-1 и его лиганда PD-L1 / Д.Н. Кушлинский, И.В. Терешкина, Д.О. Уткин, Н.Е. Кушлинский // Технологии живых систем. – 2020. – Том 17, № 3. – С. 5–15.
7. Герштейн, Е.С. Растворимые формы PD-1 и PD-L1 в плазме крови больных раком желудка и их связь с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания / Н.А. Огнерубов, В.Л. Чанг, В.В. Делекторская, Е.А. Короткова, Н.Ю. Соколов, С.Б. Поликарпова [соавт.] // Клин. Лаб. Диагн. – 2020. – Том 65, № 6. – С. 347–352.
8. Герштейн, Е.С. Сигнальная система инсулиноподобных факторов роста как мишень противоопухолевой терапии / В сборнике материалов XXIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» / Е.С. Герштейн, Н.Е. Кушлинский // М. – Видокс. – 2016. – С. 15.

9. Давыдов, М.И. Онкология. Клинические рекомендации / Под ред. М.И. Давыдова // М. – Издательская группа РОНЦ. – 2015. – 680 с.
10. Дайджест. Авастин. Новое показание к применению препарата: данные доказательной медицины // Клиническая онкология. – 2015. – Том 19, № 3. – С. 77–79.
11. Заридзе, Д.Г. Динамика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в России / Д.Г. Заридзе, А.Д. Каприн, И.С. Стилиди // Вопросы онкологии. – 2018. – Том 64, № 5. – С. 578–590.
12. Заридзе, Д.Г. Профилактика злокачественных новообразований / Д.Г. Заридзе, Д.М. Максимович // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – Том 4, № 4. – С. 8–25.
13. Имянитов, Е.Н. Фундаментальная онкология в 2020 году: обзор наиболее интересных открытий / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. – 2021. – Том 22, № 1. – С. 1-8.
14. Кадагидзе, З.Г. Иммунная система и рак / З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова // Практическая онкология. – 2016. – Том 17, № 2. – С. 62–73.
15. Камышов, С.В. Механизмы иммунных нарушений у пациентов с раком яичников, получавших химиотерапию, и их динамика на фоне иммунотерапии / С.В. Камышов // Евразийский онкологический журнал. – 2018. – Том 6, № 2. – С. 563–565.
16. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ России. – 2019. – 236 с.
17. Киселевский, М.В. Прогностические биомаркеры эффективности иммунотерапии злокачественных новообразований ингибиторами контрольных точек иммунного ответа / М.В. Киселевский, И.В. Самойленко, О.В. Жаркова, Н.В. Зиганшина, А.А. Петкевич, С.М. Ситдикова [соавт.] //

русский журнал детской онкологии и гематологии. – 2021. – Том 8, № 2. – С. 73–83.

18. Ключагина, Ю.И. Роль рецептора PD1 и его лигандов PDL1 и PDL2 в иммунотерапии опухолей / Ю.И. Ключагина, З.А. Соколова, М.А. Барышникова // Онкопедиатрия. – 2017. – Том 4, № 1. – С. 49–55.

19. Ковалева, О.В. Факторы иммуносупрессии PD-1, PD-L1, IDO1 и колоректальный рак / О.В. Ковалева, М.А. Рашидова, А.Н. Грачев, В.В. Масленников, И.В. Булычева, Е.С. Герштейн [соавт.] // Доклады Российской Академии Наук. Наука о жизни. – 2021. – Том 497. – С. 160–164.

20. Колесник, Е.А. Рак толстой кишки: факторы риска вопросы скрининга / Е.А. Колесник // Здоровая Украина. – 2007. – № 11. – С. 24–26.

21. Кондакова, И.В. Внутриклеточные протеолитические системы: новый класс маркеров для ранней диагностики и прогноза течения злокачественных опухолей / И.В. Кондакова, Е.Е. Шашова, Л.В. Спирина, Е.С. Колегова, Н.В. Юнусова // Злокачественные опухоли. – 2017. – Том 7, № 3, Спецвыпуск 1. – С. 47–51.

22. Короткова Е.А. Клиническая и прогностическая значимость растворимой формы контрольной точки иммунитета sB7-H3 у больных раком яичников / Е.А. Короткова, Т.П. Белова, О.В. Ковалева, Д.Н. Кушлинский, Д.О. Уткин, И.В. Терешкина [соавт.] / В материалах XXVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая лаборатория: от аналитики к диагнозу» // Клин. Лаб. Диагн. – 2021. – Том 66, № 4. – С. 32.

23. Кушлинский, Н.Е. Молекулярные механизмы опухолевого роста / Н.Е. Кушлинский, М.В. Немцова // Патогенез. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 4–14.

24. Кушлинский, Н.Е. (Под ред.) Биологические маркеры опухолей: фундаментальные и клинические исследования / Н.Е. Кушлинский, М.А. Красильников (Под ред.) // М. – Издательство РАМН. – 2017. – 632 с.

25. Кушлинский, Н.Е. Современные подходы к иммунотерапии рака почки / Н.Е. Кушлинский, М.В. Фридман, А.А. Морозов, Е.С. Герштейн, З.Г. Кадагидзе, В.Б. Матвеев // Онкоурология. – 2018. – Том 14, № 2. – С. 116–129.

26. Кушлинский, Н.Е. Ключевые компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови при опухолях костей / Н.Е. Кушлинский, А.А. Алферов, Ю.С. Тимофеев, Е.С. Герштейн, И.В. Булычева, А.В. Бондарев [соавт.] // Бюлл. Экспер. Биол. Мед. – 2020. – Том 170, № 7. – С. 79–83.

27. Малихова, О.А. Кишечный микробиом и колоректальный рак. Обзор литературы / О.А. Малихова, И.А. Карасев, Т.С. Давыдкина, В.В. Верещак, А.Г. Малихов, А.О. Туманян // Поволжский онкологический вестник. – 2019. – Том 41, № 4. – С. 1–6.

28. Мамаев, А.Н. Статистические методы в медицине / А.Н. Мамаев, Д.А. Кудлай // М. – Практическая медицина. – 2021. – 136 с.

29. Матвеев, В.Б. Ниволумаб – новый стандарт в лечении метастатического рака почки / В.Б. Матвеев // Онкоурология. – 2017. – Том 13, № 3. – С. 18–26.

30. Моисенко, В.М. (Под ред.). Злокачественные опухоли [спецвыпуск журнала]: Практические рекомендации Российского общества клинической онкологии. Лекарственное лечение злокачественных опухолей. Поддерживающая терапия в онкологии / В.М. Моисеенко // М. Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», 2018. – 704 с.

31. Моисеенко, Ф.В. Наноопухолевые биомаркеры / Ф.В. Моисеенко // Практическая онкология. – 2021. – Том 22, № 1. – С. 9–21.

32. Моисеенко, Ф.В. Резистентность к таргетной терапии / Ф.В. Моисеенко, В.М. Моисеенко // Практическая онкология. – 2021. – Том 22, № 2. – С. 138–164.

33. Носов, А.К. В поисках Атлантиды: предиктивные биомаркеры ответа на иммунотерапию / А.К. Носов, Н.Ф. Кротов, В.М. Беркут // Онкоурология. – 2021. – Том 17, № 1. – С. 167–177.
34. Петри, А. Наглядная медицинская статистика / А. Петри, Л. Сэбин; пер. с англ.; под ред. В.П. Леонова – 3-е изд. перераб. и доп. // М. – ГЭОТАР-Медиаю – 2019. – 216 с.
35. Проценко, С.А. Современная иммунотерапия рака почки / С.А. Проценко, А.И. Семенова, А.П. Оганесян, Е.М. Анохина, А.В. Новик // Фарматека. – 2019. – Том 26. – № 7. – С. 73-78.
36. Румянцев, А.Г. Эффективность ингибиторов контрольных точек иммунного ответа в лечении солидных опухолей / А.Г. Румянцев, С.А. Тюляндин // Практическая онкология. – 2016. – Том 17, № 2. – С. 74–89.
37. Солопова, А.Г. Возможности и перспективы иммунотерапии в онкогинекологии / А.В. Солопова, А.Ю. Власина, Н.И. Украинцев // Онкогинекология. – 2021. – № 1. – С. 4–13.
38. Станоевич, У. Колоректальный рак при ожирении: патогенетические аспекты / У. Станоевич, Е. Дехисси, В. Чхиквадзе // Врач. – 2012. – № 8. – С. 23–26.
39. Тарасова, А.В. Современные возможности применения иммунотерапии в лечении рака шейки матки / А.В. Тарасова, К.А. Ганина, М.А. Мешкова, Ю.В. Соловьева, Е.Е. Иванова, Л.Н. Акимов // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2021. – Том 17, № 2. – С. 104–111.
40. Чанг, В.Л. Концентрация рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в сыворотке крови больных раком желудка. В материалах XXVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая лаборатория: от аналитики к диагнозу» / В.Л. Чанг, Н.А. Огнерубов, Е.А. Короткова, Е.С. Герштейн, И.С. Стилиди // Клин. Лаб. Диагн. – 2021. – Том 66, № 4. – С. 71–72.

41. Чиссов, В.И. Онкология. Национальное руководство. Краткое издание / В.И. Чиссов, М.И. Давыдов (Под ред.) // М. – ГЭОТАР-Медиа. – 2017. – 624 с.

42. Abiko, K. IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer / K. Abiko, N. Matsumura, J. Hamanishi, N. Horikawa., R. Murakami, K. Yamaguchi [et al.] // Br. J. Cancer. – 2015. – Vol. 112, № 9. – P. 1501–1509.

43. Ahtiainen, M. Combined prognostic value of CD274 (PD-L1)/PDCDI (PD-1) expression and immune cell infiltration in colorectal cancer as per mismatch repair status / M. Ahtiainen, E.V. Wirta, T. Kuopio, T. Seppälä, J. Rantala, J.P. Mecklin [et al.] // Mod. Pathol. – 2019. – Vol. 32, N 6. – P. 866–883.

44. Arai, Y. Upregulation of TIM-3 and PD-1 on CD4+ and CD8+ T Cells Associated with Dysfunction of Cell-Mediated Immunity after Colorectal Cancer Operation / Y. Arai, H. Saito, M. Ikeguchi // Yonago Acta Med. – 2012. – Vol. 55, N 1. – P. 1–9.

45. Asgharzadeh, F. The Therapeutic Potential of Angiotensin-converting Enzyme and Angiotensin Receptor Inhibitors in the Treatment of Colorectal Cancer: Rational Strategies and Recent Progress / F. Asgharzadeh, S.M. Hassanian, G.A. Ferns, M. Khazaei, M. Hasanzadeh // Curr. Pharm. Des. – 2018. – Vol. 24, N 39. – P. 4652–4658.

46. Barber, D.L. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection / D.L. Barber, E.J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J.P. Allison, A.H. Sharpe [et al.] // Nature. – 2006. – Vol. 439, N 7077. – P. 682–687.

47. Bardhan, K. Phosphorylation of Y248 in the ITSM of PD-1 is indicative of PD-1-mediated inhibitory function / K. Bardhan, J. Weaver, L. Strauss, N. Patsoukis, V. Boussiotis // J. Immunol. – 2017. – Vol. 198, Suppl. 1. – P. 154.9.

48. Bengsch, B. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell

Exhaustion / B. Bengsch, A.L. Johnson, M. Kurachi, P.M. Odorizzi, K.E. Pauken, J. Attanasio [et al.] // *Immunity*. – 2016. – Vol. 45, N 2. – P. 358–373.

49. Berntsson, J. Expression of programmed cell death protein 1 (PD-1) and its ligand PD-L1 in colorectal cancer: Relationship with sidedness and prognosis / J. Berntsson, J. Eberhard, B. Nodin, K. Leandersson, A.H. Larsson, K. Jirström // *Oncoimmunology*. – 2018. – Vol. 7, N 8. – e1465165.

50. Bhattacharyya, T. Immunological interactions in radiotherapy—opening a new window of opportunity / T. Bhattacharyya, K. Purushothaman, S.S. Puthiyottil, A. Bhattacharjee, G. Muttah // *Ann. Transl. Med.* – 2016. – Vol. 4, N 3. – P. 51.

51. Boussiotis, V.A. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway / V.A. Boussiotis // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – Vol. 375, N 18. – P. 1767–1778.

52. Brenner, H. Colorectal cancer / H. Brenner, M. Kloor, C.P. Pox // *Lancet*. – 2014. – Vol. 383, N 9927. – P. 1490–1502.

53. Bruner, S.D. Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease and Carcinogenesis: Implication for Therapeutics / S.D. Bruner, C. Jobin // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2016. – Vol. 99, N 6. – P. 585–587.

54. Burstein, H.J. Clinical Cancer Advances 2017: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology / H.J. Burstein, L. Krilov, J.B. Aragon-Ching, N.N. Baxter, E.G. Chiorean, W.A. Chow [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 35, N 12. – P. 1341–1367.

55. Cantero-Cid, R. PDL1/PD-1 crosstalk in colorectal cancer: are we targeting the right cells? / R. Cantero-Cid, J. Casas-Martin, E. Hernández-Jiménez, C. Cubillos-Zapata, A. Varela-Serrano, J. Avendaño-Ortiz [et al.] // *BMC Cancer*. – 2018. – Vol. 18, N 1. – P. 945.

56. Capalbo, C. Predictive Biomarkers for Checkpoint Inhibitor-Based Immunotherapy: The Galectin-3 Signature in NSCLCs / C. Capalbo, G. Scafetta,

M. Filetti, P. Marchetti, A. Bartolazzi // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, N 7. – E1607.

57. Champiat, S. Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1 / S. Champiat, L. Dercle, S. Ammari, C. Massard, A. Hollebecque, S. Postel-Vinay [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2017. – Vol. 23, N 8. – P. 1920–1928.

58. Chen, D.S. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point / D.S. Chen, I. Mellman // *Nature.* – 2017. – Vol. 541, N 7637. – P. 321–330.

59. Chen, J. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer / J. Chen, C.C. Jiang, L. Jin, X.D. Zhang // *Ann. Oncol.* – 2016. – Vol. 27, N 3. – P. 409–416.

60. Chen, Y. Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble PD-L1 (CD274) in human sera of different ages as well as supernatants of PD-L1+ cell lines / Y. Chen, Q. Wang, B. Shi, P. Xu, Z. Hu, L. Bai [et al.] // *Cytokine.* – 2011. – Vol. 56, N 2. – P. 231–238.

61. Couzin-Frankel, J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy / J. Couzin-Frankel // *Science.* – 2013. – Vol. 342, N 6165. – P. 1432–1433.

62. Crawford, A. Molecular and transcriptional basis of CD4⁺ T cell dysfunction during chronic infection / A. Crawford, J.M. Angelosanto, C. Kao, T.A. Doering, P.M. Odorizzi, B.E. Barnett [et al.] // *Immunity.* – 2014. – Vol. 40, N 2. – P. 289–302.

63. Cui, C. The roles of PD-1/PD-L1 and its signaling pathway in gastrointestinal tract cancers / C. Cui, B. Yu, Q. Jiang, X. Li, K. Shi, Z. Yang // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2019. – Vol. 46, N 1. – P. 3–10.

64. Darb-Esfahani, S. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma / S. Darb-Esfahani, C.A. Kunze, H. Kulbe, J. Sehouli, S. Wienert, J. Lindner [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, N 2. – P. 1486–1499.

65. de Kort, S. Diabetes mellitus, genetic variants in the insulin-like growth factor pathway and colorectal cancer risk / S. de Kort, C.C.J.M. Simons, P.A. van den Brandt, M.L.G. Janssen-Heijnen, S. Sanduleanu, A.A.M. Masclee [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2019. – Vol. 145, N 7. – P. 1774–1781.
66. Demaria, S. Radiotherapy: Changing the Game in Immunotherapy / S. Demaria, C.N. Coleman, S.C. Formenti // *Trends in Cancer.* – 2016. – Vol. 2, Iss. 6. – P. 286–294.
67. Deng, Y. FOXOs in cancer immunity: knowns and unknowns / Y. Deng, F. Wang, T. Hughes, J. Yu // *Semin. Cancer Biol.* 2018. Vol. 50. P. 53-64.
68. Ding, Y. The Prognostic Significance of Soluble Programmed Death Ligand 1 Expression in Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis / Y. Ding, C. Sun, J. Li, L. Hu, M. Li, J. Liu [et al.] // *Scand. J. Immunol.* – 2017. – Vol. 86, N 5. – P. 361–367.
69. Dong, H. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion / H. Dong, S.E. Strome, D.R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D.B. Flies [et al.] // *Nat. Med.* – 2002. – Vol. 8, N 8. – P. 793–800.
70. Dong, Y. PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer / Y. Dong, Q. Sun, X. Zhang // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 8, N 2. – P. 2171–2186.
71. Dosset, M. PD-1/PD-L1 pathway: an adaptive immune resistance mechanism to immunogenic chemotherapy in colorectal cancer / M. Dosset, T.R. Vargas, A. Lagrange, R. Boidot, F. Végran, A. Roussey [et al.] // *Oncoimmunology.* – 2018. – Vol. 7, N 6. – e1433981.
72. Drakes, M.L. Stratification of ovarian tumor pathology by expression of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand- 1 (PD-L1) in ovarian cancer / M.L. Drakes, S. Mehrotra, M. Aldulescu, R.K. Potkul, Y. Liu, A. Grisoli [et al.] // *J. Ovarian Res.* – 2018. – Vol. 11, N 1. – P. 43.
73. Drosier, R.A. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer / R.A. Drosier, C. Hirt, C.T. Viehl, D.M. Frey, C. Nebiker, X. Huber [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 49, N 9. – P. 2233–2242.

74. El Jabbour, T. PD-L1 protein expression in tumour cells and immune cells in mismatch repair protein-deficient and –proficient colorectal cancer: the foundation study using the SP142 antibody and whole section immunohistochemistry / T. El Jabbour, J.S. Ross, C.E. Sheehan, K.E. Affolter, K.B. Geiersbach, A. Boguniewicz [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 2018. – Vol. 71, N 1. – P. 46–51.

75. Elez, E. First-line treatment of metastatic colorectal cancer: interpreting FIRE-3, PEAK, and CALGB/SWOG 80405 / E. Elez, G. Argiles, J. Tabernero // *Curr. Treat. Options Oncol.* – 2015. – Vol. 16, N 11. – P. 52.

76. Elfishawy, M. Immunohistochemical Expression of Programmed Death Ligand-1 (PDL-1) in Colorectal carcinoma and Its Correlation with Stromal Tumor Infiltrating Lymphocytes / M. Elfishawy, S.A. Abd-ELaziz, A. Hegazy, D.F. El-Yasergy // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2020. – Vol. 21, N 1. – P. 225–232.

77. Enkhbat, T. Programmed Cell Death Ligand 1 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Colorectal Cancer / T. Enkhbat, M. Nishi, C. Takasu, K. Yoshikawa, H. Jun, T. Tokunaga [et al.] // *Anticancer Res.* – 2018. – Vol. 38, N 6. – P. 3367–3373.

78. Erlmeier, F. Prognostic impact of PD-1 and its ligands in renal cell carcinoma / F. Erlmeier, W. Weichert, A.J. Schrader, M. Autenrieth, A. Hartmann, S. Steffens [et al.] // *Med. Oncol.* – 2017. – Vol. 34, N 6. – P. 99.

79. Farraye, F.A. AGA medical position statement on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease / F.A. Farraye, R.D. Odze, J. Eaden, S.H. Itzkowitz, R.P. McCabe, T. Dassopoulos [et al.] // *Gastroenterology.* – 2010. – Vol. 138, N 2. – P. 738–745.

80. Fearon, E.R. Molecular genetics of colorectal cancer / E.R. Fearon // *Ann. Rev. Pathol.* – 2011. – Vol. 6. – P. 479–507.

81. Ferlay, J. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2015. – Vol. 136, N 5. – P. E359–386.

82. Ferrara, R. Hyperprogressive Disease in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated With PD-1/PD-L1 Inhibitors or With Single-Agent Chemotherapy / R. Ferrara, L. Mezquita, M. Texier, J. Lahmar, C. Audigier-Valette, L. Tessonier [et al.] // *JAMA Oncol.* – 2018. – Vol. 4, N 11. – P. 1543–1552.

83. Finn, O.J. Human Tumor Antigens Yesterday, Today, and Tomorrow *Cancer Immunol Res.* Author manuscript; available in PMC 2018 / O.J. Finn // *Cancer Immunol. Res.* – 2017. – Vol. 5, N 5. – P. 347–354.

84. Fontenot, J.D. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3 / J.D. Fontenot, J.P. Rasmussen, L.M. Williams, J.L. Dooley, A.G. Farr, A.Y. Rudensky // *Immunity.* – 2005. – Vol. 22, N 3. – P. 329–341.

85. Gainor, J.F. Clinical correlation and frequency of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression in EGFR-mutant and ALKrearranged non-small cell lung cancer (NSCLC) / J.F. Gainor, L.V. Sequist, A.T. Shaw, C.G. Azzoli, Z. Piotrowska, T. Huynh [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 33 [suppl.; abstr. 8012].

86. Gao, Y. Celastrol suppresses nitric oxide synthases and the angiogenesis pathway in colorectal cancer / Y. Gao, S. Zhou, L. Pang, J. Yang, H.J. Li, X. Huo [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2019. – Vol. 53, N 3. – P. 324–334.

87. García-Albéniz, X. Prospective Biomarker Study in Advanced RAS Wild-Type Colorectal Cancer: POSIBA Trial (GEMCAD 10-02) / X. García-Albéniz, V. Alonso, P. Escudero, M. Méndez, J. Gallego, J.R. Rodríguez [et al.] // *Oncologist.* – 2019. – Vol. 24, N 11. – e1115–e1122.

88. Garcia-Diaz, A. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression / A. Garcia-Diaz, D.S. Shin, B.H. Moreno, J. Saco, H. Escuin-Ordinas, G.A. Rodriguez [et al.] // *Cell Rep.* – 2017. – Vol. 19, N 6. – P. 1189–1201.

89. Grünwald, V. Checkpoint Blockade - a New Treatment Paradigm in Renal Cell Carcinoma / V. Grünwald // *Oncol. Res. Treat.* – 2016. – Vol. 39, N 6. – P. 353-358.

90. Gubin, M.M. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens / M.M. Gubin, X. Zhang, H. Schuster, E. Caron, J.P. Ward, T. Noguchi [et al.] // *Nature.* – 2014. – Vol. 515, N 7528. – P. 577–581.

91. Gubin, M.M. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy / M.M. Gubin, M.N. Artyomov, E.R. Mardis, R.D. Schreiber // *J. Clin. Invest.* – 2015. – Vol. 125, N 9. – P. 3413–3421.

92. Guo, X. High serum level of soluble programmed death ligand 1 is associated with a poor prognosis in hodgkin lymphoma / X. Guo, J. Wang, J. Jin, H. Chen, Z. Zhen, W. Jiang [et al.] // *Transl. Oncol.* – 2018. – Vol. 11, N 3. – P. 779–785.

93. Hagggar, F.A. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors / F.A. Hagggar, R.P. Boushey // *Clin. Colon Rectal Surg.* – 2009. – Vol. 22, N 4. – P. 191–197.

94. He, L. STING signaling in tumorigenesis and cancer therapy: a friend or foe? / L. He, X. Xiao, X. Yang, Z. Zhang, L. Wu, Z. Liu // *Cancer Lett.* – 2017. – Vol. 402. – P. 203–212.

95. Herbst, R.S. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients / R.S. Herbst, J.C. Soria, M. Kowanetz, G.D. Fine, O. Hamid, M.S. Gordon [et al.] // *Nature.* – 2014. – Vol. 515, N 7528. – P. 563–567.

96. Hibberd, A.A. Intestinal microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention / A.A. Hibberd, A. Lyra, A.C. Ouwehand // *BMJ Open Gastroenterol.* 2017. 4. e000145.

97. Ho, H.L. PD-L1 is a double-edged sword in colorectal cancer: the prognostic value of PD-L1 depends on the cell type expressing PD-L1 / H.L. Ho, T.Y. Chou,

S.H. Yang, J.K. Jiang, W.S. Chen, Y. Chao [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2019. – Vol. 145, N 7. – P. 1785–1794.

98. Hodi, F.S. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma / F.S. Hodi, S.J. O'Day, D.F. McDermott, R.W. Weber, J.A. Sosman, J.B. Haanen [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol. 363, N 8. – P. 711–723.

99. Horita, S. High-resolution crystal structure of the therapeutic antibody pembrolizumab bound to the human PD-1 / S. Horita, Y. Nomura, Y. Sato, T. Shimamura, S. Iwata, N. Nomura // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 35297.

100. Howitt, B.E. Clear cell ovarian cancers with microsatellite instability: A unique subset of ovarian cancers with increased tumor-infiltrating lymphocytes and PD-1/PD-L1 expression / B.E. Howitt, K.C. Strickland, L.M. Sholl, S. Rodig, L.L. Ritterhouse, D. Chowdhury [et al.] // *Oncoimmunology.* – 2017. – Vol. 6, N 2. – e1277308.

101. Huang, K.C. Decitabine Augments Chemotherapy-Induced PD-L1 Upregulation for PD-L1 Blockade in Colorectal Cancer / K.C. Huang, S.F. Chiang, W.T.-L. Chen, T.W. Chen, C.H. Hu, P.C. Yang [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2020. – Vol. 12, N 2. – P. 462.

102. Ijssennagger, N. Sulfide as a Mucus Barrier-Breaker in Inflammatory Bowel Disease? / N. Ijssennagger, R. van der Meer, S.W.C. van Mil // *Trends Mol. Med.* – 2016. – Vol. 22, N 3. – P. 190-199.

103. Inaguma, S. Clinicopathologic profile, immunophenotype, and genotype of CD274 (PD-L1)-positive colorectal carcinomas / S. Inaguma, J. Lasota, Z. Wang, A. Felisiak-Golabek, H. Ikeda, M. Miettinen // *Mod. Pathol.* – 2017. – Vol. 30, N 2. – P. 278–285.

104. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death / Y. Ishida, Y. Agata, K. Shibahara, T. Honjo // *EMBO J.* – 1992. – Vol. 11, N 11. – P. 3887–3895.

105. Jafri, S.H. Lifestyle modification in colorectal cancer patients: an integrative oncology approach / S.H. Jafri, G. Mills // *Future Oncol.* – 2013. – Vol. 9, N 2. – P. 207–218.
106. Jess, T. Cancer risk in inflammatory bowel disease according to patient phenotype and treatment: a Danish population-based cohort study / T. Jess, E. Horváth-Puhó, J. Fallingborg, H.H. Rasmussen, B.A. Jacobsen // *Am. J. Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 108, N 12. – P. 1869–1876.
107. Jess, T. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years / T. Jess, J. Simonsen, K.T. Jørgensen, B.V. Pedersen, N.M. Nielsen, M. Frisch // *Gastroenterology.* – 2012. – Vol. 143, N 2. – P. 375–81.e1; quiz e13-4.
108. Johnson, C.M. / Meta-analyses of colorectal cancer risk factors / C.M. Johnson, C. Wei, J.E. Ensor, D.J. Smolenski, C.I. Amos, B. Levin [et al.] // *Cancer Causes Control.* – 2013. – Vol. 24, N 6. – P. 1207–1222.
109. Jomrich, G. Programmed death-ligand 1 expression in rectal cancer / G. Jomrich, G.P. Silberhumer, B. Marian, A. Beer, L. Müllauer // *Eur. Surg.* – 2016. – Vol. 48, N 6. – P. 352–356.
110. Jovine, E. Major hepatectomy in patients with synchronous colorectal liver metastases: whether or not a contraindication to simultaneous colorectal and liver resection? / E. Jovine, E. Biolchini, F. Talaciro, F.M. Lerro, L. Mastrangelo, S. Selleri [et al.] // *Colorectal Dis.* – 2017. – Vol. 9, N 3. – P. 245–252.
111. Kato, S. Genomics of Immunotherapy-Associated Hyperprogressors-Response / S. Kato, R. Kurzrock // *Clin. Cancer Res.* – 2017. – Vol. 23, N 20. – P. 6376.
112. Keir, M.E. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity / M.E. Keir, M.J. Butte, G.J. Freeman, A.H. Sharpe // *Annu. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 677–704.
113. Kim, H.J. Clinical significance of soluble programmed cell death ligand-1 (sPD-L1) in hepatocellular carcinoma patients treated with radiotherapy /

H.J. Kim, S. Park, K.J. Kim, J. Seong // *Radiother. Oncol.* – 2018. – Vol. 129, N 1. – P. 130–135.

114. Kim, J.H. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers / J.H. Kim, H.E. Park, N.Y. Cho, H.S. Lee, G.H. Kang // *Br. J. Cancer.* – 2016. – Vol. 115, N 4. – P. 490–496.

115. Kim, K.S. Evaluation of programmed cell death protein 1 (PD-1) expression as a prognostic biomarker in patients with clear cell renal cell carcinoma / K.S. Kim, R.R. Sekar, D. Patil, M.A. Dimarco, H.T. Kissick, M.A. Bilen [et al.] // *Oncoimmunology.* – 2018. – Vol. 7, N 4. – e1413519.

116. Koshkin, V.S. Emerging therapeutics in refractory renal cell carcinoma / V.S. Koshkin, B.I. Rini // *Expert. Opin. Pharmacother.* – 2016. – Vol. 17, N 9. – P. 1225–1232.

117. Kostic, A.D. Microbes and inflammation in colorectal cancer / A.D. Kostic, E. Chun, M. Meyerson, W.S. Garrett // *Cancer Immunol. Res.* – 2013. – Vol. 1, N 3. – P. 150–157.

118. Krasanakis, T. Role of anabolic agents in colorectal carcinogenesis: Myths and realities (Review) / T. Krasanakis, T.K. Nikolouzakis, M. Sgantzios, T. Mariolis-Sapsakos, J. Souglakos, D.A. Spandidos [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2019. – Vol. 42, N 6. – P. 2228–2244.

119. Larkin, J. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma / J. Larkin, V. Chiarion-Sileni, R. Gonzales, J.J. Grob, C.L. Cowey, C.D. Lao, D. Schadendorf [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 373, N 13. – P. 23–34.

120. Lasry, A. Inflammatory networks underlying colorectal cancer / A. Lasry, A. Zinger, Y. Ben-Neriah // *Nat. Immunol.* – 2016. – Vol. 17, N 3. – P. 230–240.

121. Latchman, Y. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation / Y. Latchman, C.R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2, N 3. – P. 261–268.

122. Le, D.T. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade / D.T. Le, J.N. Durham, K.N. Smith, H. Wang, B.R. Bartlett, L.K. Aulakh [et al.] // *Science*. – 2017. – Vol. 357, N 6349. – P. 409–413.
123. Le, D.T. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency / D.T. Le, J.N. Uram, H. Wang, B.R. Bartlett, H. Kemberling, A.D. Eyring [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 372, N 26. – P. 2509–2520.
124. Lee L.H., Cavalcanti M.S., Segal N.H., Hechtman J.F., Weiser M.R., Smith J.J. [et al.] Patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma / L.H. Lee, M.S. Cavalcanti, N.H. Segal, J.F. Hechtman, M.R. Weiser, J.J. Smith [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2016. – Vol. 29, N 11. – P. 1433–1442.
125. Lee, J.Y. Structural basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy / J.Y. Lee, H.T. Lee, W. Shin, J. Chae, J. Choi, S.H. Kim [et al.] // *Nat. Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 13354.
126. Lee, K.S. PD-L1 protein expression and CD274/PD-L1 gene amplification in colorectal cancer: implications for prognosis / K.S. Lee, B.H. Kim, H.K. Oh, D.W. Kim, S.B. Kang, H. Kim [et al.] // *Cancer Sci.* – 2018. <https://doi.org/10.1111/cas.13716>
127. Lee, K.S. Prognostic implication of CD274 (PD-L1) protein expression in tumor-infiltrating immune cells for microsatellite unstable and stable colorectal cancer / K.S. Lee, Y. Kwak, S. Ahn, E. Shin, H.K. Oh, D.W. Kim [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2017. – Vol. 66, N 7. – P. 927–939.
128. Li, Y. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer / Y. Li, L. Liang, W. Dai, G. Cai, Y. Xu, X. Li [et al.] // *Mol. Cancer*. 2016. – Vol. 15, N 1. – P. 55.
129. Li, Y. The Prognostic and Clinicopathological Roles of PD-L1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / Y. Li,

M. He, Y. Zhou, C. Yang, S. Wei, X. Bian [et al.] // *Front Pharmacol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 139.

130. Lim, Y.J. Chemoradiation-Induced Alteration of Programmed Death-Ligand 1 and CD8(+) Tumor-Infiltrating Lymphocytes Identified Patients With Poor Prognosis in Rectal Cancer: A Matched Comparison Analysis / Y.J. Lim, J. Koh, S. Kim, S.R. Jeon, E.K. Chie, K. Kim // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2017. – Vol. 99, N 5. – P. 1216–1224.

131. Lin, A. Crosstalk Between the MSI Status and Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer / A. Lin, J. Zhang, P. Luo // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 2039.

132. Lin, J. T cell receptor signaling / J. Lin, A. Weiss // *J. Cell. Sci.* – 2001. – Vol. 114, Pt2. – P. 243–244.

133. Lynch, D. The emerging role of immunotherapy in colorectal cancer / D. Lynch, A. Murphy // *Ann. Transl. Med.* – 2016. – Vol. 4, N 16. – P. 305.

134. Madore, J. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials / J. Madore, R.E. Vilain, A.M. Menzies, H. Kakavand, J.S. Wilmott, J. Hyman [et al.] // *Pigment Cell Melanoma Res.* – 2015. – Vol. 28, N 3. – P. 245–253.

135. Marginean, E.C. Is There a Role for Programmed Death Ligand-1 Testing and Immunotherapy in Colorectal Cancer With Microsatellite Instability? Part II-The Challenge of Programmed Death Ligand-1 Testing and Its Role in Microsatellite Instability-High Colorectal Cancer / E.C. Marginean, B. Melosky // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2018. – Vol. 142, N 1. – P. 26–34.

136. Mataraza, J.M. Recent advances in immunooncology and its application to urological cancers / J.M. Mataraza, P. Gotwals // *BJU Int.* – 2016. – Vol. 118, N 4. – P. 506–514.

137. Maurel, J. Prognostic and Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer. From the Preclinical Setting to Clinical Practice / J. Maurel, A. Postigo // *Curr. Cancer Drug Targets*. – 2015. – Vol. 15, N 8. – P. 703–715.
138. McDermott, D.F. Atezolizumab, an anti-programmed death-ligand 1 antibody, in metastatic renal cell carcinoma: long-term safety, clinical activity, and immune correlates from a phase Ia study / D.F. McDermott, J.A. Sosman, M. Sznol, C. Massard, M.S. Gordon, O. Hamid [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 34, N 8. – P. 833–842.
139. Mimura, K. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer / K. Mimura, J.L. Teh, H. Okayama, K. Shiraishi, L.F. Kua, V. Koh [et al.] // *Cancer Sci.* – 2018. – Vol. 109, N 1. – P. 43–53.
140. Motzer, R.J. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma / R.J. Motzer, B. Escudier, D.F. McDermott, S. George, H.J. Hammers, S. Srinivas [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 373, N 19. – P. 1803–1813.
141. Muneoka, K. Selection of Chemotherapy Regimen on the Basis of Monitoring NLR and Soluble PD-L1 during CRC Chemotherapy / K. Muneoka, Y. Shirai, M. Sasaki, S. Honma, J. Sakata, J. Kanda [et al.] // *Gan To Kagaku Ryoho*. – 2018. – Vol. 45, N 8. – P. 1159–1163.
142. Ngwa, W. S.C. Using Immunotherapy to Boost the Abscopal Effect / W. Ngwa, O.C. Irabor, J.D. Schoenfeld, J. Hesser, S. Demaria, S.C. Formenti // *Nat. Rev. Cancer*. – 2018. – Vol. 18, N 5. – P. 313–322.
143. Nielsen, C. Alternative splice variants of the human PD-1 gene / C. Nielsen, L. Ohm-Laursen, T. Barington, S. Husby, S.T. Lillevang // *Cell Immunol.* – 2005. – Vol. 235, N 2. – P. 109–116.
144. Nikolaev, A.A. Prognostic significance of the TNM system criteria, levels of serum insulin-like growth factors and their transport proteins, VEGF and MMP-7 in colorectal cancer / A.A. Nikolaev, I.V. Babkina, E.S. Gershtein, A.A.

Alferov, V.V. Delektorskaya, Z.Z. Mamedli [et al.] // Clin. Lab. Diagn. – 2021. – Vol. 66, N 8. – P. 459–464.

145. Nishino, M. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development / M. Nishino, N.H. Ramaiya, H. Hatabu, F.S. Hodi // Nat. Rev. Clin. Oncol. – 2017. – Vol. 14, N 11. – P. 655–668.

146. Noh, B.J. Immune Classification for the PD-L1 Expression and Tumour-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Adenocarcinoma / B.J. Noh, J.Y. Kwak, D.W. Eom // BMC Cancer. – 2020. – Vol. 20, N 1. – P. 58.

147. Ogura, A. Pattern of programmed cell death-ligand 1 expression and CD8-positive T-cell infiltration before and after chemoradiotherapy in rectal cancer / A. Ogura, T. Akiyoshi, N. Yamamoto, H. Kawachi, Y. Ishikawa, S. Mori // Eur. J. Cancer. – 2018. – Vol. 91. – P. 11–20.

148. Okazaki, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine / T. Okazaki, A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, T. Honjo // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2001. – Vol. 98, N 24. – P. 13866–13871.

149. O'Keefe, S.J. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer / S.J. O'Keefe // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2016. – Vol. 13, N 12. – P. 691–706.

150. Okugawa, Y. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers / Y. Okugawa, W.M. Grady, A. Goel // Gastroenterology. – 2015 – Vol. 149, N 5. – P. 1204–1225.e12.

151. Oster, B. Identification and validation of highly frequent CpG island hypermethylation in colorectal adenomas and carcinomas / B. Oster, K. Thorsen, P. Lamy, T.K. Wojdacz, L.L. Hansen, K. Birkenkamp-Demtröder [et al.] // Int. J. Cancer. – 2011. – Vol. 10, N 12. – P.35–38.

152. Ott, P.A. Corrigendum: An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma / P.A. Ott, Z. Hu, D.B. Keskin, S.A. Shukla, J. Sun, D.J. Bozym [et al.] // Nature. – 2018. –Vol. 555, N 7696. – P. 402.

153. Pang, Y. TGF- β signaling in myeloid cells is required for tumor metastasis / Y. Pang, S.K. Gara, B.R. Achyut, Z. Li, H.H. Yan, C.P. Day [et al.] // *Cancer Discov.* – 2013. – Vol. 3, N 8. – P. 936–951.
154. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy / D.M. Pardoll // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – Vol. 12, N 4. – P. 252–264.
155. Parkes, E.E. Activation of STING-dependent innate immune signaling by S-phase-specific DNA damage in breast cancer / E.E. Parkes, S.M. Walker, L.E. Taggart, N. McCabe, L.A. Knight, R. Wilkinson [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2016. – Vol. 109, N 1. – djw199.
156. Patel, S.P. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy / S.P. Patel, R. Kurzrock // *Mol. Cancer Ther.* – 2015. – Vol. 14, N 4. – P. 847–856.
157. Patsoukis, N. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation / N. Patsoukis, K. Bardhan, P. Chatterjee, D. Sari, B. Liu, L.N. Bell [et al.] // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol. 6. – P. 6692.
158. Pauken, K.E. Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade / K.E. Pauken, M.A. Sammons, P.M. Odorizzi, S. Manne, J. Godec, O. Khan [et al.] // *Science.* – 2016. – Vol. 354, N 6316. – P. 1160–1165.
159. Payandeh, Z. PD-1/PDL1-dependent immune response in colorectal cancer / Z. Payandeh, S. Khalili, M.H. Somi, M. Mard-Soltani, A. Baghbanzadeh, K. Hajiasgharzadeh [et al.] // *J. Cell Physiol.* – 2020. – Vol. 235, N 7-8. – P. 5461–5475.
160. Peled, M. Affinity purification mass spectrometry analysis of PD-1 uncovers SAP as a new checkpoint inhibitor / M. Peled, A.S. Tocheva, S. Sandigursky, S. Nayak, E.A. Philips, K.E. Nichols [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2018. – Vol. 115, N 3. – P. 468–477.

161. Pepin, G. cGAS-STING activation in the tumor microenvironment and its role in cancer immunity / G. Pepin, M.P. Gantier // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – Vol. 1024. – P. 175–194.
162. Piętak, P. The meaning of PD-1/PD-L1 pathway in ovarian cancer pathogenesis / P. Piętak, N. Pietrzyk, A. Pawłowska, D. Suszczyk, W. Bednarek, J. Kotarski [et al.] // *Wiad Lek.* – 2018. – Vol. 71, N 5. – P. 1089–1094.
163. Pietzner, K. Checkpoint-inhibition in ovarian cancer: rising star or just a dream? / K. Pietzner, S. Nasser, S. Alavi, S. Darb-Esfahani, M. Passler, M.Z. Muallem [et al.] // *J. Gynecol. Oncol.* – 2018. – Vol. 29, N 6. – e93.
164. Piringer, G. A prospective, multicenter pilot study to investigate the feasibility and safety of a 1-year controlled exercise training after adjuvant chemotherapy in colorectal cancer patients / G. Piringer, M. Fridrik, A. Fridrik, A. Leiherer, A. Zabernigg, R. Greil [et al.] // *Support Care Cancer.* – 2018. – Vol. 26, N 4. – P. 1345–1352.
165. Pitt, J.M. Fine-Tuning Cancer Immunotherapy: Optimizing the Gut Microbiome / J.M. Pitt, M. Vétizou, N. Waldschmitt, G. Kroemer, M. Chamaillard, I.G. Boneca [et al.] // *Cancer Res.* – 2016. – Vol. 76, N 16. – P. 4602–4607.
166. Pyo, J.S. Clinicopathological significance of PD-L1 expression in colorectal cancer: Impact of PD-L1 expression on pFOXO1 expression / J.S. Pyo, S.H. Ko, Y.S. Ko, N.Y. Kim // *Pathol. Res. Pract.* – 2020. – Vol. 216, N 2. – P. 152764.
167. Qian, X. Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis / X. Qian, H. Chen, X. Wu, L. Hu, Q. Huang, Y. Jin // *Cytokine.* – 2017. – Vol. 89. – P. 34-44.
168. Qu, Q.-X. Membranous and Cytoplasmic Expression of PD-L1 in Ovarian Cancer Cells / Q.-X. Qu, F. Xie, Q. Huang, X.-G. Zhang // *Cell Physiol. Biochem.* – 2017. – Vol. 43. – P. 1893–1906.

169. Quigley, D.A. Predicting prognosis and therapeutic response from interactions between lymphocytes and tumor cells / D.A. Quigley, V. Kristensen // *Mol. Oncol.* – 2015. – Vol. 9, N 10. – P. 2054–2062.
170. Riella, L.V. Role of the PD-1 pathway in the immune response / L.V. Riella, A.M. Paterson, A.H. Sharpe, A. Chandraker // *Am. J. Transplant.* – 2012. – Vol. 12, N 10. – P. 2575–2587.
171. Ross, K. Immune checkpoint inhibitors in renal cell carcinoma / K. Ross, R.J. Jones // *Clin. Sci. (Lond).* – 2017. – Vol. 131, N 21. – P. 2627–2642.
172. Ruella, M. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies / M. Ruella, D.M. Barrett, S.S. Kenderian, O. Shestova, T.J. Hofmann, J. Perazzelli [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2016. – Vol. 126, N 10. – P. 3814–3826.
173. Saâda-Bouزيد, E. Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma / E. Saâda-Bouزيد, C. Defaucheux, A. Karabajakian, V.P. Coloma, V. Servois, X. Paoletti [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2017. – Vol. 28, N 7. – P. 1605–1611.
174. Sacher, A.G. Biomarkers for the clinical use of PD-1/PD-L1 inhibitors in non-small-cell lung cancer: a review / A.G. Sacher, L. Gandhi // *JAMA Oncol.* – 2016. – Vol. 2, N 9. – P. 1217–1222.
175. Sakamuri, D. Phase 1 dose-escalation study of anti CTLA-4 antibody ipilimumab and lenalidomide in patients with advanced cancers / D. Sakamuri, I.C. Glitza, S.L. Betancourt Cuellar, V. Subbiah, S. Fu, A.M. Tsimberidou [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2017. – Vol. 17, N 3. – P. 671–676.
176. Sasidharan Nair, V. DNA methylation and repressive histones in the promoters of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, PD-L1, and galectin-9 genes in human colorectal cancer / V. Sasidharan Nair, S.M. Toor, R.Z. Taha, H. Shaath, E. Elkord // *Clin. Epigenetics.* – 2018. – Vol. 10, N 1. – P. 104.
177. Scharping, N.E. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency

and Dysfunction / N.E. Scharping, A.V. Menk, R.S. Moreci, R.D. Whetstone, R.E. Dadey, S.C. Watkins [et al.] // *Immunity*. – 2016. – Vol. 45, N 3. – P. 701–703.

178. Schildberg F.A., Klein S.R., Freeman G.J., Sharpe A.H. Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family / F.A. Schildberg, S.R. Klein, G.J. Freeman, A.H. Sharpe // *Immunity*. – 2016. – Vol. 44, N 5. – P. 955–972.

179. Schmidinger, M. Clinical decision-making for immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma / M. Schmidinger // *Curr. Opin. Urol.* – 2018. – Vol. 28, N 1. – P. 29–34.

180. Sen, D.R. The epigenetic landscape of T cell exhaustion / D.R. Sen, J. Kaminski, R.A. Barnitz, M. Kurachi, U. Gerdemann, K.B. Yates [et al.] // *Science*. – 2016. – Vol. 354, N 6316. – P. 1165–1169.

181. Senovilla, L. Immunosurveillance as a regulator of tissue homeostasis / L. Senovilla, L. Galluzzi, L. Zitvogel, G. Kroemer // *Trends Immunol.* – 2013. – Vol. 34, N 10. – P. 471–481.

182. Seyedin, S.N. Combination Therapy With Radiation and PARP Inhibition Enhances Responsiveness to Anti-PD-1 Therapy in Colorectal Tumor Models / S.N. Seyedin, M.M. Hasibuzzaman, V. Pham, M.S. Petronek, C. Callaghan, A.L. Kalen [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2020. S0360-3016(20)30156-5.

183. Sharpe, A.H. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway / A.H. Sharpe, K.E. Pauken // *Nat. Rev. Immunol.* – 2018. – Vol. 18, N 3. – P. 153–167.

184. Shi, S.J. B7-H1 expression is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma and regulates the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells / S.J. Shi, L.J. Wang, G.D. Wang, Z.Y. Guo, M. Wei, Y.L. Meng [et al.] // *PloS One*. – 2013. – Vol. 8, N 10. – e76012.

185. Shinohara, T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1) / T. Shinohara, M. Taniwaki, Y. Ishida, M. Kawaichi, T. Honjo // *Genomics*. – 1994. – Vol. 23, N 3. – P. 704–706.

186. Shiraliyeva, N. PD-L1 expression in HNPCC-associated colorectal cancer / N. Shiraliyeva, J. Friedrichs, R. Buettner, N. Friedrichs // *Pathol. Res. Pract.* – 2017. – Vol. 213, N 12. – P. 1552–1555.
187. Simmons, D. The Most Recent Oncologic Emergency: What Emergency Physicians Need to Know About the Potential Complications of Immune Checkpoint Inhibitors / D. Simmons, E. Lang // *Cureus.* – 2017. – Vol. 9, N 10. – e1774.
188. Snyder, A. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma / A. Snyder, V. Makarov, T. Merghoub, J. Yuan, J.M. Zaretsky, A. Desrichard [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 371, N 23. – P. 2189–2199.
189. Snyder, A. IMMUNOTHERAPY. Could microbial therapy boost cancer immunotherapy? / A. Snyder, E. Pamer, J. Wolchok // *Science.* – 2015. – Vol. 350, N 6264. – P. 1031–1032.
190. Stewart, C.A. Interferon-dependent IL-10 production by Tregs limits tumor Th17 inflammation / C.A. Stewart, H. Metheny, N. Iida, L. Smith, M. Hanson, F. Steinhagen [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 123, N 11. – P. 4859–4874.
191. Strickland, K.C. Association and prognostic significance of BRCA1/2-mutation status with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes and expression of PD-1/PD-L1 in high grade serous ovarian cancer / K.C. Strickland, B.E. Howitt, S.A. Shukla, S. Rodig, L.L. Ritterhouse, J.F. Liu [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, N 12. – P. 13587–13598.
192. Sznol, M. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer—response / M. Sznol, L. Chen // *Clin. Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19, N 19. – P. 5542.
193. Tan, D. Correlation of PD-1/PD-L1 polymorphisms and expressions with clinicopathologic features and prognosis of ovarian cancer / D. Tan, L. Sheng, Q.H. Yi // *Cancer Biomark.* – 2018. – Vol. 21, N 2. – P. 287–297.

194. Tariq, K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms / K. Tariq, K. Ghias // *Cancer Biol. Med.* – 2016. – Vol. 13, N 1. – P. 120–135.
195. Theodoraki, M.N. Clinical Significance of PD-L1+ Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients / M.N. Theodoraki, S.S. Yerneni, T.K. Hoffmann, W.E. Gooding, T.L. Whiteside // *Clin. Cancer Res.* – 2018. – Vol. 24, N 4. – P. 896–905.
196. Thibult, M.L. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation / M.L. Thibult, E. Mamessier, J. Gertner-Dardenne, S. Pastor, S. Just-Landi, L. Xerri [et al.] // *Int. Immunol.* – 2013. – Vol. 25, N 2. – P. 129–137.
197. Tominaga, T. Clinical significance of soluble programmed cell death-1 and soluble programmed cell death-ligand 1 in patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy / T. Tominaga, T. Akiyoshi, N. Yamamoto, S. Taguchi, S. Mori, T. Nagasaki [et al.] // *PLoS One.* – 2019. – Vol. 14, N 2. – P. 0212978.
198. Topalian, S.L. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy / S.L. Topalian, J.M. Taube, R.A. Anders, D.M. Pardoll // *Nat. Rev. Cancer.* – 2016. – Vol. 16, N 5. – P. 275–287.
199. Topalian, S.L. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer / S.L. Topalian, F.S. Hodi, J.R. Brahmer, S.N. Gettinger, D.C. Smith, D.F. McDermott [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 366, N 26. – P. 2443-2454.
200. Torre, L.A. Global cancer statistics, 2012 / L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal // *CA Cancer J. Clin.* – 2015. – Vol. 65. – P. 87–108.
201. Tsang, J.Y. PD-L1 expression and tumor infiltrating PD-1+ lymphocytes associated with outcome in HER2+ breast cancer patients / J.Y. Tsang, W.L. Au, K.Y. Lo, Y.B. Ni, T. Hlaing, J. Hu [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2017. – Vol. 162, N 1. – P. 19–30.

202. Tumei, P.C. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance / P.C. Tumei, C.L. Harview, J.H. Yearley, I.P. Shintaku, E.J. Taylor, L. Robert [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 515, N 7528. – P. 568–571.
203. Valentini, A.M. PD-L1 expression in colorectal cancer defines three subsets of tumor immune microenvironments / A.M. Valentini, F. Di Pinto, F. Cariola, V. Guerra, G. Giannelli, M.L. Caruso, M. Pirrelli // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9, № 9. – P. 8584–8596.
204. Wahba, J. Chemotherapy-induced apoptosis, autophagy and cell cycle arrest are key drivers of synergy in chemo-immunotherapy of epithelial ovarian cancer / J. Wahba, M. Natoli, L.M. Whilding, A.C. Parente-Pereira, Y. Jung, S. Zona [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2018. – Aug 24. doi: 10.1007/s00262-018-2199-8 [Epub ahead of print].
205. Wang, H. cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockage / H. Wang, S. Hu, X. Chen, H. Shi, C. Chen, L. Sun [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2017. – Vol. 114, N 7. – P. 1637–1642.
206. Wang, H.B. Rise of PD-L1 expression during metastasis of colorectal cancer: Implications for immunotherapy / H.B. Wang, H. Yao, C.S. Li, L.X. Liang, Y. Zhang, Y.X. Chen [et al.] // *J. Dig. Dis.* – 2017. – Vol. 18, N 10. – P. 574–581.
207. Wang, Y. Prognostic value and clinicopathological features of PD-1/PD-L1 expression with mismatch repair status and desmoplastic stroma in Chinese patients with pancreatic cancer / Y. Wang, J. Lin, J. Cui, T. Han, F. Jiao, Z. Meng [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, N 6. – P. 9354–9365.
208. Weber, M.M. Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Patients with Neuroendocrine Neoplasia / M.M. Weber, C. Fottner // *Oncol. Res. Treat.* – 2018. – Vol. 41, N 5. – P. 306–312.
209. Wei, F. PD-L1 promotes colorectal cancer stem cell expansion by activating HMGA1-dependent signaling pathways / F. Wei, T. Zhang, S.C. Deng, J.C. Wei, P. Yang, Q. Wang [et al.] // *Cancer Lett.* – 2019. – Vol. 450. – P. 1–13.

210. Wei, W. Prognostic significance of circulating soluble programmed death ligand-1 in patients with solid tumors: A meta-analysis / W. Wei, B. Xu, Y. Wang, C. Wu, J. Jiang, C. Wu // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. – Vol. 97, N 3. – e9617.
211. West, N.R. Immunotherapy Not Working? Check Your Microbiota / N.R. West, F. Powrie // *Cancer Cell*. – 2015. – Vol. 28, N 6. – P. 687–689.
212. Wieser, V. BRCA1/2 and TP53 mutation status associates with PD-1 and PD-L1 expression in ovarian cancer / V. Wieser, I. Gaugg, M. Fleischer, G. Shivalingaiah, S. Wenzel, S. Sprung [et al.] // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9, N 25. – P. 17501–17511.
213. Wyss, J. Stromal PD-1/PD-L1 Expression Predicts Outcome in Colon Cancer Patients / J. Wyss, B. Dislich, V.H. Koelzer, J.A. Galván, H. Dawson, M. Hädrich [et al.] // *Clin. Colorectal Cancer*. – 2019. – Vol. 18, N 1. – P. 20–38.
214. Xiao, Y. RGMb is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance / Y. Xiao, S. Yu, B. Zhu, D. Bedoret, X. Bu, L.M. Francisco [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 211, N 5. – P. 943–959.
215. Xu-Monette, Z.Y. PD-1/PD-L1 Blockade: Have We Found the Key to Unleash the Antitumor Immune Response? / Z.Y. Xu-Monette, M. Zhang, J. Li, K.H. Young // *Front Immunol*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1597.
216. Yadav M., Jhunjunwala S., Phung Q.T., Lupardus P., Tanguay J., Bumbaca S. [et al.] Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing / M. Yadav, S. Jhunjunwala, Q.T. Phung, P. Lupardus, J. Tanguay, S. Bumbaca [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 515, N 7528. – P. 572–576.
217. Yao, S. PD-1 as an immune modulatory receptor / S. Yao, L. Chen // *Cancer J*. – 2014. – Vol. 20, N 4. – P. 262–264.

218. Yeku, O. Adoptive T-Cell Therapy for solid tumors / O. Yeku, X. Li, R.J. Brentjens // *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* – 2017. – Vol. 37. – P. 193–204.
219. Yokosuka, T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2 / T. Yokosuka, M. Takamatsu, W. Kobayashi-Imanishi, A. Hashimoto-Tane, M. Azuma, T. Saito // *J. Exp. Med.* – 2012. – Vol. 209, N 6. – P. 1201–1217.
220. Yuasa, T. Biomarkers to predict prognosis and response to checkpoint inhibitors / T. Yuasa, H. Masuda, S. Yamamoto, N. Numao, J. Yonese // *Int. J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 22, N 4. – P. 629–634.
221. Zhang, W. B7-H3 and PD-L1 Expression Are Prognostic Biomarkers in a Multi-racial Cohort of Patients with Colorectal Cancer / W. Zhang, A. Acuna-Villaorduna, K. Kuan, S. Gupta, S. Hu, K. Ohaegbulam [et al.] // *Clin. Colorectal Cancer.* – 2021. – Vol. 20, N 2. – P. 161–169.
222. Zhang, Y. Expression and clinical significance of programmed death-1 on lymphocytes and programmed death ligand-1 on monocytes in the peripheral blood of patients with cervical cancer / Y. Zhang, W. Zhu, X. Zhang, Q. Qu, L. Zhang // *Oncol. Lett.* – 2017. – Vol. 14, N 6. – P. 7225–7231.
223. Zhong, G. Expression of STING and PD-L1 in colorectal cancer and their correlation with clinical prognosis / G. Zhong, C. Peng, Y. Chen, J. Li, R. Yang, M. Wu [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2018. – Vol. 11, N 3. – P. 1256–1264.
224. Zhu, X. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer / X. Zhu, J. Lang // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, N 57. – P. 97671–97682.
225. Zhu, X. The significance and therapeutic potential of PD-1 and its ligands in ovarian cancer: A systematic review / X. Zhu, J. Lang // *Gynecol. Oncol.* – 2016. – Vol. 142, N 1. – P. 184–189.

226. Zou, W. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations / W. Zou, J.D. Wolchok, L. Chen // *Sci. Transl. Med.* – 2016. – Vol. 8, N 328. – P. 328rv4.