



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΟΓΚΟΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΕΚΒΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ»**

Νάσης Σταύρος

Βιολόγος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δήμας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Επιβλέπων

Παπαθανασίου Ιωάννα, Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,

Συνεπιβλέπων

Τσέζου Ασπασία, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος

ΛΑΡΙΣΑ, 2022



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS
«TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES AS PROGNOSTIC
INDICATORS OF TREATMENT OUTCOME IN CANCER»**

Nasis Stavros

Biologist

THREE-MEMBER COMMITTEE

Dimas Konstantinos, Professor of Pharmacology, University of Thessaly, Supervisor

Papathanasiou Ioanna, Assistant Professor of Medical Biology, University of Thessaly, Co-Supervisor

Tsezou Aspasia, Professor of Medical Genetics, University of Thessaly, Member

LARISSA, 2022

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2022 στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τίτλο «Γενετική του Ανθρώπου-Γενετική Συμβουλευτική». Η παρούσα διπλωματική εργασία μου παρείχε εξαιρετικές κυρίως θεωρητικές γνώσεις, καθώς μέσω του θέματος που μου ανατέθηκε είχα την ευκαιρία να έρθω, για ακόμη μία φορά, σε άμεση επαφή με την επιστημονική έρευνα και με ένα θέμα που μου κεντρίζει το ενδιαφέρον όσο τίποτα άλλο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, πρωτίστως, τον επιβλέπων καθηγητή μου κύριο Κωνσταντίνο Δήμα, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, μέσω της ανάθεσης της διπλωματικής εργασίας και για την καθοδήγηση του και στο χρόνο που αφιέρωσε για να με βοηθήσει να μάθω και να κατανοήσω τα βασικά στάδια της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμησή μου στην συνεπιβλέπουσα καθηγήτρια κα Παπαθανασίου Ιωάννα. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την καθηγήτρια και υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος κα Ασπασία Τσέζου, που ήταν πάντοτε διαθέσιμη να με βοηθήσει σε ό,τι χρειάστηκα κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού και της διπλωματικής μου εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω με όλη μου την καρδιά την οικογένειά μου, την κοπέλα μου και τους φίλους μου, για την αμέριστη συμπαράσταση και ενθάρρυνση, όταν τους χρειαζόμουν.

Νάσης Σταύρος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο καρκίνος αποτελεί παγκόσμια τη 2η αιτία θανάτου, ενώ η «Παγκόσμια Στατιστική Καρκίνου» του 2020, προβλέπει ότι θα διαγνωστούν με καρκίνο στη διάρκεια της ζωής τους 1 στους 2 άνδρες και 1 στις 3 γυναίκες, ενώ 1 στους 8 άνδρες και 1 στις 11 γυναίκες θα πεθάνουν από αυτόν. Έτσι, η ανεύρεση και καθιέρωση νέων προγνωστικών δεικτών της έκβασης της θεραπείας στον καρκίνο είναι όσο ποτέ άλλοτε επιτακτική.

Στον αγώνα αναζήτησης νέων προγνωστικών δεικτών για την επιλογή ασθενών για κατάλληλες θεραπείες, την πρόβλεψη της ανταπόκρισης και έκβασης της θεραπείας, οι επιστήμονες έχουν στραφεί στη μελέτη των ογκοδιηθητικών λεμφοκυττάρων (Tumor Infiltrating Lymphocytes-TILs). Παρόλο που η ιστορία τους ξεκίνησε πριν από περίπου 2 αιώνες, κυρίως την τελευταία δεκαετία το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει αυξηθεί ραγδαία όσον αφορά τους διαφόρους υποπληθυσμούς TILs, τον μηχανισμό δράσης τους στον όγκο και τον ρόλο τους ως προγνωστικοί δείκτες έκβασης της θεραπείας στις διάφορες μορφές καρκίνου.

Οι μελέτες που εξετάστηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, επικεντρώνονται στην πρόσφατη βιβλιογραφία που μελετά τον προγνωστικό ρόλο των TILs στον καρκίνο του Μαστού, του Πνεύμονα, του Παχέος Εντέρου, του Προστάτη και του Στομάχου, των πέντε πιο συχνών τύπων καρκίνου παγκοσμίως. Η πλειοψηφία των μελετών συμφωνούν ότι η αυξημένη διήθηση TILs είναι σημάδι έντονης ανοσολογικής απάντησης έναντι του όγκου και ακόμη και μικρές σταδιακές αυξήσεις συγκεκριμένων υποπληθυσμών TILs, τόσο γύρω όσο και εντός του όγκου, οδηγούν σε βελτίωση της επιβίωσης, προβλέπουν την ανταπόκριση στη θεραπεία (χειρουργική εκτομή, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία) και υποδηλώνουν ότι θεραπείες που αυξάνουν τα TILs μπορούν να ωφελήσουν τα κλινικά αποτελέσματα σε πολλαπλούς τύπους καρκίνου.

Έτσι, η παρουσία και αύξηση αυτών των υποπληθυσμών TILs, κυρίως CD8⁺, συσχετίζεται με συνολική, και χωρίς εξέλιξη της νόσου, επιβίωση, και καταδεικνύει ότι ο βαθμός διήθησης των TILs μπορεί να θεωρηθεί χρήσιμος προγνωστικός παράγοντας για διάφορους τύπους καρκίνου.

Λέξεις- Κλειδιά: Ογκοδιηθητικά λεμφοκύτταρα, Προγνωστικοί δείκτες, Έκβαση θεραπείας στον καρκίνο, Υποπληθυσμοί TILs

ABSTRACT

According to the World Health Organization, cancer is the 2nd leading cause of death worldwide, while the "Global Cancer Statistics" of 2020 predict that 1 in 2 men and 1 in 3 women are diagnosed with cancer during their lifetime, while 1 in 8 men and 1 in 11 women will die from it. Thus, finding and establishing new prognostic markers of treatment outcome in cancer is of crucial importance.

In the race to find new prognostic markers for patient selection for appropriate treatments, the prediction of treatment response and outcome, scientists have turned to the study of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). Although their history began about 2 centuries ago, it only in the last decade that interest of the scientific community has grown rapidly, especially regarding the different subpopulations of TILs, their mechanism of action in the tumor and their role as prognostic indicators of treatment outcome in various forms of cancer.

The majority of studies agree that increased infiltration of TILs is a sign of a strong immune response against the tumor and even small gradual increases of specific subpopulations of TILs, both around and within the tumor, lead to improved survival, predict response to treatment (surgery resection, chemotherapy, radiation therapy) and imply that treatments that increase the TILs can lead to better clinical outcomes in multiple cancer types.

Thus, the presence and increase of these TILs subpopulations, mainly CD8⁺, correlates with overall and progression-free survival, and demonstrates that the degree of TILs infiltration can be considered a useful prognostic factor for various types of cancer.

Keywords: Tumor-infiltrating lymphocytes, Prognostic factors, Treatment outcome in cancer, TILs subpopulations

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	9
1.1 Ο ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	10
2.1. ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ (LYMPHOCYTES)	10
2.2. Β ΚΑΙ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ (ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ, ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ)	11
2.3 TILs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	16
3.1. TILs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ (BC)	16
3.2 TILs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (ΜΜΚΠ)	21
3.3 TILs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ (CRC)	27
3.4 TILs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ (PCa)	32
3.5 TILs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΣΤΟΜΑΧΟΥ (GC)	37
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια, ενώ ολόκληρη η επιστημονική κοινότητα δίνει μάχη με τη νεοεμφανιζόμενη νόσο του κορονοϊού (COVID-19), νοσήματα που την ταλανίζουν πριν την εμφάνιση του, όπως ο καρκίνος, συνεχίζουν να απασχολούν τους επιστήμονες, καθώς τα ποσοστά εμφάνισης και θανάτου από αυτόν στις σύγχρονες κοινωνίες είναι ιδιαίτερα ανησυχητικά. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ο καρκίνος κατέχει σε παγκόσμιο επίπεδο τη 2η θέση ως αιτία θανάτου, μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα, αντιπροσωπεύοντας σχεδόν 10 εκατομμύρια θανάτους για το 2020. Σε αυτόν τον αγώνα για την επιτυχή αντιμετώπισή του, η εξεύρεση νέων προγνωστικών δεικτών ανταπόκρισης και έκβασης στην εκάστοτε θεραπεία είναι ζωτικής σημασίας. Στο πλαίσιο αυτό, το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στη μελέτη των ογκοδιηθητικών λεμφοκυττάρων (Tumor Infiltrating Lymphocytes-TILs), των οποίων η παρουσία στον όγκο είναι σημάδι μίας έντονης ανοσολογικής απάντησης, με τα TILs να είναι τα βασικά στοιχεία της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης έναντι των καρκινικών κυττάρων και αυτό συχνά φαίνεται να σχετίζεται με βελτιωμένη πρόγνωση έκβασης της θεραπείας και επιβίωσης των ασθενών.

Έτσι, η επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια έχει επικεντρώσει το ενδιαφέρον της στα TILs στο μικροπεριβάλλον του όγκου και συγκεκριμένα στη θέση τους (στρώμα όγκου, εντός του όγκου και διηθητικό όριο του όγκου), στην πυκνότητα διήθησης (υψηλή-χαμηλή-μηδενική), στους ρόλους και μηχανισμούς δράσης των διαφόρων υποτύπων TILs (CD3⁺ TILs, CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs, CD20⁺ TILs και FOXP3⁺ TILs), στη σχέση τους με τα διάφορα κλινοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου, όπως η μετάσταση στους λεμφαδένες, μέγεθος όγκου κ.α., την πιθανότητα υποτροπής και κυρίως στη συσχέτιση τους με την πρόγνωση της αποτελεσματικότητας και του αποτελέσματος της θεραπευτικής παρέμβασης, όπως είναι η χειρουργική εκτομή του καρκίνου, η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία. Γενικότερα, η σύγχρονη βιβλιογραφία προσπαθεί, εξετάζοντας την κατάσταση των διαφόρων υποτύπων TILs, μεμονωμένα και συνολικά, σε πολλούς τύπους καρκίνου ξεχωριστά, να αποκαλύψει τη συσχέτιση των TILs στην πρόγνωση της έκβασης της θεραπείας στον καρκίνο, μέσω της συσχέτισης των αυξημένων ή μειωμένων επιπέδων διήθησης συγκεκριμένων υποτύπων TILs, κυρίως CD8⁺ και FOXP3⁺ TILs, στην έκβαση των ασθενών που έχουν λάβει μεμονωμένες ή συνδυαστικές θεραπείες, υπολογίζοντας, σε πολλές περιπτώσεις, την ολική επιβίωση των ασθενών (Overall survival-OS), το διάστημα ελευθέρου νόσου

(Disease-free survival-DFS), την ελεύθερη εξέλιξη της νόσου επιβίωσης (Progression-free survival-PFS), την επιβίωση ελεύθερης υποτροπής (Recurrence-free survival-RFS) και την ειδική για τη νόσο επιβίωση (Disease-free survival-DFS).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, γίνεται λόγος για τα TILs και τη συσχέτισή τους με την έκβαση της θεραπείας στους πέντε πιο συχνούς τύπους καρκίνου παγκοσμίως και πιο συγκεκριμένα στον καρκίνο του Μαστού (12,5%), του Πνεύμονα (12,2%), του Παχέος Εντέρου (10,7%), του Προστάτη (7,8%) και του στομάχου (6,0%) που συνολικά αποτελούν το 49,2% των νέων περιπτώσεων καρκίνου, σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα του 2020, από το Παγκόσμιο Παρατηρητήριο Καρκίνου (Global Cancer Observatory-GCO), του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ, World Health Organization-WHO)/Διεθνή Οργανισμού Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer-IARC). Στόχος είναι μέσα από τη διερεύνηση, αξιολόγηση και σύγκριση των αποτελεσμάτων της σύγχρονης διεθνούς βιβλιογραφίας να διαλευκανθεί ο ρόλος των TILs ως προγνωστικοί δείκτες της έκβασης της θεραπείας στον καρκίνο και να διατυπωθούν προτάσεις για μελλοντική έρευνα με γνώμονα την μεθοδολογική και θεωρητική διεύρυνση της προγνωστικής αξίας των TILs.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Ο επιπολασμός του καρκίνου

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας οι θάνατοι από μη μεταδοτικές ασθένειες αυξάνονται συνεχώς, ενώ ο καρκίνος κατέχει σε παγκόσμιο επίπεδο τη 2η θέση ως αιτία θανάτου. Όσον αφορά τα παγκόσμια στατιστικά για τους διάφορους τύπους καρκίνου στον κόσμο για το 2020, το τελευταίο έτος με διαθέσιμα δεδομένα, η Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο και η Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου έδωσαν από κοινού στη δημοσιότητα την «Παγκόσμια Στατιστική Καρκίνου 2020». Αυτή προβλέπει ότι το 2020, υπήρχαν περίπου 18,1 εκατομμύρια περιπτώσεις καρκίνου σε όλο τον κόσμο και από αυτές, 9,3 εκατομμύρια περιπτώσεις ήταν σε άνδρες και 8,8 εκατομμύρια σε γυναίκες. Οι 15 πιο συχνόι τύποι καρκίνου παγκοσμίως παρατίθενται στον πίνακα 1:

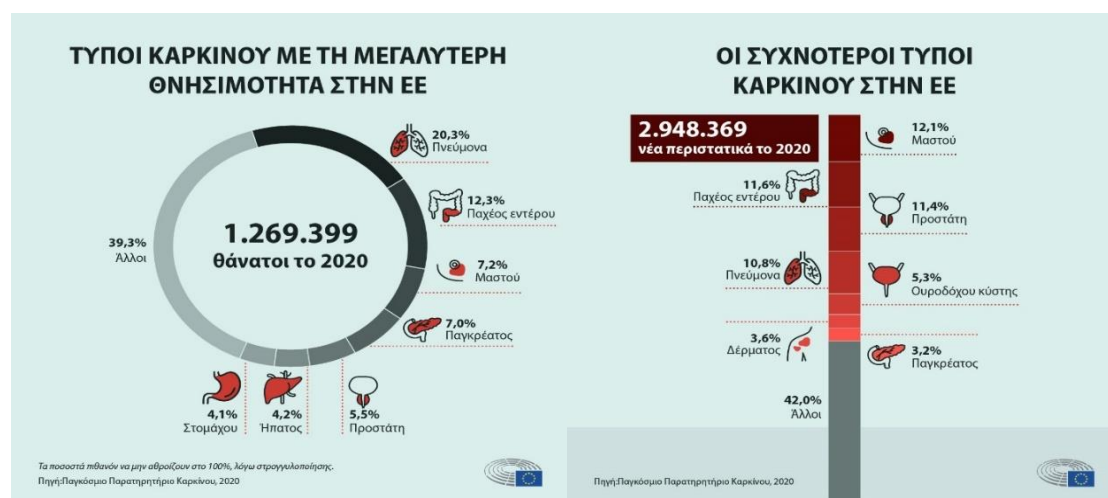
Πίνακας 1: Στοιχεία για τη συχνότητα εμφάνισης (%) των 15 πιο συχνών καρκίνων παγκοσμίως. Τα στοιχεία για το % όλων των καρκίνων δεν περιλαμβάνουν τον μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος GCO/WHO (2022)

Σειρά	Καρκίνοι	Νέες περιπτώσεις 2020	% όλων των καρκίνων
	Όλοι οι τύποι καρκίνου*	18,094,716	
1	Μαστού	2,261,419	12.5
2	Πνεύμονα	2,206,771	12.2
3	Παχέος Εντέρου (ορθού και του κόλον)	1,931,590	10.7
4	Προστάτη	1,414,259	7.8
5	Στομάχου	1,089,103	6.0
6	Συκωτιού	905,677	5.0
7	Τραχήλου της μήτρας	604,127	3.3
8	Οισοφάγου	604,100	3.3
9	Θυροειδή	586,202	3.2
10	Κύστης	573,278	3.2
11	Λέμφωμα Non Hodgkin	544,352	3.0
12	Παγκρέατος	495,773	2.7
13	Λευχαιμία	474,519	2.6
14	Νεφρού	431,288	2.4
15	Corpus uteri	417,367	2.3

Στους άνδρες, ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν ο πιο συχνός παγκοσμίως με 15,4%. Οι 3 πιο συχνόι στους άνδρες είναι κατά σειρά του πνεύμονα, του προστάτη και του παχέος εντέρου και συνολικά συνέβαλαν στο 41,9% όλων των καρκίνων. Άλλοι συχνόι

καρκίνοι που συνέβαλαν περισσότερο από 5% ήταν του στομάχου και του ήπατος. Στις γυναίκες ο καρκίνος του μαστού ήταν ο πιο συχνός παγκοσμίως, με 25,8%. Οι 3 πιο συχνοί στις γυναίκες είναι κατά σειρά του μαστού, του παχέος εντέρου και του πνεύμονα και συνολικά συνέβαλαν στο 44,5% όλων των καρκίνων. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας ήταν ο τέταρτος πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες, συνεισφέροντας στο 6,9% [Global Cancer Observatory/WHO/Cancer (2022)].

Αντίστοιχα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), όπου οι πολίτες αποτελούν περίπου το 10% του παγκόσμιου πληθυσμού, ο καρκίνος καταγράφεται σαν η βασική αιτία θνησιμότητας μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Οι μορφές καρκίνου με τη μεγαλύτερη θνησιμότητα αποτελούν κατά σειρά (Εικόνα 1), ο καρκίνος του πνεύμονα, του παχέος εντέρου του μαστού, του παγκρέατος, του προστάτη, του ήπατος και του στομάχου. Για την πρόληψη και την καταπολέμηση του καρκίνου, η ΕΕ έχει αναλάβει δράσεις ενημέρωσης, προληπτικού ελέγχου των πολιτών, έρευνας και κλινικών δοκιμών για την ένταξη νέων θεραπειών για την υγειονομική περίθαλψη των ασθενών από καρκίνο [Dyba T. et al. (2021)].



Εικόνα 1: Τύποι καρκίνου με τη μεγαλύτερη θνησιμότητα στην ΕΕ και οι συχνότεροι τύποι καρκίνου στην ΕΕ (Παγκόσμιο Παρατηρητήριο Καρκίνου, 2020)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. Λεμφοκύτταρα (lymphocytes)

Τα λεμφοκύτταρα είναι ένας τύπος λευκών αιμοσφαιρίων, πρωταρχικής σημασίας για το ανοσοποιητικό σύστημα. Καθένα έχει μια συγκεκριμένη λειτουργία και όλα μαζί συμβάλουν στην αντιμετώπιση νοσημάτων και αντιγόνων όπως βακτηρίων, ιών ή τοξινών. Συνολικά στους ενήλικες αποτελούν το 20 έως 40% των λευκών αιμοσφαιρίων, εντοπίζονται στην κυκλοφορία και συναθροίζονται σε κεντρικά λεμφοειδή όργανα και ιστούς, όπως είναι οι λεμφαδένες, ο σπλήνας και οι αμυγδαλές,

όπου είναι πιθανό να εμφανιστεί η αρχική ανοσολογική απόκριση. Όσον αφορά τους κύριους τύπους έχουμε, περιληπτικά, τα Β λεμφοκύτταρα (Β-κύτταρα), τα Τ λεμφοκύτταρα (Τ-κύτταρα) και τα ΝΚ κύτταρα, όπου τα Β-κύτταρα έχουν την ικανότητα να παράγουν αντισώματα και τα Τ-κύτταρα βοηθούν στην εξουδετέρωση των καρκινικών κυττάρων και στον έλεγχο των ανοσολογικών αποκρίσεων. Τέλος, ένα άλλο είδος λεμφοκυττάρων είναι τα φυσικά κύτταρα –φονείς (natural killer cells-NK κύτταρα), τα οποία παρατηρήθηκαν αρχικά για την ικανότητά τους να σκοτώνουν κύτταρα όγκου χωρίς καμία εκκίνηση (priming) ή προηγούμενη ενεργοποίηση (σε αντίθεση με τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα, τα οποία χρειάζονται εκκίνηση από κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο). Αναγνωρίζουν κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιούς και καρκινικά κύτταρα και, προσκολλώμενα σε αυτά, τα καταστρέφουν, ενώ εκκρίνουν κυτοκίνες όπως IFN γ (Interferon gamma) και TNF α (tumor necrosis factor alpha), οι οποίες δρουν σε άλλα ανοσοκύτταρα όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα για να ενισχύσουν την ανοσοαπόκριση [Encyclopedia Britannica/Science/Lymphocyte (2022)].

2.2. Β και Τ-λεμφοκύτταρα (Προέλευση, κατηγορίες και ρόλος)

Οι δύο κύριοι τύποι λεμφοκυττάρων προέρχονται από βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών. Περίπου το 20% των νέων λεμφοκυττάρων παραμένουν στο μυελό των οστών και γίνονται Β-κύτταρα, ενώ το άλλο 70% των λεμφοκυττάρων «ταξιδεύει» στο θύμο αδένα και γίνεται Τ-κύτταρα. Τα περισσότερα λεμφοκύτταρα είναι βραχύβια, με μέση διάρκεια ζωής από μια εβδομάδα έως μερικούς μήνες, αλλά μερικά ζουν για χρόνια και ευθύνονται για την ανοσολογική μνήμη, μια πιο γρήγορη και ισχυρή απάντηση σε μια δεύτερη συνάντηση με το ίδιο αντιγόνο. Πολύ σημαντικά είναι τα μόρια υποδοχείς στις επιφάνειές τους μέσω των οποίων είναι σε θέση να δεσμεύουν και να απομακρύνουν αντιγόνα από το σώμα. Υπάρχει τεράστια ποικιλία πληθυσμών λεμφοκυττάρων που καθένα φέρει υποδοχείς που συνδέονται με ένα μοναδικό αντιγόνο. Μόλις διεγερθεί μέσω σύνδεσης με αντιγόνο πολλαπλασιάζεται σε έναν κλώνο πανομοιότυπων κυττάρων [Encyclopedia Britannica/Science/Lymphocyte (2022)].

Τα Β-κύτταρα μετά την απελευθέρωσή τους συγκεντρώνονται στους λεμφαδένες, την αναπνευστική οδό, τη γαστρεντερική οδό και τη σπλήνα, έτοιμα για παθογόνους

εισβολείς. Στη συνέχεια, κατά τη συνάντηση παθογόνων αρχίζουν να παράγουν 2 κατηγορίες κυττάρων:

- **Πλασματοκύτταρα**, τα οποία παράγουν αντισώματα για αρκετές ημέρες ή μήνες, σύμφωνα με τους υποδοχείς του προδρόμου Β κυττάρου και όταν απελευθερωθούν στο αίμα και τη λέμφο, δεσμεύονται στο αντιγόνο στόχο και το σημαίνουν για αναγνώριση και ουδετεροποίηση ή καταστροφή
- **Κύτταρα μνήμης**, τα οποία παρέχουν στο ανοσοποιητικό σύστημα μακροχρόνια μνήμη

Από την άλλη τα Τ κύτταρα στο θύμο αδένα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε βοηθητικά, ρυθμιστικά ή κυτταροτοξικά Τ κύτταρα ή γίνονται Τ κύτταρα μνήμης. Έπειτα, διασπείρονται σε περιφερικούς ιστούς ή κυκλοφορούν στο αίμα ή στο λεμφικό σύστημα. Έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και μπορούν να ξεχωρίσουν τα υγιή από τα μη φυσιολογικά κύτταρα, ενώ παράγουν κυτοκίνες, οι οποίες διεγείρουν τη διαφοροποίηση των Β κυττάρων σε πλασματοκύτταρα, προάγοντας έτσι την παραγωγή αντισωμάτων. Υπάρχουν 3 κατηγορίες Τ κυττάρων:

- Τα **Ρυθμιστικά Τ κύτταρα** σαρώνουν και αναγνωρίζουν κύτταρα ως παθογόνα ή μη και εκφράζουν αυτή την ιδιότητα μέσω του μεταγραφικού παράγοντα FOXP3+
- Τα **Βοηθητικά Τ κύτταρα/CD4+** ανταποκρίνονται άμεσα, εκφράζουν γλυκοπρωτεΐνες CD4 στην επιφάνεια τους, οι οποίες ενεργοποιούνται παρουσία πεπτιδικών αντιγόνων στην επιφάνεια των εισβαλόντων παθογόνων και εκκρίνουν διαφορετικές πρωτεΐνες κυτοκίνης
- Τα **Κυτταροτοξικά Τ κύτταρα/CD8+** εκφράζουν τις γλυκοπρωτεΐνες CD8 στην επιφάνεια τους, οι οποίες ενεργοποιούνται παρουσία αντιγόνων που συνδέονται με μόρια MHC κατηγορίας I. Επίσης, γίνονται κύτταρα μνήμης και αδρανοποιούνται για να αποτραπεί η αυτοανοσία. Υπάρχουν και τα **Φυσικά φονικά Τ κύτταρα/CD8+** που γεφυρώνουν το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα με το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα [Anika Niambi A-S (2020)].

2.3 TILs και καρκίνος

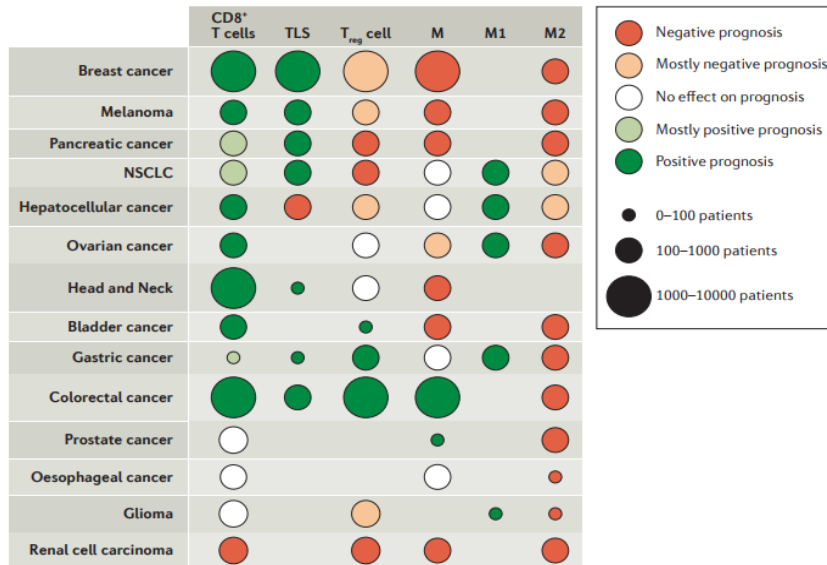
Σύμφωνα με το ορισμό του National Cancer Institute, τα ογκοδιηθητικά λεμφοκύτταρα (TILs) είναι ουσιαστικά ένας τύπος ανοσοκυττάρου που έχει μετακινηθεί από το αίμα στον όγκο και συγκεντρώνονται γύρω ή μέσα σε αυτόν. Τα TILs ουσιαστικά μπορούν να σκοτώσουν τα καρκινικά κύτταρα και να αποτρέψουν την εξάπλωση της νόσου σε άλλα μέρη του σώματος. Η ιστορία των TILs ξεκίνησε

πριν από περίπου 2 αιώνες, όταν το 1863, ο Virchow παρατήρησε ότι οι νεοπλασματικοί ιστοί περιείχαν λευκοκύτταρα και το 1982, όταν ο Steven Rosenberg, ο πατέρας της adoptive cell therapy (ACT) και οι συνεργάτες του στο Τμήμα Χειρουργικής στο Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (National Institutes of Health-NIH) απομόνωσαν TILs από πολλαπλά μοντέλα όγκων ποντικών για πρώτη φορά και αργότερα έδειξαν ότι ο συνδυασμός κυκλοφωσφαμίδης, TILs και ιντερλευκίνης (Interleukin-IL)-2 μπορεί να βελτιώσει το 50-100% των ποντικών που φέρουν αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου με ηπατική ή πνευμονική μετάσταση, θέτοντας τα θεμέλια για την εφαρμογή των TILs στη θεραπεία προχωρημένων καρκίνων στον άνθρωπο και δείχνοντας ότι τα TILs επηρεάζουν άμεσα την έκβαση του καρκίνου. Η πρώτη θεραπεία με TILs σε ανθρώπους διεξήχθη επίσης από την ομάδα του το 1988, με αποτέλεσμα 60% υποχώρηση του μεταστατικού μελανώματος. Τα TILs, βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου και είναι τα βασικά στοιχεία της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης έναντι των καρκινικών κυττάρων, αποτελούνται κυρίως από T λεμφοκύτταρα και σε μικρότερο βαθμό από B λεμφοκύτταρα, NK κύτταρα, μακροφάγα και NKT λεμφοκύτταρα. Μερικά από αυτά τα κύτταρα (CD8+ T λεμφοκύτταρα, Th1 CD4+ λεμφοκύτταρα, M1 μακροφάγα) έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες, ενώ ορισμένα (B λεμφοκύτταρα, Th2 CD4 T λεμφοκύτταρα, M2 μακροφάγα) έχουν προκαρκινικές ιδιότητες. Η αφθονία τους ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο και το στάδιο του όγκου και σε ορισμένες περιπτώσεις σχετίζεται με την πρόγνωση της νόσου [<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor-infiltrating-lymphocyte>, Kazemi M. et al. (2022), Wang. S. et al. (2021)].

Πιο αναλυτικά, τα φυσικά τα λεμφοκύτταρα (NKT) κύτταρα φονείς είναι ένα σπάνιο υποσύνολο T λεμφοκυττάρων (λιγότερο από 1%) που μοιράζονται επιφανειακούς δείκτες και λειτουργικά χαρακτηριστικά τόσο με τα συμβατικά T λεμφοκύτταρα όσο και με τα φυσικά κύτταρα φονείς και φαίνεται να παίζουν άμεσο και έμμεσο ρόλο στην ανοσοεπιτήρηση και στην ανοσία κατά του όγκου. Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση των κυττάρων NKT μέσω της παροχής εξωγενών γλυκολιπιδίων προκαλεί μια σημαντική αντικαρκινική ανοσοαπόκριση. Επιπλέον, η διήθηση των NKT κυττάρων σχετίζεται με καλή πρόγνωση σε αρκετούς καρκίνους [Nelson A. et al. (2021)].

Οι δύο διακριτές υποομάδες των Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων με βάση τις λειτουργικές τους ικανότητες και το προφίλ των κυτοκινών που παράγουν, είναι τα Th1 CD4⁺ και Th2 CD4⁺ Τ κύτταρα. Το υποσύνολο Th1 των CD4⁺ Τ κυττάρων εκκρίνει κυτοκίνες που συνήθως σχετίζονται με φλεγμονή, όπως IFN- γ και TNF και επάγει κυτταρομεσολαβούμενες ανοσολογικές αποκρίσεις. Φαίνεται ότι ενορχηστρώνουν την κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία έναντι των καρκινικών κυττάρων κυρίως μέσω της ενίσχυσης των ειδικών για τον όγκο λειτουργιών των CD8⁺ Τ-κυττάρων, της επιβίωσης και της μετανάστευσης στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Tumor Microenvironment-TME). Από την άλλη, το υποσύνολο Th2 παράγει κυτοκίνες όπως η IL-4 και η IL-5 που βοηθούν τα Β κύτταρα να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν και σχετίζεται με ανοσοαποκρίσεις χυμικού τύπου. Το εάν τα κύτταρα Th2 CD4⁺ ασκούν προ- ή αντικαρκινικές επιδράσεις φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο και το στάδιο του όγκου (εξάρτηση από το περιβάλλον) [Schreiber S. et al. (2021), Laheurte C. et al. (2019)].

Τέλος, όσον αφορά τα μακροφάγα, βάσει της ενεργοποίησής τους κατατάσσονται στα κλασικά ενεργοποιημένα-M1 και τα εναλλακτικά ενεργοποιημένα-M2. Τα μακροφάγα M1 ασκούν τυπικά αντικαρκινικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της άμεσης μεσολάβησης κυτταροτοξικότητας και της εξαρτώμενης από αντισώματα κυτταροτοξικότητας (ADCC) για τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Από την άλλη τα μακροφάγα M2 μπορούν να προάγουν την εμφάνιση και τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων, να αναστείλουν την προκαλούμενη από Τ κύτταρα αντικαρκινική ανοσοαπόκριση, να προάγουν την αγγειογένεση και να οδηγήσουν σε εξέλιξη του όγκου. Τόσο τα M1 όσο και τα M2 έχουν υψηλό βαθμό πλαστικότητας και μπορούν να μετατραπούν το ένα στο άλλο μετά από αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του όγκου ή σε θεραπευτικές παρεμβάσεις. Αξίζει να αναφέρουμε και τα μακροφάγα που σχετίζονται με όγκους (TAM), που παρατηρούνται σε πολλούς όγκους. Το μικροπεριβάλλον των συμπαγών όγκων, έχει την ικανότητα να επάγει τη στρατολόγηση κυκλοφορούντων μονοκυττάρων, τα οποία μπορεί να διαφοροποιηθούν σε TAM. Τα TAM φαίνεται να μπορούν να προκαλέσουν αγγειογένεση, αναδιαμόρφωση του στρώματος, ανοσοκαταστολή και μετάσταση, έτσι φαίνεται να συμβάλλουν στην διεισδυτικότητα και τη μετάσταση των κυττάρων του όγκου και σχετίζονται με κακή πρόγνωση [Liu j. et al. (2021), Pan Y. et al. (2020)].



Εικόνα 2: Επιδράσεις της διήθησης υποπληθυσμών ανοσοκυττάρων στην πρόγνωση ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου. Αναλύθηκαν τα CD8+ T-κύτταρα, τριτοταγείς λεμφικές δομές (TLS), ρυθμιστικά T-κύτταρα (Tregs), CD68+ μακροφάγα (M) και πιο συγκεκριμένα, μακροφάγα υποτύπου M1 ή M2 ως προς την συνολική επιβίωση ασθενών. Τα έντονα χρώματα δείχνουν θετική (πράσινη) ή αρνητική (κόκκινη) προγνωστική αξία. Τα ανοιχτά χρώματα δείχνουν θετική (ανοιχτό πράσινο) ή αρνητική (πορτοκαλί) προγνωστική συσχέτιση. Οι λευκοί κύκλοι δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ή ότι παρατηρήθηκε αμφίβολη προγνωστική συσχέτιση. Το μέγεθος των κύκλων υποδεικνύει τον αριθμό των ασθενών που συμμετείχαν στις μελέτες. Μικροί κύκλοι: 0-100 ασθενείς, κύκλοι μεσαίου μεγέθους: 100-1000 ασθενείς και μεγάλοι κύκλοι: 1.000-10.000 ασθενείς (Fridman et al., 2017)

Ακόμα, η θέση εντοπισμού των TILs τα διαχωρίζει γενικά σε ενδοογκικά TILs (intratumoral TILs-iTILs), στρωματικά TILs (Stromal TILs-sTILs) και TILs στο διηθητικό όριο (Invasive Margin-IM) του όγκου. Ο βαθμός των TILs μπορεί να οριστεί τόσο από την έκταση όσο και από την πυκνότητα του διηθήματος TILs. Το πιο συχνά εφαρμοσμένο σύστημα βαθμολόγησης για την αξιολόγηση των TILs χρησιμοποιεί τρεις βαθμίδες (scores):

- Απουσία διήθησης των TILs, όπου τα λεμφοκύτταρα είτε απουσιάζουν είτε, εάν υπάρχουν, δεν αντιτίθενται άμεσα στα καρκινικά κύτταρα
- Ζωηρή διήθηση – Αυτό σημαίνει ότι παρατηρήθηκαν πολλά λεμφοκύτταρα μέσα και γύρω από τον όγκο, είτε με διάχυτη διείσδυση στον όγκο είτε σε ολόκληρη τη βάση του όγκου
- Μη ζωηρή διήθηση – Αυτό σημαίνει είτε ότι πολύ λίγα λεμφοκύτταρα παρατηρήθηκαν γύρω από τον όγκο είτε ότι η διήθηση TILs εντός του όγκου είναι απομονωμένη, τμηματική ή πολυεστιακή [Scolyer R.A and Busam K.J (2019)].

Συνοψίζοντας, η παρουσία TILs στον όγκο είναι σημάδι μίας έντονης ανοσολογικής απάντησης έναντι του όγκου και ένα ενεργό ανοσοποιητικό περιβάλλον εντός του όγκου συχνά υποδεικνύει καλύτερη πρόγνωση. Έτσι, καθώς οι καρκίνοι αναπτύσσονται, τα λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αυτά τα καρκινικά κύτταρα ως μη φυσιολογικά και διεισδύουν στον όγκο. Μόλις βρεθούν στον όγκο, τα TILs αρχίζουν να «εργάζονται» για να σκοτώσουν τα καρκινικά κύτταρα, ωστόσο μερικές φορές, εμποδίζονται από το να το κάνουν αυτό, εξαιτίας του ανοσοποιητικού συστήματος ή λόγω σημάτων από τον όγκο που αποδυναμώνουν την ανοσολογική απόκριση. Οι Αναστολείς Σημείων Ελέγχου (ΑΣΕ)-(Immune Checkpoint Inhibitors-ICIs) του ανοσοποιητικού συστήματος αναπτύχθηκαν για να μπλοκάρουν ορισμένα από αυτά τα «φρένα». Η ύπαρξη και η σημασία των TILs έχει περιγραφεί σε έναν αριθμό συμπαγών όγκων και αναδεικνύονται ως σημαντικός βιοδείκτης στην πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας και του αποτελέσματος της θεραπείας, ενώ οι λειτουργίες τους μπορούν να αλλάξουν δυναμικά κατά την εξέλιξη του όγκου και ως απόκριση στην αντικαρκινική θεραπεία. Τελευταία, μελέτες περιλαμβάνουν τη διερεύνηση του ρόλου των φαρμάκων χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας σε συνδυασμό με θεραπεία TILs για την αξιολόγηση των βελτιωμένων ποσοστών ανταπόκρισης και της συνεργιστικής αποτελεσματικότητας [Basu A. et al. (2019), Gentles A. et al. (2015)].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. TILs και καρκίνος του μαστού (BC)

Ο καρκίνος του μαστού (Breast Cancer-BC) είναι ο πιο συχνός καρκίνος παγκοσμίως με ποσοστό 12,5% και ο πιο συχνός για τις γυναίκες με ποσοστό 25,8% όλων των νέων περιπτώσεων για το 2020. Παγκοσμίως, είναι η 5^η κύρια αιτία θανάτου στις γυναίκες. Το μέσο ποσοστό 5ετούς επιβίωσης για τις γυναίκες στις Η.Π.Α με μη διηθητικό BC είναι 90%, αν έχει εξαπλωθεί στους περιφερειακούς λεμφαδένες είναι 86% και εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένο σημείο του σώματος είναι 29% [Cancer.Net (2022)].

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να είναι διηθητικός ή μη διηθητικός ανάλογα με τη σχέση του με τη βασική μεμβράνη. Τα μη διηθητικά νεοπλάσματα του μαστού χωρίζονται ευρέως σε δύο κύριους τύπους, το λοβιακό καρκίνωμα in situ (Lobular carcinoma in situ-LCIS) και πορογενές καρκίνωμα in situ (Ductal carcinoma in situ-DCIS). Από την άλλη, ο Διηθητικός Πορογενής Καρκίνος Μαστού (Invasive ductal carcinoma-IDC) είναι ένας διηθητικός καρκίνος όπου τα ανώμαλα καρκινικά κύτταρα

που άρχισαν να σχηματίζονται στους γαλακτοφόρους πόρους έχουν εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του ιστού του μαστού. Το IDC είναι ο πιο κοινός τύπος BC, αποτελεί το 70-80% όλων των διαγνώσεων και είναι ο τύπος BC που προσβάλλει συχνότερα και τους άνδρες. Η αντιμετώπιση του ξεκινά με βιοψία μαστού για πλήρη ιστολογική ανάλυση για να δούμε το βαθμό επιθετικότητας, την έκφραση οιστρογονικών (ER)/προγεστερονικών (PR) υποδοχέων και του υποδοχέα HER2. Έτσι, έχουμε τον HER2-θετικό BC, τον HER2-αρνητικό BC, ενώ ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (Triple-negative breast cancer-TNBC), αναφέρεται στο γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα δεν έχουν υποδοχείς οιστρογόνων ή προγεστερόνης (ER ή PR) και επίσης ότι παράγουν λίγη ή καθόλου από την πρωτεΐνη που ονομάζεται HER2 και τείνει να έχει χειρότερη πρόγνωση [National Breast Cancer Foundation (2020)].

Ο καρκίνος του μαστού, ενώ δεν θεωρούνταν ανοσολογικά ενεργός, συγκριτικά με όγκους όπως για παράδειγμα το μελάνωμα, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι τα TILs που υπάρχουν στον καρκίνο του μαστού, πριν από τη θεραπεία μπορεί να σχετίζονται με την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη βελτίωση της πρόγνωσης. Ωστόσο, η επίδραση των TILs στην κλινική έκβαση είναι πιο εμφανής όταν οι υποτύποι του καρκίνου του μαστού αξιολογούνται ξεχωριστά. Σε παλαιότερη μεγάλη μελέτη του Mahmoud S. et al. αναφέρεται ότι τα αυξημένα επίπεδα διήθησης CD8+ T-κύτταρων προβλέπουν βελτιωμένη κλινική έκβαση και αυξημένο χρόνο επιβίωσης για ασθενείς με BC. Επιπλέον, έχει φανεί πως διήθηση κυττάρων T-BET+ μπορεί επίσης να είναι καλός προγνωστικός δείκτης για βελτιωμένη επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) σε όλους τους υποτύπους καρκίνου του μαστού, με ασθενείς με όγκους που περιέχουν <30 κύτταρα TBET+ να έχουν μειωμένο DFS σε σύγκριση με ασθενείς με όγκους που περιέχουν ≥ 30 κύτταρα TBET+, ενώ η παρουσία του δείκτη Th2 FOXP3+ στον όγκο έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση [Stanton S. and Disis M. (2016)].

Η μελέτη των Stanton and Disis, το 2016 διερεύνησε την κλινική σημασία των λεμφοκυττάρων που διεισδύουν στον όγκο σε καρκίνο του μαστού, ελέγχοντας τόσο τα επίπεδα των λεμφοκυττάρων όσο και τη σχέση τους με την πρόγνωση του BC. Οι μελετητές σημειώνουν ότι η προσαρμοστική ανοσοαπόκριση στον καρκίνο του μαστού μπορεί να παρατηρηθεί σε διηθητικές βλάβες του μαστού ήδη, από την καλοήγη ατυπία του μαστού και αυξάνεται σε πυκνότητα καθώς αναπτύσσεται διηθητική κακοήθεια. Αυτό υπογραμμίζεται και σε μία αναδρομική μελέτη 53 δειγμάτων μαστεκτομής των Hussein MR and Hassan HI (2006), όπου εντοπίστηκε αυξημένη διήθηση B- και T-λεμφοκυττάρων στην καλοήγη υπερπλασία πόρου του μαστού, ακόμα μεγαλύτερο στο

DCIS και έφτασε στη μέγιστη πυκνότητα στον διηθητικό καρκίνο του μαστού [Stanton and Disis (2016), Hussein and Hassan (2006)].

Πιο συγκεκριμένα για DCIS, σε μια μελέτη 27 ασθενών με DCIS της Thompson E. et al., όλοι οι όγκοι έδειξαν κάποιο επίπεδο διήθησης TILs και το 78% του DCIS είχε >5% διήθηση. Ακόμα, η υψηλή λεμφοκυτταρική διήθηση συσχετίστηκε με νεαρή ηλικία και TNBC DCIS, παρόμοιο με τον διηθητικό καρκίνο, με όλα τα TNBC DCIS ($p=0,0008$) να έχουν προγραμματισμένη έκφραση του συνδέτη υποδοχέα προγραμματισμένου θανάτου 1(programmed cell death ligand-1-PD-L1). Ο φαινότυπος των T-κυττάρων έχει επίσης αποδειχθεί ότι προβλέπει την πρόγνωση στο DCIS σε μια μελέτη 62 δειγμάτων DCIS, όπου η διήθηση FOXP3+ μεγαλύτερη από τη μέσο όρο των ασθενών ήταν προγνωστικός δείκτης για μειωμένη ελεύθερη υποτροπής επιβίωση (RFS), ενώ αντίθετα, η αυξημένη έκφραση του γονιδίου Th1 ήταν προγνωστικός δείκτης για τη βελτιωμένη επιβίωση σε 31 ασθενείς με DCIS [Thompson et al. (2016), Bates G et al. (2006)].

Στον διηθητικό καρκίνο του μαστού, το μεγαλύτερο κλινικό όφελος έχει παρατηρηθεί σε όγκους με λεμφοκυτταρική διήθηση μεγαλύτερη από 50% (Lymphocyte-predominant breast cancer-LPBC). Ο Denkert et al., έδειξε ότι σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο καρκίνο του μαστού που υποβλήθηκαν σε εισαγωγική χημειοθεραπεία και είχαν TILs>50% (LPBC) είχαν 40% παθολογική πλήρη ανταπόκριση (Pathologic complete response-pCR) σε σύγκριση με 7% pCR σε ασθενείς με όγκους που δεν είχαν λεμφοκυτταρική διήθηση. Το LPBC είναι πιο κοινό τόσο στο TNBC όσο και στο HER2⁺ BC. Επιπλέον, σε μία έρευνα της Hida et al. του 2016, σε ασθενείς με διηθητικό BC, σταδίου I έως III, που έλαβαν νέο-επικουρική χημειοθεραπεία για τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού και για HER2⁺ BCs, στους οποίους αξιολογήθηκαν τα επίπεδα TILs (χαμηλά, ενδιάμεσα και υψηλά) σε σχέση με την επιβίωση χωρίς υποτροπή (RFS), αποκαλύφθηκε ότι οι ομάδες χαμηλών επιπέδων TILs εμφάνισαν χειρότερες προγνώσεις από τις ομάδες κυρίως των υψηλών επιπέδων TILs στον TNBC και στον HER2⁺. Βέβαια, οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο στον HER2⁺ ($p=0,007$) και όχι στον TNBC ($p=0,24$). Ακόμα, σε ασθενείς με διηθητικό BC (σταδίου I-III) που ήταν είτε TNBC είτε HER2⁺ και έχουν υποβληθεί σε θεραπευτική χειρουργική επέμβαση και τυπική μετεγχειρητική χημειοθεραπεία και αξιολογήθηκαν πάλι για τα επίπεδα TILs (χαμηλά, ενδιάμεσα και υψηλά) σε σχέση με την RFS, τα υψηλά TILs αποδείχθηκαν ότι έχουν σημαντική θετική προγνωστική αξία ($p=0,015$) σχετικά με την RFS στον TNBC, αλλά αυτό δεν

επαληθεύτηκε ($p=0,097$) και μεταξύ των HER2+ BCs [Hida A. et al. (2016), Denkert C. et al. (2010)].

Σε μια μελέτη 256 όγκων TNBC, από τη Loi S. et al. φάνηκε ότι κάθε αύξηση 10% στα TILs συσχετίστηκε με 17% μείωση στον κίνδυνο υποτροπής ($p=0,023$) και 27% μειωμένο κίνδυνο θανάτου ($p=0,035$). Ομοίως, για κάθε αύξηση 10% στα στρωματικά TILs υπήρχε 18% αύξηση στο OS σε 112 ασθενείς με καρκίνο του μαστού HER2+. Βέβαια, τόσο για τον HER2+ καρκίνο του μαστού όσο και για τον TNBC, ενώ η καλύτερη ανταπόκριση έχει παρατηρηθεί σε LPBC που έχει την υψηλότερη διήθηση, ακόμη και μικρές σταδιακές αυξήσεις των TILs (10%) τόσο εντός όσο και γύρω από τον όγκο οδηγούν σε βελτίωση της επιβίωσης στους ασθενείς, μπορούν να αποτελέσουν προγνωστικούς δείκτες για την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία υποδεικνύοντας ότι ακόμη και θεραπείες που αυξάνουν μέτρια τα TILs μπορούν να ωφελήσουν τα κλινικά αποτελέσματα σε αυτούς τους υποτύπους [Loi S. et al. (2013)].

Γενικότερα, σε TNBC με υψηλότερα επίπεδα TILs φαίνονται οι βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες προγνώσεις να είναι καλύτερες. Τα υψηλά επίπεδα συγκεκριμένων υποτύπων των TILs (CD4+, CD8+) είναι προγνωστικά μιας θετικής μακροπρόθεσμης πρόγνωσης για τον TNBC. Ένα υψηλό επίπεδο CD4+ TIL έχει συσχετιστεί με καλύτερο OS και DFS, ενώ ένα υψηλό επίπεδο CD8+ TIL έχει συσχετιστεί μόνο με καλύτερο DFS, καθώς δεν βρέθηκε στατιστική συσχέτιση με το OS. Η διήθηση CD8+ φάνηκε να προβλέπει ένα όφελος επιβίωσης στον TNBC, αλλά όχι και στον HER2+. Επιπλέον, η παρουσία έκφρασης του TBET+ (παράγοντας μεταγραφής T-box 21), σε πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των δενδριτικών κυττάρων, NK κυττάρων, CD4+ και CD8+ δραστικών κυττάρων, B κυττάρων και σε ένα υποσύνολο ρυθμιστικών T κυττάρων, φαίνεται να απαιτείται για την επιβίωση, την ανάπτυξη και τη σωστή λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού, ενώ έχει φανεί να προωθεί την αντικαρκινική δράση των τελεστικών CD8+ κυττάρων. Έτσι, η αυξημένη διήθηση TILs με έκφραση TBET+ προέβλεψε βελτιωμένη RFS σε 102 όγκους HER2 που έλαβαν θεραπεία με trastuzumab. Η μόνη μελέτη, του Liu et al., 2012, που διαχώρισε τους όγκους βάσει της έκφρασης των ορμονικών υποδοχέων HER2, βρήκε ότι η διήθηση των CD8+ συσχετίστηκε με RFS στον HER2(-) BC αλλά όχι στον HER2(+) BC. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η διήθηση του ανοσοποιητικού στον καρκίνο του μαστού HER2+ μπορεί να επηρεάζεται περισσότερο από την κατάσταση των ορμονικών

υποδοχέων παρά από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER2 [Gao Z. et al. (2020), Liu S. et al. (2012)].

Ακόμα, μόνο το 6% των όγκων θετικών για ER ή PR ή και για τους δύο υποδοχείς (HR+ όγκοι) αλλά αρνητικών για HER2 έχουν LPBC και λιγότεροι από τους μισούς έχουν διήθηση CD8+ T-κυττάρων. Τα μειωμένα TILs μπορεί να οφείλονται στην έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνου που έχει αποδειχθεί ότι προάγει ένα ανοσοποιητικό περιβάλλον Th2 και μειώνει την έκφραση MHC τάξης II στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Επίσης, δυνητικά, μια θεραπεία που θα μπορεί να μειώνει αποτελεσματικά τη διήθηση FOXP3+ θα μπορούσε να αυξήσει το μέγεθος της λεμφοκυτταρικής διήθησης σε όγκους HR και να βελτιώσει επικουρικά την κλινική ανταπόκριση [Stanton and Disis (2016)].

Παράλληλα, η μελέτη των Cornelia Kolberg-Liedtke et al. διαπίστωσε ότι τα ποσοστά επιβίωσης χωρίς νόσο (DFS) ήταν σημαντικά καλύτερα ($p=0,04$) σε ασθενείς HR- αρνητικούς, με υψηλά έναντι ενδιάμεσων επιπέδων TIL και ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με χαμηλά έναντι ενδιάμεσων επιπέδων TIL, ωστόσο με οριακή σημασία. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των κατηγοριών TIL σε ασθενείς με HR+. Ακόμα, σε ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία, το DFS στην κατηγορία του ενδιάμεσου TIL ήταν χαμηλότερο από αυτό στις άλλες κατηγορίες. Συμπερασματικά, οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα TILs εμφανίζουν ευνοϊκό DFS 5 ετών και στον HR-θετικό/HER2-αρνητικό και στον TNBC. Επιπλέον τα ευρήματα της έρευνας του Takada K. et al., έδειξαν ότι σε ασθενείς με HR+/HER2- που δεν υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία, τα επίπεδα TILs μπορεί να προβλέψουν τη μακρινή μεταστατική υποτροπή στα στάδια I-II του καρκίνου του μαστού, με την παρουσία TILs να σχετίζεται με στατιστικά σημαντικά λιγότερη μετάσταση σε σχέση με ασθενείς με μηδενική πυκνότητα TILs [Kolberg-Liedtke et al. (2022), Takada K. et al. (2021)].

Όσον αφορά τη συσχέτιση TILs με την χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία, ο Oğuzhan Okcu et al., δημοσίευσε μελέτη για την τιμή των TILs σε σχέση με την επιβίωση σε 350 ασθενείς με καρκίνο μαστού HER2 και TNBC που έλαβαν χημειοθεραπεία, αξιολογώντας τα TILs και τον όγκο των λεμφοκυττάρων που διεισδύουν στον όγκο (Tumor-infiltrating Lymphocyte Volume-TILV), ο οποίος προκύπτει λαμβάνοντας υπόψιν τόσο τον όγκο του στρώματος του όγκου όσο και το ποσοστό των στρωματικών TILs. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η παρουσία αυξημένων στρωματικών TILs συσχετίστηκε με βελτιωμένη επιβίωση ($p=0,036$), μετάσταση ($p=0,009$), υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 ($<0,001$). Το

υψηλό TILV συσχετίστηκε με αρνητικότητα ER και PR ($p < 0,001$), θετικότητα HER2 ($p = 0,013$), αυξημένο Ki-67 ($p = 0,001$) και αυξημένο μέγεθος όγκου ($p = 0,0011$). Έτσι, τα TILs είναι μια προγνωστική και βιολογική παράμετρος που μπορεί να αξιολογηθεί σε BC και να προβλέψει την ανταπόκριση στη θεραπεία. Παράλληλα, η αποτελεσματικότητα των TILs στην ογκοκαταστολή αυξάνεται σε συνδυασμό με επικουρικές θεραπείες που έχουν ως στόχο τη μείωση της πιθανότητας επανεμφάνισης του καρκίνου, όπως είναι η επικουρική χημειοθεραπεία (CT), η ορμονοθεραπεία και η επικουρική ακτινοθεραπεία (RT) και την ανοσοθεραπεία και είναι ένας από τους παράγοντες που καθορίζουν την επιτυχία της θεραπείας [Okcu O. et al. (2022)].

Τέλος, σε μία άλλη μελέτη, η Ledonara De Boo et al. (2020) αξιολόγησε τα TILs και τον φαινότυπο BRCA-like σε BC σταδίου III. Ο όρος «BRCA-like» περιγράφει όγκους που παρουσιάζουν βλάβη στο μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination repair-HR) αλλά δεν έχουν ανιχνεύσιμη βλαστική μετάλλαξη στο BRCA1 ή το BRCA2. Κατέληξε ότι στην κοορτή με καρκίνου του μαστού υψηλού κινδύνου, αυξημένα επίπεδα TILs συσχετίστηκαν TNBC και BRCA1-like όγκους και ότι τα επίπεδα TILs σε BRCA1-like όγκους ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με BRCA2-like όγκους. Όταν προσαρμόστηκαν για τα κλινικά χαρακτηριστικά, τα TILs συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά με πιο ευνοϊκή έκβαση σε ασθενείς σταδίου III BC [De Boo L. et al. (2020)].

3.2 TILs και καρκίνος του πνεύμονα (ΜΜΚΠ)

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι από τους πιο συχνούς παγκοσμίως και παρουσιάζει την υψηλότερη νοσηρότητα και θνησιμότητα από όλους τους κακοήθεις όγκους. Ο βασικός ιστολογικός υπότυπος του καρκίνου του πνεύμονα είναι ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (ΜΜΚΠ), όπου περιγράφει μια κατηγορία περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα στην οποία τα κύτταρα δεν χαρακτηρίζονται ως «μικρά» κατά τη μικροσκοπική εξέταση. Οι 3 κύριοι ιστολογικοί τύποι του είναι το πλακώδες καρκίνωμα, το αδenoκαρκίνωμα και το καρκίνωμα του πνεύμονα από μεγάλα κύτταρα. Συνολικά αντιπροσωπεύει το 80 με 85% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα και θεραπευτικά αντιμετωπίζεται με χειρουργική θεραπεία στα αρχικά στάδια του ως μόνη πιθανότητα κλινικής ίασης. Η πρόγνωση των ασθενών με ΜΜΚΠ προβλέπεται με τη σταδιοποίηση του TNM με βάση την ιστοπαθολογία ή την εικόνα, με αυξανόμενα στοιχεία να δείχνουν ότι αυτή η μέθοδος δεν είναι η πιο ακριβής. Επομένως, απαιτείται ένας νέος ακριβής και αποτελεσματικός βιολογικός

δείκτης για την αξιολόγηση της πρόγνωσης του ΜΜΚΠ και εδώ είναι που έχουν μεγάλη αξία τα TILs [Chen B. et al. (2020)].

Πολλά άρθρα και μετα-αναλύσεις έχουν δείξει ότι η υψηλή πυκνότητα διαφόρων υποτύπων TILs είναι ένας καλός προγνωστικός βιοδείκτης για ασθενείς με ΜΜΚΠ. Ωστόσο, σε άλλες μελέτες περιγράφονται αντίθετα δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα, σε μία μελέτη του Tian C. et al., σε 129 ασθενείς που έλαβαν θεραπευτικές εκτομές του ΜΜΚΠ και δεν είχαν λάβει επικουρική ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία πριν από την επέμβαση έδειξε ότι ο αριθμός των CD3⁺ και CD8⁺ TILs στο TS του καρκίνου ήταν σαφώς υψηλότερος από αυτόν στις TN και ότι οι ασθενείς με ΜΜΚΠ με υψηλά επίπεδα CD3⁺ T κύτταρα στον όγκο είχαν στατιστικά σημαντικά καλύτερο OS 5 ετών σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλά επίπεδα CD3⁺ T κύτταρα, ενώ τα υψηλά επίπεδα CD8⁺ T κυττάρων στον όγκο συσχετίστηκαν με κακή πρόγνωση. Ακόμα, στη μελέτη του O'Callaghan et al. (2015) σε 197 ασθενείς που και αυτοί είχαν υποβληθεί σε χειρουργική εκτομή του ΜΜΚΠ έγινε αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας των διηθήσεων των CD3⁺, CD8⁺ και FOXP3⁺ T-λεμφοκυττάρων. Φάνηκε πως οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα FOXP3⁺ T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου είχαν σημαντικά χειρότερη έκβαση, γεγονός που συνάδει με τις παρατηρήσεις άλλων ερευνητών. Το αντίθετο μοτίβο παρατηρήθηκε για τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα, όπου μια σχετικά υψηλότερη ενδοογκική διήθηση CD8⁺ προσέφερε ευνοϊκή πρόγνωση, ενώ ένας αυξημένος αριθμός CD8⁺ στο στρώμα του όγκου συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση. Επίσης, ασθενείς με πρότυπο CD8^{HIGH}/FOXP3^{LOW} είχαν τη μεγαλύτερη επιβίωση (77% ποσοστό επιβίωσης 5 ετών), ενώ εκείνοι με πρότυπο CD8^{LOW}/FOXP3^{HIGH} είχαν ιδιαίτερα κακή έκβαση (8% ποσοστό επιβίωσης 5 ετών). Τα μέσα ποσοστά συνολικής επιβίωσης για τις ομάδες CD8^{HIGH}/FOXP3^{HIGH} και CD8^{LOW}/FOXP3^{HIGH} ήταν 31,0 μήνες και 17,2 μήνες, αντίστοιχα. Παρόμοια παρατήρησή έκανε και μία ομάδα ερευνητών που βρήκαν ότι οι χαμηλές πυκνότητες ώριμων δενδριτικών κυττάρων και CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα προσδιορίζουν υποομάδες ασθενών με ΜΜΚΠ με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο θανάτου. Ωστόσο, δεν υπάρχει ακόμα πλήρης κατανόηση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ CD8⁺ και FOXP3⁺ T-λεμφοκυττάρων, B-λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων στο πλαίσιο του ΜΜΚΠ και αξίζει περαιτέρω διερεύνηση. Οι αντικρουόμενες αναφορές σχετικά με την προγνωστική αξία των TILs στο ΜΜΚΠ, ενδεχομένως οφείλονται στη θέση της διήθησης, στους διαφόρους υποτύπους των TILs που αναλύονται, στους διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών και στα διαφορετικά

συστήματα αξιολόγησης των TILs. Στόχος λοιπόν είναι να εξεταστούν πιο λεπτομερώς όλες αυτές οι συνθήκες και να διαλευκανθεί και να κατανοηθεί σε ποιες περιπτώσεις τα TILs έχουν αρνητική και σε ποιες θετική προγνωστική αξία [Tian C. et al. (2015), O'Callaghan D. et al. (2015), Petersen R. et al. (2006)].

Το 2015, μία μετα-ανάλυση του Geng Y. et al. (2015) που περιλάμβανε 8.600 ασθενείς είχε στόχο την αξιολόγηση του προγνωστικού ρόλου των TILs (CD3+, CD4+, CD8+ και FOXP3+) στον καρκίνο του πνεύμονα και της συσχέτισής τους με την έκβαση των ασθενών. Τα TILs χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, τα λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στον πυρήνα του όγκου (Tumor Nest-TN) και αυτά που εμφανίζονται στο στρώμα του όγκου (Tumor Stroma-TS). Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα διήθησης των CD8+ και CD3+ κυττάρων στο TS και στο TN και η αυξημένη διήθηση CD4+ T λεμφοκυττάρων ειδικά στο TS, συσχετίστηκαν με καλύτερη OS ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Αντίθετα, η υψηλή πυκνότητα διήθησης των T κυττάρων FOXP3+ στο TS συσχετίστηκε με φτωχή PFS (P<0.001). Έτσι, υψηλά επίπεδα διήθησης των CD3+, CD4+, CD8+ T κυττάρων θα μπορούσαν να αναγνωρίζονται ως θετικοί προγνωστικοί παράγοντες ενώ υψηλή πυκνότητα διήθησης T κυττάρων FOXP3+ θα μπορούσε να αναγνωρίζεται ως αρνητικός προγνωστικός παράγοντας [Geng Y. et al. (2015)].

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και μία μεγαλύτερη και πιο πρόσφατη συστηματική μετα-ανάλυση του Chen et al. (2020) σε 45 μελέτες που περιλάμβαναν 11.448 ασθενείς με ΜΜΚΠ μετά από χειρουργική επέμβαση εκτομής ΜΜΚΠ με στόχο τη διαλεύκανση της προγνωστικής αξίας των υποσυνόλων TILs, CD3+, CD4+, CD8+, FOXP3+ και CD20+ TIL στον ΜΜΚΠ. Η μετά-ανάλυση έδειξε ότι μια υψηλή πυκνότητα TILs έδειξε καλύτερη OS και PFS για ασθενείς με ΜΜΚΠ και ότι τα TILs είναι ένας καλός προγνωστικός παράγοντας για το ΜΜΚΠ και όσο μεγαλύτερη είναι η πυκνότητα των TILs στο TN, τόσο καλύτερη είναι η πρόγνωση για τους ασθενείς με ΜΜΚΠ. Έπειτα, μελετήθηκε ξεχωριστά η προγνωστική αξία κάθε υποτύπου TILs. Αρχικά, όσον αφορά τα CD3+ TILs, μια υψηλή πυκνότητα τους στο TN έδειξε καλύτερη OS και DSS, ενώ μια υψηλή πυκνότητα CD3+ TILs στο TS έδειξε καλύτερο DSS αλλά δεν παρατηρήθηκε εμφανώς ευνοϊκό OS για ασθενείς με ΜΜΚΠ. Η λειτουργία των CD3+ TILs σε ασθενείς με ΜΜΚΠ είναι επί του παρόντος ασαφής, γιατί όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο Petersen RP et al. ανέφερε ότι όλοι οι ασθενείς θα μπορούσαν να ωφεληθούν από μια υψηλή πυκνότητα CD3+ TILs, ενώ ο O'Callaghan et al. (2015), υποστήριξε ότι υψηλά CD3+ TIL σε συνδυασμό με CD8+

και FOXP3+ σχετίζονται με χειρότερη επιβίωση στους ασθενείς. Ωστόσο, στην πλειοψηφία των ερευνών και στη συγκεκριμένη μετα-ανάλυση του Chen et al. φάνηκε να έχουν θετική προγνωστική αξία. Έχει υποτεθεί ότι τα CD3+ και τα CD8+ T κύτταρα παίζουν συνεργιστικό ρόλο στην προώθηση της πρόγνωσης για ασθενείς με MMΚΠ. Επιπρόσθετα, μια υψηλή πυκνότητα CD4+ TILs στο TN έδειξε ευνοϊκή OS και DSS και μια υψηλή πυκνότητα CD4+ TIL στο TS έδειξε καλύτερο DSS για τους ασθενείς. Για τα FOXP3+ TILs συνολικά, η πρόγνωση και επιβίωση των ασθενών με MMΚΠ φάνηκε να μην συνδέεται με την έκφραση και πυκνότητα των FOXP3+ TILs. Ωστόσο, για την ανάλυση της υποομάδας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μια υψηλή πυκνότητα FOXP3+ TILs στο TN έδειξε χειρότερο RFS για ασθενείς με MMΚΠ, ενώ δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά για το OS ή το DFS στο TN ή στο TS. Τα αποτελέσματα έδειξαν γενικότερα ότι τα FOXP3+ TILs μπορεί να σχετίζονται με υποτροπή του όγκου. Όσον αφορά, τα CD8+ TILs, μια υψηλή πυκνότητα τους στο TN έδειξε καλύτερο OS, PFS, DFS, RFS και DSS καθώς και καλύτερο OS, PFS, DFS και DSS, όταν βρισκόντουσαν σε αυξημένη πυκνότητα στο TS, των ασθενών. Έτσι, γενικότερα η αυξημένη παρουσία CD8+ TILs στο TN και στο TS σχετίζεται με ευνοϊκότερη έκβαση ασθενών με MMΚΠ και αυτό ίσως σχετίζεται με τον ρόλο τους στην άμεση θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μετα-ανάλυση είναι πρώτη που αξιολογεί την τιμή των CD20+ TILs στον MMΚΠ. Η CD20 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που έχει αναγνωρισθεί ως δείκτης επιφανείας των Β-λεμφοκυττάρων. Η έκφραση του CD20 ξεκινά στο στάδιο ανάπτυξης των προ-B κυττάρων και παραμένει παρούσα μέχρι την τελική διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρο. Θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων. Η έρευνα έδειξε ότι υψηλή πυκνότητα CD20+ TILs στο TN συσχετίζεται με ευνοϊκή OS αλλά όχι και καλύτερο DSS για τους ασθενείς με MMΚΠ. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά έδειξαν ότι υψηλή πυκνότητα των υποτύπων TILs, CD3+, CD4+, CD8+ και CD20+ στο TN είναι ευνοϊκοί προγνωστικοί βιοδείκτες για ασθενείς με MMΚΠ μετά από χειρουργική επέμβαση για τη θεραπεία του καρκίνου, ενώ μια υψηλή πυκνότητα FOXP3+ TILs στο TN είναι κακός προγνωστικός βιοδείκτης. Οι διαφορετικοί υπότυποι TILs είχαν διαφορετικό προγνωστικό ρόλο στο TN ή TS στους ασθενείς, επομένως σημειώνεται από την έρευνα ότι η ανίχνευση της πυκνότητας των TILs στον καρκινικό ιστό θα είναι χρήσιμη για την καθοδήγηση της θεραπείας του MMΚΠ, την αξιολόγηση της πρόγνωσης και την παρακολούθηση της υποτροπής ή της μετάστασης στο μέλλον [Chen B. et al. (2020)].

Στη συνέχεια, θα αναφερθούν μελέτες που ερευνούν την έκφραση και την πυκνότητα των TILs ως προγνωστικούς παράγοντες έκβασης σε συνδυασμό με την χημειοθεραπεία και την ανοσοθεραπεία σε ασθενείς με MMKΠ διαφόρων σταδίων. Επί του παρόντος, η επικουρική χημειοθεραπεία συνιστάται για ασθενείς με MMKΠ σταδίου I υψηλού κινδύνου. Ωστόσο, ο εντοπισμός ασθενών υψηλού κινδύνου παραμένει μια πρόκληση. Η μελέτη του Teng F. et al., σε 126 ασθενείς με χειρουργική εκτομή του MMKΠ σταδίου I, στόχευε στο να εντοπίσει τις ομάδες ασθενών που είναι πιο πιθανό να ωφεληθούν από την επικουρική χημειοθεραπεία με βάση το micro-ανοσοποιητικό περιβάλλον του όγκου. Για να το κάνει αυτό διερεύνησε τα επίπεδα έκφρασης των CD8+TILs, PD-L1 και FOXP3+TILs στον MMKΠ σταδίου I, που καθοδηγούν αποφάσεις για χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας στους ασθενείς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα CD8+TILs συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά με το DFS και το OS σε ασθενείς με χειρουργική εκτομή του MMKΠ σταδίου I και τα CD8+TILs φάνηκαν να είναι καλύτερος προγνωστικός δείκτης για το DFS από τα παραδοσιακά χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου. Με βάση αυτό, ασθενείς με χειρουργική εκτομή MMKΠ σταδίου I που εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα CD8+TILs θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν για επικουρική χημειοθεραπεία, ακόμη και αν δεν έχουν χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου. Επιπλέον, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης PD-L1 και της έκβασης του καρκίνου των ασθενών. Επίσης, ως ομάδα ανοσοκατασταλτικών λεμφοκυττάρων, τα FOXP3+TILs από μόνα τους δεν εμφάνισαν προγνωστική συσχέτιση για τους ασθενείς με σταδίου I MMKΠ, αλλά συσχετίστηκαν με DFS όταν συνδυάστηκαν με CD8+TIL. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς με αναλογία FOXP3+^{LOW}/CD8+^{HIGH} TILs τείνουν να έχουν παρατεταμένο DFS. Ωστόσο, υπογραμμίζεται ότι η προγνωστική αξία των FOXP3/CD8+TILs μπορεί να οφείλεται κυρίως στην επίδραση των CD8+TILs [Teng F. et al. (2016)].

Όσον αφορά τη συσχέτιση θεραπείας με μονοκλωνικά αντισώματα και TILs σε ασθενείς με MMKΠ, αξίζει να αναφερθεί η μελέτη του Fumet et al. (2018) που παρατήρησε ότι, σε ασθενείς με MMKΠ που έλαβαν θεραπεία με nivolumab, ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα ανοσοσφαιρίνης G4 (IgG₄), η οποία είναι υποκατηγορία της ανοσοσφαιρίνης G (Immunoglobulin G-IgG) και αποτελεί φυσιολογικά περίπου το 5% της ολικής IgG. που προσδένεται στον υποδοχέα της πρωτεΐνης προγραμματισμένου θανάτου-1 (PD-1) και αναστέλλει την αλληλεπίδραση με τους συνδέτες PD-L1 και PD-L2 και φαίνεται να ενισχύει την αντινεοπλασματική

απάντηση των T-κυττάρων και να οδηγεί σε αναστολή της δραστηριότητας της PD-1 και μειωμένη ανάπτυξη του όγκου, η υψηλή έκφραση των CD8+ TILs συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με καλύτερο PFS και ποσοστό ανταπόκρισης στη θεραπεία (Response Rate-RR), το οποίο δείχνει το ποσοστό των ασθενών των οποίων ο καρκίνος συρρικνώθηκε ή εξαλείφθηκε μετά τη θεραπεία [Fumet J. et al. (2018)].

Επιπρόσθετα, στη μελέτη της Gataa I. et al., στόχος ήταν να προσδιοριστεί η συσχέτιση των στρωματικών TILs με το αποτέλεσμα για αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού (ICIs) και για χημειοθεραπεία σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ. Συνολικά, συμπεριελήφθησαν 221 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με nivolumab και 189 ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία. Στην ομάδα ασθενών που έλαβαν nivolumab, τα υψηλά επίπεδα TILs παρατηρήθηκαν στο 22% των ασθενών και συσχετίστηκαν με ευνοϊκό OS και PFS. Η διάμεση τιμή PFS ήταν 13,0 μήνες στην ομάδα με αυξημένα επίπεδα TILs έναντι 2,2 μήνες στην ομάδα με χαμηλό αριθμό TILs. Επίσης, υψηλά επίπεδα TILs συσχετίστηκαν με το συνολικό ποσοστό απόκρισης (Overall Response Rate-ORR) και το ποσοστό ελέγχου της νόσου (Disease Control Rate-DCR) (και στα δύο $P < .0001$). Από την άλλη, στην ομάδα που έλαβε χημειοθεραπεία υψηλά επίπεδα TILs παρατηρήθηκαν 37% των ασθενών. Η διάμεση τιμή PFS και OS ήταν 5,7 μήνες και 11,7 μήνες, αντίστοιχα, χωρίς συσχέτιση ωστόσο με τα TILs. Έτσι, η υψηλή πυκνότητα TILs συσχετίστηκε με ευνοϊκά αποτελέσματα στην ομάδα ασθενών με ΜΜΚΠ που έλαβαν ανοσοθεραπεία (nivolumab), αλλά όχι και στην ομάδα που έλαβε χημειοθεραπεία, υποδηλώνοντας ότι τα TILs μπορεί να είναι χρήσιμα στην επιλογή ασθενών για ανοσοθεραπεία [Gataa I. et al. (2021)].

Ακόμα, σε μία άλλη έρευνα του Uryvaev et al. (2018), σε 26 ασθενείς με ΜΜΚΠ με μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα του EGFR (Epidermal growth factor receptor), αποκαλύφθηκε ότι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης του EGFR (EGFR TKIs) που αναστέλλουν τη λειτουργία του πρωτεϊνικού παραγώγου του μεταλλαγμένου γονιδίου, η αναλογία CD8+/CD4+ θα μπορούσε να έχει προγνωστικό ρόλο στη θεραπεία καθώς μια χαμηλότερη αναλογία είναι ενδεικτική ενός χαμηλότερου ρυθμού απόκρισης, σε σύγκριση με μια υψηλότερη αναλογία [Uryvaev A. et al. (2018)].

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί μία έρευνα του He Y. et al, όπου αναλύθηκε η έκφραση της ενεργοποιητικής πρωτεΐνης 3 των λεμφοκυττάρων (Lymphocyte-activation gene 3-LAG-3) και η συσχέτισή της με τα PD-1, PD-L1 και τα TILs, καθώς και η συσχέτισή της με την επιβίωση ασθενών με ΜΜΚΠ. Το γονίδιο LAG-3

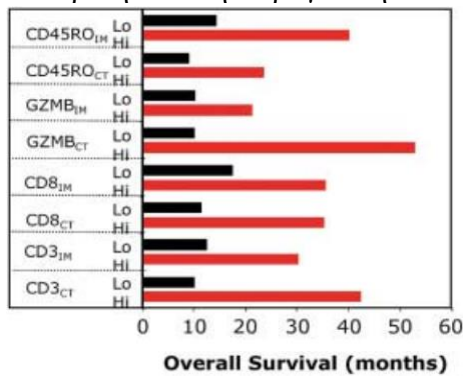
εκφράζεται στα Tregs και εμπλέκεται στη μεσολάβηση της λειτουργίας τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς των οποίων τα TILs ήταν LAG-3-αρνητικά έχουν μεγαλύτερη RFS και OS έναντι των ασθενών με MMKP των οποίων τα TILs ήταν LAG-3-θετικά. Επιπλέον, μια υψηλή έκφραση του LAG-3 συσχετίστηκε με μια υψηλότερη έκφραση του PD-1 στα TILs. Όταν λήφθηκε υπόψη η έκφραση τόσο του LAG-3 όσο και του PD-L1, οι ασθενείς των οποίων τα κύτταρα όγκου είναι PD-L1-αρνητικά και LAG-3-αρνητικά TILs έχουν μεγαλύτερο RFS από τους ασθενείς που είναι PD-L1-θετικά ή LAG-3-θετικά ή αν και τα δύο ήταν θετικά. Ωστόσο, σίγουρα απαιτούνται περαιτέρω μελέτες επικύρωσης σχετικά με τη χρήση του ως πιθανού προγνωστικού βιοδείκτη [He Y. Et al. (2017)].

Συμπερασματικά, αυτό που έχει φανεί μέχρι στιγμής από προκλινικές και κλινικές μελέτες είναι ότι τα αυξημένα επίπεδα συγκεκριμένων υποτύπων TILs συσχετίζονται σημαντικά με την πρόγνωση στον MMKP και την επιβίωση των ασθενών μετά τη θεραπεία με χειρουργική επέμβαση εκτομής MMKP, την ανοσοθεραπεία καθώς και τη χημειοθεραπεία σε MMKP σταδίου I.

3.3 TILs και καρκίνος του παχέος εντέρου (CRC)

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Colorectal cancer-CRC) είναι ο τρίτος πιο συχνός καρκίνος παγκοσμίως μετά τον καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού, ενώ βρίσκεται και στην 2^η θέση ως ο καρκίνος με το δεύτερο υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Ο CRC σταδιοποιείται συνήθως χρησιμοποιώντας το σύστημα ταξινόμησης και σταδιοποίησης TNM, ωστόσο ταξινομείται και με βάση τις γενετικές αλλοιώσεις που υπάρχουν στον όγκο, όπως μεταλλάξεις στα ένζυμα APC, KRAS, BRAF, p53 και επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων (mismatch repair-MMR). Το ήπαρ είναι το πιο κοινό σημείο μετάστασης σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου λόγω της ανατομικής του κατάστασης καθώς το μεγαλύτερο μέρος της εντερικής μεσεντέριας παροχέτευσης εξαπλώνεται στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας και περίπου 15 έως 25% των ασθενών με CRC εμφανίζουν απομακρυσμένη μετάσταση στο ήπαρ κατά τη στιγμή της αρχικής διάγνωσης και ένα 18-25% εντός 5 ετών από την πρώτη διάγνωση. Η θεραπευτική ηπατεκτομή μπορεί να βοηθήσει στη θεραπεία της μετάστασης του CRC στο ήπαρ και φαίνεται να οδηγεί και σε καλύτερη πρόγνωση από άλλες θεραπείες [Kow A. (2019)].

Γενικότερα, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες έρευνες σχετικά με την ανοσιακή απόκριση και την πρόγνωση στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Οι CRC συνήθως



Εικόνα 3: Συσχέτιση επιβίωσης σε σχέση με τη συγκέντρωση TILs στις διάφορες περιοχές του όγκου. Galon et al. Science (2006)

δηθούνται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (TILs) κατά μήκος του διηθητικού ορίου (IM), ωστόσο παρατηρούνται και στο κέντρο του όγκου (CT). Με χρώσεις ανοσοϊστοχημείας έχουν μετρηθεί τα TILs και οι υποτύποι τους CD3, CD8 και τα κύτταρα μνήμης CD45RO. Στην εικόνα 3, είναι εμφανής η συσχέτιση της επιβίωσης στον CRC με τη συγκέντρωση των υποτύπων T λεμφοκυττάρων (CD3+, CD8+, CD45RO+) και του Granzyme B.

Ενώ, έχουν παρατηρηθεί υψηλότερες πυκνότητες αυτών των κυττάρων, τόσο στο IM όσο και στο CT, των όγκων ασθενών χωρίς υποτροπή της νόσου σε σχέση με ασθενείς που εμφάνισαν υποτροπή. Το μόριο CD45RO είναι η ισομορφή των 180 kDa του κοινού αντιγόνου λευκοκυττάρων CD45 (Leucocyte Common Antigen-LCA). Η έκφραση του CD45RO του CD45 σχετίζεται με λειτουργική διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων και εκφράζεται από ένα υποσύνολο CD4+ T λεμφοκυττάρων μνήμης και ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, ενώ εκφράζεται ασθενώς σε μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα. Ακόμα, το CD45RO είναι ο καταλληλότερος μεμονωμένος δείκτης για T-λεμφοκύτταρα μνήμης και αντιπροσωπεύει με ακρίβεια την κατάσταση ενεργοποίησης των T κυττάρων. Τα CD45RO+ T κύτταρα συχνά αυξάνονται σε συμπαγείς όγκους και διάφορες μελέτες έχουν συσχετίσει τα CD45RO+ T κύτταρα με την πρόγνωση του καρκίνου, αλλά τα αποτελέσματά τους ήταν αμφιλεγόμενα. Επομένως, απαιτείται μια εις βάθος αξιολόγηση και διερεύνηση της δυνατότητας αυτών των κυττάρων να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες πρόγνωσης διαφόρων καρκίνων όπως του CRC. Τα αυξημένα επίπεδα διεισδυτικών CD45RO+ βρέθηκαν στον CRC που δεν έδειξε σημάδια πρώιμης μεταστατικής εισβολής και τα CD3+ TILs φαίνεται να διατηρούν την προγνωστική αξία μόνο σε ασθενείς με «node-negative» CRC, δηλαδή όπου δεν έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες και επομένως βρίσκονται σε πρωιμότερο στάδιο (Στάδιο II). Ουσιαστικά, παρότι η αντικαρκινική δράση της ανοσολογικής διήθησης είναι περισσότερο εμφανής στα πρώιμα στάδια του καρκίνου του παχέος εντέρου, μόνο οι ισχυρότερες ανοσολογικές αποκρίσεις έχουν επίδραση

στην πρόγνωση του σταδίου III [Jylardistos P. (2019), Bethmann D. (2017), Galon J. et al. (2006)].

Ακόμα, η μελέτη του Markowski A.R. (2022) σε 195 ασθενείς σχετικά με την πυκνότητα των ανοσοποιητικών κυττάρων που διεισδύουν στον όγκο, έδειξε ότι στο IM την υψηλότερη πυκνότητα είχαν τα κύτταρα CD8+, ενώ τη χαμηλότερη πυκνότητα είχαν τα κύτταρα CD4 στο CT, αν και άλλες έρευνες έχουν δείξει διαφορετικά αποτελέσματα. Όσον αφορά τα CD8 κύτταρα, φάνηκε πως υψηλές πυκνότητες CD8+ TILs του όγκου σχετίζονται με βελτιωμένη DFS και OS στον CRC και έχουν ευνοϊκή προγνωστική σημασία. Επίσης, παρουσία αυξημένων διηθήσεων λεμφοκυττάρων CD3+, CD8+ στα όρια του όγκου συσχετίστηκε με τα στάδια I-II του TNM για τον CRC και την απουσία μεταστάσεων στους λεμφαδένες, ενώ η χαμηλότερη πυκνότητα CD8 παρατηρήθηκε στο διηθητικό μέτωπο σε ασθενείς με CRC με απομακρυσμένες μεταστάσεις σε σχέση με ασθενείς χωρίς μεταστάσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε αλλαγή του φαινοτύπου των καρκινικών κυττάρων με την πάροδο του χρόνου, πριν αρχίσουν να δίνουν μεταστάσεις. Από την άλλη, τα CD3+ και CD4+ είχαν υψηλότερη πυκνότητα στο διηθητικό μέτωπο σε λιγότερο προχωρημένους καρκίνους, δηλαδή σε χαμηλότερα στάδια TNM (TNM-I έναντι TNM-II και TNM-I έναντι TNM-III), ενώ εμφάνισαν πολύ μικρότερες πυκνότητες (CD3, CD4) σε CRC με μεγαλύτερο βάθος εισβολής όγκου. Μια άλλη έρευνα του Barbosa A. et al., υποδεικνύει ότι μόνο η παρουσία υψηλών διηθήσεων CD3+, CD8+ και FOXP3+ T λεμφοκυττάρων στα διηθητικά όρια του όγκου σχετίζεται με καλούς προγνωστικούς δείκτες και δυνητικά περιορίζει την επιθετικότητα και την εξάπλωση του CRC, αν και δεν φάνηκε οποιαδήποτε συσχέτιση μεταξύ ενδοκαρκινικών TILs ή TILs στο διηθητικό όριο του όγκου και της συνολικής επιβίωσης, αν και σε άλλες έρευνες έχει υπάρξει συσχέτιση [Markowski A. (2022), Barbosa A. et al. (2021)].

Επιπρόσθετα, αξίζει να αναφερθεί η μελέτη του Jylardistos P. (2019) που είχε ως σκοπό τη μελέτη του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος σε 116 ασθενείς (μέσης ηλικίας 70 ετών) με CRC, την επίδραση της ανοσιακής απόκρισης στην εξέλιξη της νόσου και την ενδεχόμενη προγνωστική της αξία. Πιο συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η παρουσία τριτοταγών λεμφικών οργάνων (Tertiary lymphoid organs-TLOs), που έχουν παρόμοια δομή και οργάνωση με τους λεμφαδένες και άλλα δευτερογενή λεμφικά όργανα και επάγονται μετά τη γέννηση σε μη λεμφικούς ιστούς όταν αυτοί επηρεάζονται από χρόνιες λοιμώξεις, αυτοάνοσα νοσήματα και σε έδαφος καρκινικών ιστών, και η παρουσία TILs (CD3+, CD8+, CD45RO+) καθώς και η μεταξύ τους

συσχέτιση στο CT και IM. Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε μια σαφή συσχέτιση της παρουσίας TLOs και της συγκέντρωσης των υποτύπων CD3+, CD8+ και CD45RO+ όσον αφορά τη συνολική επιβίωση με ιδιαίτερα ευνοϊκή προγνωστική αξία για τα πρώιμα στάδια της νόσου (Στάδιο II), καθώς και μια καλύτερη προγνωστική δυνατότητα, σε σχέση με την ταξινόμηση AJCC TNM, για τη συνολική επιβίωση. Πιο αναλυτικά, η ξεχωριστή παρουσία CD3+ TILs, CD8+ TILs, CD45RO+ TILs, κατέδειξε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη OS σε σχέση με την απουσία τους με p-value:0,025/0,003/0,002 αντίστοιχα [Jylardistos P. (2019)].

Στη συνέχεια, θεωρήθηκε σκόπιμο να αναζητηθεί η σχέση μεταξύ των TILs και της θεραπευτικής χειρουργικής επέμβασης αλλά και της χημειοθεραπείας σε ασθενείς με CRC. Σε μία έρευνα του Huh J. et al., στόχος ήταν η αξιολόγηση της προγνωστικής σημασίας των TILs σε 546 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε θεραπευτική χειρουργική επέμβαση για πρωτοπαθείς μη μεταστατικούς καρκίνους του παχέος εντέρου. Κατά την περίοδο παρακολούθησης των 54 μηνών, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ομάδα με χαμηλά επίπεδα TILs συσχετίστηκε σημαντικά με κακώς διαφοροποιημένους (υψηλού βαθμού) CRC και παρουσία περινευρικής διήθησης (Perineural invasion-PNI), όπου είναι η παρουσία εισβολής των νεοπλασματικών κυττάρων στα νεύρα και είναι μια οδός μεταστατικής εξάπλωσης, που αναδύεται ως σημαντικό παθολογικό χαρακτηριστικό πολλών κακοηθειών, όπως του καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού. Επιπλέον, φάνηκε πως η ομάδα ασθενών, με CRC σταδίου III, με χαμηλά επίπεδα TILs είχε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά OS 5 ετών και DFS σε σχέση με την ομάδα ασθενών με υψηλά επίπεδα TILs ($p=,005$ και $p=,03$, αντίστοιχα), ενώ για ασθενείς με καρκίνο σταδίου I και II, τα ποσοστά επιβίωσης δεν διέφεραν μεταξύ των 2 ομάδων. Ακόμα, τα ποσοστά 5ετούς OS και 5ετούς DFS ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά μεταξύ των ομάδων ασθενών με καρκίνο του ορθού, με υψηλά και χαμηλά επίπεδα TILs ($P=,003$ και $P=,01$, αντίστοιχα). Έτσι, μια φλεγμονώδης κυτταρική αντίδραση στο διηθητικό όριο του όγκου θεωρήθηκε χρήσιμος προγνωστικός παράγοντας επιβίωσης μετά από χειρουργική επέμβαση καρκίνου του παχέος εντέρου, ιδιαίτερα για ασθενείς με νόσο σταδίου III ή καρκίνο του ορθού [Huh J. et al. (2012)].

Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί, η έρευνα του Morris M. et al., όπου οι ερευνητές σε μια κοόρτη 1156 ασθενών με CRC σταδίου III, έδειξαν ότι η παρουσία και ο βαθμός TILs είχε προγνωστική αξία για μια θετική απόκριση στην επικουρική μετεγχειρητική χημειοθεραπεία με 5-φθοριουρακίλη. Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα οι Prall

F. et al., διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με CRC σταδίου III με υψηλές πυκνότητες CD8+ TILs κυττάρων εμφάνισαν εξαιρετική επιβίωση όταν έλαβαν θεραπεία με 5-Φθοριουρακίλη (5-Fluorouracil, 5-FU) σε σύγκριση με εκείνους με χαμηλή πυκνότητα και πρότειναν η πυκνότητα των CD8+ να λειτουργήσει ως προγνωστικός παράγοντας για όφελος από τη χημειοθεραπεία με 5-FU [Morris M. et al. (2008), Prall F. et al. (2004)].

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί η μελέτη των Wang et al, που έγινε σε 108 ασθενείς με CRC με μετάσταση στο ήπαρ και οι οποίοι υποβλήθηκαν σε θεραπευτική ηπατεκτομή. Η μελέτη στόχευσε στη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ του βαθμού διήθησης TILs και της πρόγνωσης στους ασθενείς και να εξετάσει τις επιδράσεις της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας στη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε 2 ομάδες (υψηλών και χαμηλών επιπέδων TILs) και επιπλέον χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες ως εξής:

- i) Ασθενείς που δεν έλαβαν προεγχειρητική χημειοθεραπεία
- ii) Ασθενείς που έλαβαν βραχυπρόθεσμη προεγχειρητική χημειοθεραπεία για <6 μήνες
- iii) Ασθενείς που έλαβαν μακροχρόνια προεγχειρητική χημειοθεραπεία για ≥ 6 μήνες

Ο βαθμός διήθησης CD8+TIL σε μεταστάσεις ήπατος CRC συσχετίστηκε με την πρόγνωση (RFS&OS) σε ασθενείς ομάδων I&II. Αντίθετα, σε ασθενείς που έλαβαν μακροχρόνια χημειοθεραπεία πριν από τη χειρουργική επέμβαση (ομάδα III), ο βαθμός διήθησης TIL δεν συσχετίστηκε με την πρόγνωση, καθώς οι αντικαρκινικές επιδράσεις των TIL μπορεί να μειωθούν ως συνέπεια της παρατεταμένης χημειοθεραπείας. Αυτό δεν προκαλεί έκπληξη καθώς και σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι η μακροχρόνια χημειοθεραπεία μπορεί να αλλάξει την τοπική ανοσία στις ηπατικές μεταστάσεις και να μειώσει την προγνωστική αξία της πυκνότητας των TILs, πιθανόν μέσω μείωσης του απόλυτου αριθμού λεμφοκυττάρων και αποτρέποντας την επαγωγή λεμφοκυττάρων σε δευτερογενή λεμφικά όργανα, με αποτέλεσμα αποδυνάμωση της ανοσοαπόκρισης των T κυττάρων. Σε μια μελέτη από τον Wu et al. σε ένα πειραματικό μοντέλο καρκίνου σε ποντικούς φάνηκε ότι η βραχυπρόθεσμη χορήγηση φθοριουρακίλης μπορεί να αυξήσει τον πολλαπλασιασμό και την κυτταροτοξικότητα των CD8+ T κυττάρων, ενώ η επαναλαμβανόμενη χορήγηση προκαλεί μείωση στον πολλαπλασιασμό και την κυτταροτοξικότητα των CD8+ T κυττάρων και φαίνεται να μειώνει τον απόλυτο αριθμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού. Ωστόσο, ο απόλυτος

αριθμός των κυττάρων του ανοσοποιητικού μπορεί να ανακάμψει σχετικά γρήγορα μετά τη διακοπή της χημειοθεραπείας. Βέβαια, η αντικαρκινική ανοσολογική λειτουργία των ανοσοκυττάρων παραμένει μειωμένη για παρατεταμένη περίοδο μετά την επαναλαμβανόμενη χημειοθεραπεία. Επομένως, εικάζεται ότι ο αριθμός των T κυττάρων στο τοπικό μικροπεριβάλλον του όγκου, μπορεί να μην σχετίζεται πάντα με την πρόγνωση σε περιπτώσεις που αντιμετωπίζονται με μακροχρόνια χημειοθεραπεία, καθώς η λειτουργία των T κυττάρων μειώνεται μετά από επαναλαμβανόμενη χημειοθεραπεία, ενώ μπορεί να εμπλέκονται και μηχανισμοί ανοσολογικής διαφυγής. Πιο αναλυτικά, ο βαθμός διήθησης CD8+TIL στις ηπατικές μεταστάσεις από καρκίνο του παχέος εντέρου ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα υποτροπής σε σύγκριση με την ομάδα χωρίς υποτροπές μετά την ηπατεκτομή και η ομάδα υψηλού CD8+TIL συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (Carcinoembryonic Antigen-CEA) ≤ 5 ng/ml, αλλά όχι με άλλα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και παρουσίασε σημαντικά καλύτερη RFS και OS από την ομάδα χαμηλής CD8+ TIL αφού ο μέσος χρόνος επιβίωσης (Median Survival Time-MST) των ασθενών με υψηλή CD8+TIL βρέθηκε να είναι 24,8 μήνες ενώ των ασθενών με χαμηλή CD8+TIL 11,5 μήνες, υποδεικνύοντας ότι η πυκνότητα των CD8+TILs μπορεί να επηρεάσει έντονα το θεραπευτικό αποτέλεσμα και την πρόγνωση της ηπατικής μετάστασης. Από την άλλη, η ομάδα υψηλού CD3+TIL συσχετίστηκε σημαντικά με ορθοκολικό καρκίνο της αριστερής πλευράς και CEA ≤ 5 ng/ml (P=0,006) αλλά όχι με άλλα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, ενώ τα RFS και OS των ομάδων υψηλής και χαμηλής CD3+TIL δεν διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό και έτσι τα CD3+TIL έδειξαν κακή προγνωστική ικανότητα [Wang E. et al. (2021)].

3.4 TILs και καρκίνος του Προστάτη (PCa)

Ο καρκίνος του προστάτη (PCa) αποτελεί τον 2^ο πιο συχνό καρκίνο στους άνδρες παγκοσμίως (μετά τον καρκίνο του πνεύμονα) με ποσοστό 15,1% και είναι ένας από τους πιο θανατηφόρους. Το τρέχον πρότυπο περίθαλψης είναι αρκετά αποτελεσματικό στη θεραπεία ασθενών χαμηλού έως ενδιάμεσου κινδύνου, αλλά η διαχείριση ασθενών υψηλού κινδύνου παραμένει πρόκληση, καθώς η πλειοψηφία θα παρουσιάσει υποτροπή της νόσου και απομακρυσμένες μεταστάσεις. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με εντοπισμένο PCa αντιμετωπίζονται κυρίως με χειρουργική επέμβαση ή ακτινοθεραπεία, ωστόσο έως και 30-40% θα αποτύχουν τελικά και η νόσος θα εκδηλωθεί μέσω βιοχημικής υποτροπής (Biochemical

Recurrence-BCR). Βιοχημική υποτροπή είναι η αύξηση της τιμής του ειδικού προστατικού αντιγόνου (Prostate-Specific Antigen-PSA) σε επίπεδα προκαθορισμένα, αναλόγως με την αρχική θεραπεία (χειρουργική ή ακτινοβολία), υποδηλώνοντας ουσιαστικά το πρώτο βήμα πιθανής υποτροπής της νόσου. Με βάση τον ορισμό της Ευρωπαϊκής και της Αμερικανικής Ουρολογικής Εταιρείας, η βιοχημική υποτροπή ορίζεται ως η κατάσταση στην οποία το PSA του ασθενούς φτάνει ή ξεπερνάει το 0.2 ng/ml σε τουλάχιστον 2 μετρήσεις. Από αυτούς τους ασθενείς με BCR που λαμβάνουν θεραπεία με ορμονικές θεραπείες κυρίως Θεραπεία στέρησης ανδρογόνων (Androgen Deprivation Therapy-ADT) που έχει ως στόχο να μειώσει την παραγωγή ανδρογόνων όπως της τεστοστερόνης, περίπου το 10-20% θα αναπτύξουν καρκίνο ανθεκτικό στον ευνουχισμό εντός 5 ετών, με τον μεταστατικό, ανθεκτικό στον ευνουχισμό καρκίνο του προστάτη (Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer-mCRPC) να είναι ένα εξαιρετικά επιθετικό στάδιο της νόσου και να έχει πρόγνωση επιβίωσης 9-13 μηνών, τονίζοντας έτσι την ανάγκη ανάπτυξης νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Η καλύτερη κατανόηση των TILs στους όγκους PCa και το μικροπεριβάλλον τους μπορεί να βελτιώσει την ικανότητά μας να στοχεύουμε ανοσολογικά τον PCa και στην αξιοποίησή τους ως προγνωστικούς βιοδείκτες του PCa [Zhang Y. et al. (2022), Younger S. et al. (2019)].

Το 2014 μία έρευνα από τη Ness N. et al., αξιολόγησε την προγνωστική επίδραση της πυκνότητας των λεμφοκυττάρων CD3+, CD8+ και CD20+, τόσο στις επιθηλιακές όσο και στις στρωματικές περιοχές όγκου PCa, σε 535 ασθενείς (52 ασθενείς με Gleason score >7) που υποβλήθηκαν σε ριζική προστατεκτομή ως αρχική θεραπεία. Τα αποτελέσματα της μονομεταβλητής ανάλυσης έδειξαν ότι μια υψηλή πυκνότητα CD3+ και CD8+ λεμφοκυττάρων στις επιθηλιακές περιοχές του όγκου συσχετίστηκε με σημαντικά μικρότερη BFFS. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η υψηλή πυκνότητα των CD8+ λεμφοκυττάρων, ιδιαίτερα στις επιθηλιακές περιοχές του όγκου, ήταν ένας ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση ελεύθερης βιοχημικής υποτροπής (Biochemical Failure-Free Survival-BFFS). Όσον αφορά, τα CD20 λεμφοκύτταρα φάνηκε να μην έχουν καμία προγνωστική επίδραση στην έκβαση της νόσου των ασθενών της συγκεκριμένης κοορτής ασθενών [Ness N. et al. (2014)].

Ωστόσο, καθώς ο προγνωστικός ρόλος των CD8+ στον PCa παραμένει αμφιλεγόμενος και τέτοιες πληροφορίες μπορεί να είναι χρήσιμες για μελλοντικό σχεδιασμό κλινικών δοκιμών ανοσοθεραπείας και επιλογή θεραπείας. Η πρόσφατη

μελέτη του Yang Y. et al., που στόχευε στην αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας των CD8+ TILs σε 230 ασθενείς (150 ασθενείς με Gleason score >7), με εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη που έχουν υποβληθεί σε ριζική προστατεκτομή (radical prostatectomy-RP), συγκρίνοντας τα κλινικά αποτελέσματα στις ομάδες με υψηλή έναντι χαμηλής πυκνότητας CD8+ TILs, έδειξε ότι η υψηλή πυκνότητα CD8+ TIL συσχετίστηκε με βελτιωμένη 5ετή OS και ειδική επιβίωση για τον PCa σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλή πυκνότητα CD8+ TIL. Επιπλέον, υπήρχε μια τάση για υψηλότερη 5ετή ελεύθερη βιοχημικής υποτροπής επιβίωση (5-year bRFS) και MFS (Metastasis free survival) στην κοόρτη των ασθενών με υψηλή πυκνότητα CD8+ TIL, αν και η διαφορά δεν έφτασε σε στατιστική σημαντικότητα. Συνολικά, φαίνεται ότι η υψηλή ενδοογκική διήθηση CD8+ T-κυττάρων στο δείγμα RP σχετίζεται ανεξάρτητα με βελτιωμένη επιβίωση μετά από RP στην κοόρτη PCa υψηλού κινδύνου και σημειώνεται ότι ανοσοτροποποίηση προ-RP που προάγει την ενδοκαρκινική διήθηση CD8+ κυτταροτοξικών T-κυττάρων μπορεί να είναι ευεργετική για αυτόν τον πληθυσμό.

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα με την προηγούμενη μελέτη της Ness N. et al. μπορούν να εξηγηθούν από τους παρακάτω λόγους:

- ❖ Μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών υψηλού κινδύνου συμπεριλήφθηκε στη μελέτη του Yang Y. et al (150 έναντι 52 ασθενών)
- ❖ Αξιολογήθηκαν περισσότεροι πυρήνες όγκου ανά ασθενή (6 έναντι 2) για να ληφθεί υπόψη η ετερογένεια του όγκου
- ❖ Προσαρμόστηκε ένα αυτοματοποιημένο σύστημα βαθμολόγησης βασισμένο σε υπολογιστή για να αποφευχθούν μεταβλητές που εξαρτώνται από τον χειριστή

Η μελέτη Yang Y. et al (2021) ήταν η πρώτη μελέτη που κατέδειξε ότι η υψηλή πυκνότητα CD8+ TIL μετά από RP σχετίζεται ανεξάρτητα με βελτιωμένο OS σε άνδρες με εντοπισμένο υψηλού κινδύνου PCa. Νεοεπικουρικοί ανοσοθεραπευτικοί χειρισμοί για την προώθηση της εισροής CD8+ T κυττάρων στον PCa μπορεί να προσφέρουν ένα όφελος επιβίωσης στους ασθενείς και η χαμηλή πυκνότητα CD8+ TIL τη στιγμή της RP μπορεί επίσης να προσδιορίσει μια ομάδα ασθενών με υψηλότερο κίνδυνο θνησιμότητας που μπορεί να ωφεληθούν από την επιθετική επικουρική θεραπεία [Yang Y. et al. (2021)].

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα συμφωνούν με την έρευνα του Vicier et al., σε ασθενείς μετά από RP, που έδειξε ότι η υψηλή πυκνότητα CD8+ TIL συσχετίστηκε με βελτιωμένα BRFS και MFS σε ασθενείς με PCa. Ακόμη, κατέληξαν ότι από μόνη

της η υψηλή πυκνότητα PD-L1 και χαμηλή πυκνότητα CD8⁺ αποτελούν φτωχοί προγνωστικοί δείκτες και είναι πιο επιδραστικοί ως μέρος της βαθμολογίας κινδύνου για βιοχημική και μεταστατική υποτροπή [Vicier C. et al. (2019)].

Στη συνέχεια, ερευνήθηκε η σχέση των TILs με την ADT στην έκβαση των ασθενών με PCa. Η ADT είναι μέρος του προτύπου φροντίδας για προχωρημένο και μεταστατικό καρκίνο του προστάτη και έχει σχεδιαστεί είτε για να εμποδίζει την παραγωγή τεστοστερόνης είτε να την εμποδίζει άμεσα να δράσει στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, με σκοπό τον θάνατο ή τη διακοπή ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, σε πολλούς άνδρες, ορισμένα κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να αναπτύσσονται στο περιβάλλον χαμηλής τεστοστερόνης που δημιουργείται από την ορμονοθεραπεία και έτσι καθώς συνεχίζουν να αναπτύσσονται, οι ορμονικές θεραπείες έχουν όλο και μικρότερη επίδραση στην ανάπτυξη του όγκου, οδηγώντας στον ανθεκτικό στον ευνουχισμό καρκίνο του προστάτη (CRPC) [Prostate Cancer Foundation].

Στο πλαίσιο αυτό, ο Sorrentino C. et al. διερεύνησε την αξία της νεοεπικουρικής ορμονοθεραπείας (NHT) πριν από τη RP ως μέσο περιορισμού του PCa, της ενίσχυσης κάποιων υποπληθυσμών TILs και τη σχέσης της με την έκβαση των ασθενών. Συνολικά, συμπεριελήφθησαν 126 ασθενείς εκ των οποίων οι 76 είχαν λάβει NHT. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η NHT ενίσχυσε την έκφραση της IL-7 στο στρώμα και της CXCL10 (C-X-C motif chemokine ligand 10) στο αδενικό επιθήλιο του φυσιολογικού ιστού του προστάτη και ανέστειλε την εξάντληση των λεμφοκυττάρων CD8⁺ που εμφανίζεται στον PCa ενώ και ο μέσος αριθμός κυττάρων CD8⁺ αυξήθηκε σημαντικά στον νεοπλασματικό ιστό μετά από NHT. Επίσης, η NHT προκάλεσε την παραγωγή CCL17 (C-C Motif Chemokine Ligand 17) από μονοκύτταρα/μακροφάγα στον προστάτη και αύξησε τον αριθμό των FOXP3⁺/CD25⁺ Treg. Ακόμα, τα διηθητικά CD4⁺ T κύτταρα αυξήθηκαν δραματικά τόσο σε φυσιολογικούς (~6 φορές) όσο και σε νεοπλασματικούς (~4 φορές) ιστούς του προστάτη σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία έναντι εκείνων που δεν έλαβαν θεραπεία. Έτσι η αυξημένη παραγωγή IL-7 συνοδεύτηκε από αύξηση στον πληθυσμό των ενδοπροστατικών T-κυττάρων που αποτελείται από κυτταροτοξικά και ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα. Γενικότερα, οι ασθενείς με υψηλότερα ποσοστά ενδοογκικών CD8⁺ εμφάνισαν σημαντική βελτίωση της DFS σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλότερα ποσοστά, ενώ αντίθετα, οι ασθενείς με υψηλά έναντι χαμηλών ποσοστών Treg εμφάνισαν μειωμένη DFS. Η διερεύνηση του λόγου CD8⁺/FOXP3⁺ που φαίνεται να έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στην εξέλιξη

της νόσου, από ό,τι μόνο ο αριθμός τους ξεχωριστά, αποκάλυψε ότι η ομάδα με υψηλή αναλογία κυττάρων CD8+/FOXP3+ είχε σημαντική βελτίωση της επιβίωσης χωρίς νόσο (DFS) σε σύγκριση με την ομάδα χαμηλής αναλογίας. Δύο ασθενείς στην πρώτη ομάδα εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή (η πρώτη εμφανίστηκε 12 μήνες μετά την επέμβαση) σε σύγκριση με 13 στη δεύτερη ομάδα (η πρώτη εμφανίστηκε 3 μήνες μετά την επέμβαση). Το τεστ χ^2 έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P < 0,01$) μεταξύ NHT και της υψηλής ενδοογκικής συχνότητας και των CD8+ αλλά και των Treg και την απουσία οποιασδήποτε συσχέτισης μεταξύ της NHT και της υψηλής ή χαμηλής αναλογίας CD8+/FOXP3+ εντός του όγκου, που είναι ενδεικτική καλής πρόγνωσης [Sorrentino C. et al. (2011)].

Τέλος, διερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των TILs και της έκβασης ασθενών που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία «διάσωσης» (SRT) μετά από RP λόγω υποτροπής της νόσου. Η μελέτη του Nardone V. et al (2016), αναζήτησε τη συσχέτιση της έκβασης 22 ασθενών με τοπικά προχωρημένο καρκίνο του προστάτη που υποβλήθηκαν σε SRT μετά από υποτροπή αφού είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση RP με τη διήθηση διαφορετικών υποπληθυσμών TILs. Η διήθηση των TILs αξιολογήθηκε με ανοσοϊστοχημεία στο TS και TN για τους υποπληθυσμούς CD45, CD3, CD4, CD8, CCR7, FOXP3, ή PD-1 θετικών κυττάρων σε δείγματα όγκων που λήφθηκαν κατά τους χρόνους της διάγνωσης (d) και της υποτροπής (R). Αυτές οι μεταβλητές συσχετίστηκαν έπειτα με την επιβίωση χωρίς βιοχημική εξέλιξη (bPFS), την PFS μετά την ακτινοθεραπεία και το OS των ασθενών. Συνολικά, βρέθηκαν ουσιαστικές αλλαγές στο ποσοστό των υποομάδων TILs μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης βιοψίας με προοδευτική αύξηση στην παρουσία CD4+, CCR7+, FOXP3+ και PD-1+ κυττάρων. Ακόμα φάνηκε ότι, τα υψηλότερα σκορ CD8 στρώματος και τα χαμηλότερα σκορ PD-1 TILs σε δείγματα υποτροπής συσχετίστηκαν με μακρότερο bPFS (biochemical progression free survival). Η bPFS αντιπροσωπεύει τον χρόνο μεταξύ των δύο διαδοχικών βιοψιών που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάγνωση και κατά τον χρόνο της βιοχημικής υποτροπής. Από την άλλη υψηλότερα σκορ στρωματικών CD8 και ενδοογκικών CCR7 TILs και χαμηλότερα σκορ στρωματικών CD45 και στρωματικών FOXP3 TILs σε δείγματα υποτροπής συσχετίστηκαν με παρατεταμένο PFS και OS. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον των πρωτοπαθών όγκων συσχετίζεται αυστηρά με την έκβαση του ασθενούς και παρέχει το σκεπτικό για το σχεδιασμό προοπτικών δοκιμών για τη διερεύνηση του ρόλου της ανοσολογικής θεραπείας σε ασθενείς με PCa [Nardone V. et al. (2016)].

3.5 TILs και καρκίνος στομάχου (GC)

Ο καρκίνος του στομάχου (Γαστρικός Καρκίνος, Gastric Cancer-GC), είναι η πέμπτη πιο συχνή κακοήθεια και η τέταρτη κύρια αιτία θνησιμότητας που σχετίζεται με τον καρκίνο παγκοσμίως. Ιστολογικά οι κακοήθεις όγκοι του στομάχου διακρίνονται σε:

- I. Αδενοκαρκίνωμα
- II. Non-Hodgkin λέμφωμα
- III. Σαρκώματα και άλλους στρωματικούς όγκους του πεπτικού (Gastrointestinal Stroma Tumors, GISTs)
- IV. Νευροενδοκρινικούς όγκους (NETs) και καρκινοειδή
- V. Σπάνιους ιστολογικούς τύπους, όπως καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, αδενοακάνθωμα ή μελάνωμα

Ο συχνότερος ιστολογικός τύπος καρκίνου του στομάχου είναι το αδενοκαρκίνωμα, με ποσοστό που φτάνει έως το 90-95%. Αυτοί οι καρκίνοι προέρχονται από τα αδενικά κύτταρα της επένδυσης του στομάχου (τον βλεννογόνο). Η θεραπευτική προσέγγιση είναι η χειρουργική θεραπεία, που αποσκοπεί στη ριζική εκτομή, τόσο της μακροσκοπικής νόσου, όσο και των μικροσκοπικών εστιών της και πολλές φορές συνδυάζεται με χημειοθεραπεία. Ωστόσο, λιγότερο από το 30% των ασθενών είναι επιλέξιμοι για θεραπευτική εκτομή επειδή η πλειονότητα των περιπτώσεων GC εμφανίζεται σε προχωρημένο στάδιο λόγω καθυστερημένης έναρξης και μη ειδικών συμπτωμάτων. Η δυνατότητα έγκαιρης διάγνωσης της νόσου σε πρωιμότερο στάδιο και πρόγνωσης έκβασης της εκάστοτε θεραπείας θα προσφέρει ουσιαστική βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών αυτών. Στατιστικά, το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης για τα άτομα με καρκίνο του στομάχου είναι 32%, γεγονός που αντικατοπτρίζει το ότι το 62% των ατόμων με GC διαγιγνώσκονται αφού ο καρκίνος έχει ήδη εξαπλωθεί. Εάν ο καρκίνος διαγνωστεί και αντιμετωπιστεί πριν εξαπλωθεί εκτός του στομάχου, το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης είναι 70%, αν έχει εξαπλωθεί στους περιβάλλοντες ιστούς ή όργανα και/ή στους περιφερειακούς λεμφαδένες, είναι 32%, ενώ εάν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένο σημείο του σώματος, είναι μόνο 6% [Yu W. et al. (2022), Cancer.Net (2022)].

Η συσχέτιση των TILs με την OS και γενικότερα την έκβαση ασθενών με GC έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες και έγινε ξεκάθαρη σε 2 πρόσφατες μετα-αναλύσεις. Στην πρώτη μελέτη των Tian C. et al., σκοπός ήταν να αξιολογηθούν οι

συσχετίσεις μεταξύ της πυκνότητας TILs και της πρόγνωσης και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών ασθενών με GC. Συνολικά συμπεριελήφθησαν 9 μελέτες με σύνολο 2835 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα. Γενικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ομάδα με υψηλά επίπεδα TILs είχε καλύτερη OS σε σύγκριση με την ομάδα μειωμένων TILs. Τα υψηλά επίπεδα TILs συσχετίστηκαν σημαντικά με χαμηλότερο βάθος εισβολής (T3-T4 έναντι T1-T2), λιγότερη συμμετοχή των λεμφαδένων (παρουσία έναντι απουσίας) και προγενέστερο στάδιο TNM (III-IV έναντι I-II). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η μεθοδολογία για την αξιολόγηση των TILs και η τιμή cut-off διέφεραν σε διαφορετικές μελέτες, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μετα-ανάλυσης. Παρόμοια αποτελέσματα με την προηγούμενη έρευνα έδειξε και η μετα-ανάλυση των Jung S.L et al., που είχε στόχο να εξετάσει τη συσχέτιση μεταξύ των ενδοκαρκινικών TILs και της επιβίωσης ασθενών με GC και πιο συγκεκριμένα με τη συνολική επιβίωση (OS) και την επιβίωση ελεύθερης υποτροπής. Συνολικά αναλύθηκαν 22 μελέτες με συνολικό μέγεθος δείγματος 2941. Η υψηλή έκφραση των κυττάρων CD3+ TILs συσχετίστηκε με ευνοϊκό OCS και η υψηλή έκφραση των CD4+ και CD8+ TILs συσχετίστηκε με σημαντικά αυξημένο OCS. Αντίθετα, η υψηλή έκφραση FOXP3+ συσχετίστηκε με μειωμένο OCS. Ακόμα, η ομάδα με υψηλή έκφραση FOXP3+ Treg συσχετίστηκε αρνητικά με το OCRFS. Γενικότερα, σε αυτή τη μετα-ανάλυση, η υψηλή έκφραση των CD8+ λεμφοκυττάρων ήταν ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας βελτιωμένης επιβίωσης σε ασθενείς GC. Συμπερασματικά, φάνηκε πως η πυκνότητα των TILs παρουσιάζεται να είναι ένας αξιόπιστος βιοδείκτης για την πρόβλεψη των κλινικών αποτελεσμάτων ασθενών με γαστρικό καρκίνο [Tian C. et al. (2021), Lee J. et al. (2018)].

Το TME είναι το εσωτερικό περιβάλλον εξέλιξης του κακοήθους όγκου, όπου η αντικαρκινική ανοσοαπόκριση του ξενιστή και η καταστροφή του φυσιολογικού ιστού συμβαίνουν στο TME. Έτσι, το TME αναδύεται ως κρίσιμος παράγοντας για την κατανόηση της σχέσης μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του όγκου. Τα TILs είναι ένα κρίσιμο συστατικό του TME και αντικατοπτρίζουν την αντικαρκινική ανοσοαπόκριση του ξενιστή. Ο σκοπός της μελέτης, του Zhang D. et al., ήταν να διερευνήσει τη μεθοδολογία για την αξιολόγηση των TILs και να αξιολογήσει την προγνωστική τους αξία στον GC σε ομάδες TIL^{HIGH} και TIL^{LOW}, σε 1.033 περιπτώσεις ασθενών με γαστρεκτομή και διάγνωση για πρωτοπαθές γαστρικό αδενοκαρκίνωμα όπου δεν είχαν λάβει νεοεπικουρική χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Το κύριο

εύρημα ήταν ότι η ομάδα με TIL^{HIGH} συσχετίστηκε με χαμηλό ποσοστό μετάστασης καρκίνου, καλύτερη OS και θετική πρόγνωση. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα με υψηλά επίπεδα TILs φάνηκε ότι τα TIL^{HIGH} ήταν ένας θετικός σημαντικός προγνωστικός παράγοντας της OS στην ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier ($P < 0,001$) και στην πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης Cox ($P < 0,001$). Όσον αφορά τη σχέση μεταξύ των TILs και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων φάνηκε ότι το TIL^{HIGH} συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά ($P < 0,001$) με το μικρό μέγεθος όγκου, τον ιστολογικό βαθμό καλής διαφοροποίησης, αρνητική μετάσταση LN, αρνητική διήθηση νεύρων, χαμηλό στάδιο pTN, ριζική γαστρεκτομή καθώς και αρνητικό θρόμβο όγκου ($P = 0,003$). Έτσι, το TIL^{HIGH} συσχετίστηκε θετικά με τις περισσότερες από τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους του όγκου και αυτή η σχέση αποκάλυψε ότι τα TILs αντιπροσωπεύουν μια ενίσχυση της αντικαρκινικής ανοσοαπόκρισης του ξενιστή και μια θετική πρόγνωση για ασθενείς με GC. Έτσι, τα TILs μπορούν να είναι ένας ισχυρός προγνωστικός δείκτης και τόσο κρίσιμος όσο και οι κλινικοπαθολογικές παράμετροι. Από την άλλη, η προγνωστική αξία των TILs στον καρκίνο του στομάχου, που φάνηκε από την ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier έδειξε ότι η μέση περίοδος επιβίωσης των ασθενών με TIL^{HIGH} ($78,17 \pm 2,00$ μήνες) σε σύγκριση με αυτή των ασθενών με TIL^{LOW} ($41,21 \pm 2,09$ μήνες) ήταν σημαντικά διαφορετική και οι ασθενείς με TIL^{HIGH} είχαν καλύτερη πρόγνωση από τους ασθενείς με TIL^{LOW}. Επίσης, τα χαμηλά και υψηλά επίπεδα TIL είχαν σημαντική προγνωστική αξία για ασθενείς σταδίου I-III pTN και η τάση έδειξε ότι η πρόγνωση ήταν καλύτερη με TIL^{HIGH}, ενώ το υψηλό επίπεδο TIL είχε προστατευτική επίδραση στην επιβίωση των ασθενών. Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ότι τα TILs μπορούν να συνδυαστούν με το TNM ώστε να παρέχουν ολοκληρωμένες προγνωστικές πληροφορίες για ασθενείς με GC. Η υπόθεση που αναφέρεται από τους Rosenberg et al. (1992), δηλαδή ότι το TIL έχει αντικαρκινική λειτουργία μόνο όταν διεισδύει σε μεγάλο βαθμό στο TME, επιβεβαιώθηκε σε αυτή τη μελέτη [Zhang D. et al. (2019)].

Στη σχέση των βασικών υποπληθυσμών των TILs με την επιβίωση ασθενών με GC, που είχαν υποβληθεί σε γαστρεκτομή και τον ρόλο τους ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί βιοδείκτες, «έριξε φως» η εργασία του Zhengbin S. et al. Ιδιαίτερα μελέτησαν την προγνωστική αξία των FOXP3⁺, των CD8⁺ CTLs, CD4⁺ και των αναλογιών FOXP3⁺/CD8⁺ σε 133 ασθενείς με GC μετά από ριζική εκτομή R0, έπειτα από την οποία δεν παρατηρούνται μικροσκοπικά καρκινικά κύτταρα στην αρχική θέση του όγκου και έτσι υπάρχει ευρεία αφαίρεση του όγκου με καθαρά όρια εκτομής.

Διαπιστώθηκε ότι τα CD4⁺ και CD8⁺ TILs δεν συσχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση (OS). Επιπρόσθετα, στις θέσεις του όγκου, η υψηλότερη αναλογία FOXP3⁺/CD8⁺ ήταν ένας ανεξάρτητος παράγοντας για χειρότερη OS. Τα OS rates 1 έτους, 2 ετών και 3 ετών ήταν 90, 77,5 και 70% για την ομάδα με υψηλή αναλογία FOXP3⁺/CD8⁺ εντός του όγκου, σε σύγκριση με 100, 94,3 και 90,5% για την ομάδα με χαμηλή ενδοογκική αναλογία. Ταυτόχρονα, η παρουσία υψηλών επιπέδων ενδοκαρκινικών FOXP3⁺ συσχετίστηκε επίσης με χειρότερη OS, ωστόσο, δεν ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας και συσχετίστηκε με την ενδοκαρκινική αναλογία FOXP3⁺/CD8⁺ (P<0,001). Παρόλο που η διήθηση των FOXP3⁺ στους περιφερειακούς λεμφαδένες N1 συσχετίστηκε με μετάσταση στους λεμφαδένες (P=0,028), δεν συσχετίστηκε με την πρόγνωση (P=0,458). Έτσι, συμπερασματικά φάνηκε ότι η υψηλή αναλογία FOXP3⁺/CD8⁺ εντός του όγκου ήταν ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την πρόγνωση του GC, και συμπεραίνεται ότι ένας συνδυασμός εξάλειψης των FOXP3⁺ και διέγερσης CD8⁺ τελεστικών T κυττάρων μπορεί να είναι μια αποτελεσματική ανοσοθεραπεία για την παράταση της επιβίωσης των ασθενών μετά την χειρουργική επέμβαση [Shen Z. et al. (2010)].

Επιπλέον, σε μια παλαιότερη μελέτη που διεξήχθη από τους Lee H.E et al. που περιλάμβανε 220 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική εκτομή του GC, οι συγγραφείς εστίασαν στον τύπο και την πυκνότητα των TILs (CD3, CD8, και CD45RO) και τους αντίστοιχους ρόλους τους στην πρόβλεψη της κλινικής πορείας του GC. Οι όγκοι ομαδοποιήθηκαν σε ομάδες χαμηλής και υψηλής πυκνότητας για κάθε δείκτη (CD3, CD8, CD45RO). Οι πυκνότητες των CD3⁺, CD8⁺ και CD45RO⁺ TILs βρέθηκαν να είναι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες της μετάστασης στους λεμφαδένες. Συγκεκριμένα, οι ομάδες με CD3^{HIGH}, CD8^{HIGH} και CD45RO^{HIGH} έδειξαν χαμηλότερη συχνότητα μετάστασης στους λεμφαδένες από τις αντίστοιχες ομάδες χαμηλής πυκνότητας, που συσχετίστηκαν σημαντικά με την παρουσία μετάστασης στους περιφερειακούς λεμφαδένες. Λαμβάνοντας υπόψη αυτή την παρατήρηση, έγινε η υπόθεση ότι η πυκνότητα των TILs προβλέπει τη μετάσταση στους λεμφαδένες στον καρκίνο του στομάχου. Ακόμα, η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier αποκάλυψε ότι οι ασθενείς στην ομάδα υψηλής πυκνότητας για CD3, CD8 και C45RO είχαν σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης από τους ασθενείς στην ομάδα χαμηλής πυκνότητας, αντίστοιχα. Πιο λεπτομερώς, η ομάδα CD3^{HIGH}, CD8^{HIGH} και CD45RO^{HIGH} είχαν μέσους χρόνους επιβίωσης 85,1±5,2, 81,0±5,3 και 83,1±5,3 μήνες, αντίστοιχα, σε σύγκριση με μόνο 63,0±3,5, 64,3±3,5 και 63,7±3,5 μήνες στις αντίστοιχες ομάδες

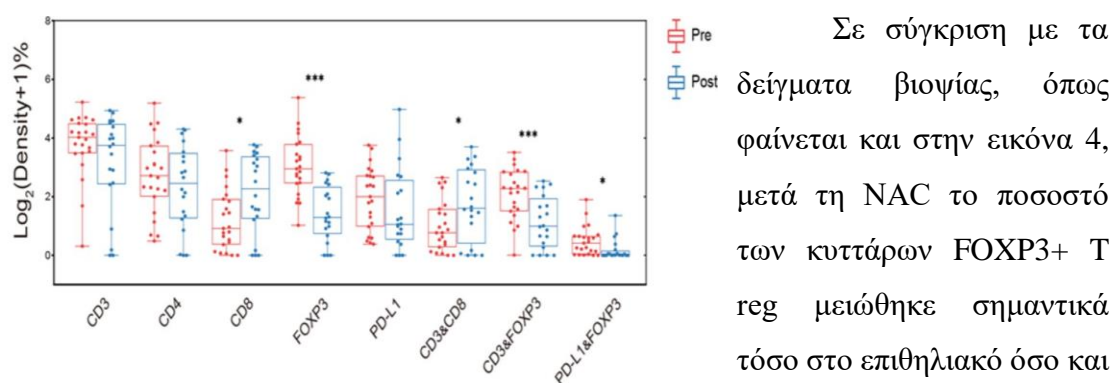
χαμηλής πυκνότητας. Όλα αυτά υποδηλώνουν ότι η πυκνότητα των TILs είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της μετάστασης στους λεμφαδένες και της επιβίωσης των ασθενών με GC [Lee H. et al. (2008)].

Οπότε, λόγω της αντικαρκινικής δραστηριότητας των T κυττάρων, οι ασθενείς με GC και υψηλά επίπεδα συγκεκριμένων υποπληθυσμών TILs φαίνεται να έχουν καλύτερη πρόγνωση. Αντίθετα, η έκφραση PD-L1 φαίνεται να συσχετίζεται με την πιο επιθετική συμπεριφορά της νόσου, όπως γίνεται ξεκάθαρο από την εργασία του Shigemori T. et al. (2019), που αξιολόγησε την έκφραση του PD-L1 σε πρωτογενείς ιστούς και τη συγκέντρωση του διαλυτού PD-L1 (sPD-L1) στον προεγχειρητικό ορό ασθενών με GC για να πραγματοποιήσει άμεση σύγκριση μεταξύ της έκφρασης PD-L1 στον ιστό και στον ορό και να διευκρινιστεί η προγνωστική επίπτωση τους στον GC. Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 180 ασθενείς με GC που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση γαστρεκτομής. Αποδείχθηκε ότι η έκφραση του PD-L1 στον ιστό ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με GC με προχωρημένο στάδιο T, παρουσία λεμφοαγγειακής εισβολής, μετάστασης λεμφαδένων και περιτοναϊκή μετάσταση και αυτή η αυξημένη έκφραση PD-L1 συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση για τη συνολική επιβίωση (OS) και την επιβίωση χωρίς νόσο (DFS). Όσον αφορά, το sPD-L1 ορού η συγκέντρωσή του ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με GC από ότι στους υγιείς εθελοντές. Οι ασθενείς με υψηλό sPD-L1 ορού εμφάνισαν φτωχότερη OS και DFS από εκείνους με χαμηλό sPD-L1. Γενικά, τόσο η έκφραση sPD-L1 στον ορό όσο και η έκφραση PD-L1 στον ιστό μπορεί να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί βιοδείκτες για την υποτροπή και την πρόγνωση σε ασθενείς με GC [Shigemori T. et al. (2019)].

Η νεοεπικουρική χημειοθεραπεία (neoadjuvant chemotherapy, NAC) χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για τη βελτίωση του αποτελέσματος της θεραπευτικής χειρουργικής εκτομής και τη μείωση του κινδύνου μικρομετάστασης, παρατείνοντας έτσι την επιβίωση ασθενών με προχωρημένο GC. Σε αυτήν την εποχή της ανοσοθεραπείας του καρκίνου, συσσωρευμένα στοιχεία έχουν δείξει ότι η συμβατική χημειοθεραπεία θα μπορούσε να έχει ανοσορυθμιστικά αποτελέσματα. Έτσι, είναι σημαντικό να αποκαλυφθεί η διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος όγκου (TME) που προκαλείται από τη χημειοθεραπεία και να προσδιοριστεί ποια ανοσοθεραπεία θα βελτιώσει το αντικαρκινικό αποτέλεσμα. Αυτό προσπάθησε να διαλευκάνει η μελέτη του Xing X. et al (2022), όπου είναι η μεγαλύτερη μελέτη που

περιγράφει την επίδραση της NAC στο ανοσοποιητικό μικροπεριβάλλον του όγκου και ανέλυσε τη διήθηση των σχετιζόμενων με τον όγκο ανοσοκυττάρων (TAICs) σε «residual» όγκο, δηλαδή σε όγκο που παρέμεινε μετά από προσπάθειες αφαίρεσης του με θεραπεία και στη συγκεκριμένη περίπτωση μετά από NAC. Ουσιαστικά, υπήρχαν 3 ομάδες ασθενών:

- I. 1075 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε γαστρεκτομή αδενοκαρκινώματος, χωρίς προεγχειρητική θεραπεία
- II. 341 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε γαστρεκτομή αδενοκαρκινώματος και έλαβαν θεραπεία με NAC
- III. Ανεξάρτητη κοορτή 30 ασθενών με GC σταδίου II/III που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με NAC των οποίων η ανταπόκριση καθορίστηκε αυστηρά



Εικόνα 4: Σύγκριση της πυκνότητας των ανοσολογικών δεικτών προ-NAC και μετά-NAC. Ο άξονας X αντιπροσωπεύει τους απλούς/συνδυασμένους ανοσοδείκτες και ο άξονας Y υποδεικνύει την πυκνότητα διήθησης. Xing X. et al. (2022)

Επιπλέον, τα CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα ήταν σημαντικά αυξημένα στα χειρουργικά δείγματα μετά τη χημειοθεραπεία σε σχέση με τα δείγματα βιοψίας προ χειρουργείου. Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε ότι η αύξηση των CD8+ κυτταροτοξικών T κυττάρων ήταν πιο σημαντική στην ομάδα που υποβλήθηκε σε θεραπεία με σχήμα XELOX (σχήμα χημειοθεραπείας που αποτελείται από καπεσιταβίνη (Xeloda) και οξαλιπλατίνη) και σε ασθενείς με καλύτερη ανταπόκριση. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η διήθηση των CD3+ T κυττάρων μειώθηκε σημαντικά μετά τη χημειοθεραπεία στο επιθηλιακό και το στρωματικό διαμέρισμα αντίστοιχα, μαζί με τα βοηθητικά κύτταρα CD4+ T στις επιθηλιακές περιοχές. Η μείωση των FOXP3+ συσχετίστηκε με καλύτερη απόκριση και φαίνεται ότι σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση στον GC. Επίσης, η αύξηση της πυκνότητας των CD8+ T κυττάρων μετά τη NAC δείχνει ότι η χημειοθεραπεία ενισχύει

την αντικαρκινική ανοσία, ενώ φάνηκε ακόμα ότι τα επίπεδα των CD8+ T κυττάρων μετά τη NAC προβλέπουν σημαντικά την πρόγνωση, όπου αυξημένη πυκνότητα συνοδεύεται από ανταπόκριση στη θεραπεία. Τα επίπεδα CD8+ T μετά-NAC, GZMB+ (Granzyme B) T κυττάρων, CD57+ NK και CD20+ B κυττάρων ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα απόκρισης στη χημειοθεραπεία. Ασθενείς με υψηλότερη διήθηση CD3+ και CD8+ T κυττάρων είχαν μεγαλύτερη συνολική επιβίωση (OS) από ασθενείς με χαμηλότερο επίπεδο. Γενικότερα, δείχθηκε ότι η NAC έχει την ικανότητα να μεταβάλλει τη διήθηση και τους υποτύπους των ανοσοκυττάρων μειώνοντας σημαντικά τα κύτταρα FOXP3+ T reg και αυξάνοντας τόσο τα κυτταροτοξικά κύτταρα CD8+ όσο και την ποικιλομορφία των TCR (T-cell receptor). Έτσι, ρυθμίζει την ισορροπία των υποτύπων του ανοσοποιητικού συστήματος προς όφελος της ανοσοενεργοποίησης και της βελτιωμένης έκβασης σε ένα υποσύνολο ασθενών με GC [Xing X. et al. (2022)].

Αξίζει να αναφερθεί και η μελέτη του Lu J. et al. που είχε ως στόχο να διερευνήσει την προγνωστική σημασία των TILs και των μακροφάγων που σχετίζονται με τον όγκο (TAMs), καθώς και τη σχέση τους με την μετεγχειρητική επικουρική χημειοθεραπεία (PAC) σε 401 ασθενείς με GC που είχαν υποβληθεί σε γαστρεκτομή, οι οποίοι χωρίστηκαν περαιτέρω σε ομάδες με αυξημένη έκφραση (θετική ομάδα) CD8+ ή CD68+ και σε ομάδες με μειωμένη έως καθόλου έκφραση (αρνητική ομάδα). Στη διερεύνηση της συσχέτισης των CD8+ TIL και CD68+ TAM με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, φάνηκε πως η θετική σε CD8+ TIL ομάδα συσχετίστηκε αρνητικά με τη λεμφαγγειακή εισβολή και τη μετάσταση στους λεμφαδένες, ενώ μια τέτοια συσχέτιση δεν βρέθηκε στην υποομάδα θετική για CD68+ TAM. Ακόμα, η θετική CD8+ TIL ομάδα έδειξε σημαντικά καλύτερη RFS και OS σε σύγκριση με την αρνητική ομάδα, ενώ αντίθετα, η θετική ομάδα CD68+ TAM έδειξε σημαντικά φτωχότερη RFS και OS σε σύγκριση με την αρνητική ομάδα. Έτσι, οι ασθενείς με θετική κατάσταση CD8+ TIL και αρνητική CD68+ TAM παρουσίασαν σημαντικά αυξημένο RFS και έτσι τα CD8+ TILs και CD68+ TAMs μπορεί να χρησιμεύσουν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες για RFS σε ασθενείς με GC. Το πιο σημαντικό όμως ήταν ότι οι ασθενείς με αυξημένη έκφραση CD8+ TIL και μειωμένη έκφραση CD68+TAM εμφάνισαν τάση βελτιωμένης RFS και OS μετά από την PAC. Συμπερασματικά, η κατάσταση των CD8+ TIL και CD68+ TAM αναγνωρίστηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες που μπορούν να ενσωματωθούν στο τρέχον σύστημα σταδιοποίησης TNM για να βελτιώσουν τη

διαστρωμάτωση κινδύνου και να προβλέψουν καλύτερα το όφελος επιβίωσης από την PAC σε ασθενείς με GC και να βοηθήσουν τόσο τους κλινικούς ιατρούς όσο και τους ασθενείς να ποσοτικοποιήσουν τα οφέλη της επικουρικής χημειοθεραπείας μετά από εκτομή GC και να διαμορφώσουν εξατομικευμένες θεραπευτικές συστάσεις και αποφάσεις θεραπείας [Lu J. et al. (2019)].

Τέλος, ενώ η χημειοθεραπεία είναι η τυπική θεραπευτική επιλογή για ασθενείς με μεταστατικό γαστρικό καρκίνο (mGC), συνήθως είναι ανεπαρκής για την ανακούφιση των τοπικών συμπτωμάτων, με αποτέλεσμα συχνά την ανάγκη για πρόσθετες παρεμβάσεις. Η ανακουφιστική ακτινοθεραπεία (Radiation Therapy-RT) έχει προταθεί ότι καταπραΰνει τον πόνο του όγκου, την αιμορραγία και την απόφραξη που προκαλείται από τον πρωτοπαθή όγκο σε ασθενείς με mGC και έχει αναγνωριστεί ως βιώσιμη, μη επεμβατική θεραπευτική επιλογή. Οι αναστολείς του ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου μπορεί να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας (RT) στη θεραπεία του καρκίνου, αλλά το αποτέλεσμα παραμένει άγνωστο στον μεταστατικό καρκίνο του στομάχου (mGC). Η μελέτη του Sasaki A. et al. είχε ως στόχο να συγκρίνει τη συρρίκνωση του όγκου με την ανακουφιστική ακτινοθεραπεία που χορηγείται όχι για ίαση αλλά για τον έλεγχο των συμπτωμάτων και την ανακούφιση του ασθενή σε 36 περιπτώσεις ασθενών με mGC με ή χωρίς προηγούμενη έκθεση σε θεραπεία αντι-PD-1. Η μελέτη έδειξε, πως η προηγούμενη έκθεση σε θεραπεία αντι-PD-1 αυξάνει την απόκριση του όγκου στην RT, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις φάνηκε να αυξάνει και την αναλογία CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων/ενεργών ρυθμιστικών T-κυττάρων σε TILs. Αν και το μικρό μέγεθος δείγματος της συγκεκριμένης εργασίας είναι ο κύριος περιορισμός της, τα ευρήματά προτείνουν ότι η θεραπεία με αντι-PD-1 μπορεί να ενισχύσει την ευαισθησία του πρωτογενούς GC στην RT μέσω ανοσοενεργοποίησης στο TME και έτσι η RT να είναι πιο αποτελεσματική και βοηθητική για τους ασθενείς [Sasaki A. et al. (2020)].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τις αναφορές που παρουσιάσθηκαν συγκεντρωτικά και αναλύθηκαν πιο πάνω, προκύπτει ότι τα TILs, που βρίσκονται στο TME, είναι τα βασικά στοιχεία της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης έναντι των καρκινικών κυττάρων και έτσι συχνά αποτελούν αξιόπιστους προγνωστικούς δείκτες έκβασης της θεραπείας σε πληθώρα καρκίνων. Πράγματι, τα CD3⁺ TILs, CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs, CD20⁺ TILs και

FOXP3+ TILs που εμφανίζουν διαφορετικές επιδράσεις, έχουν πολλές φορές συσχετιστεί με την έκβαση ασθενών, με πιο χαρακτηριστικές τις αντίθετες επιδράσεις των CD8+ και FOXP3+ TILs. Έτσι, η αυξημένη πυκνότητα CD8+ και η μειωμένη FOXP3+ TILs, φαίνεται να υποδεικνύει καλύτερη πρόγνωση, όσον αφορά την πιθανότητα υποτροπής, την μετάσταση του καρκίνου σε λεμφαδένες ή σε ένα απομακρυσμένο μέρος του σώματος, την ανταπόκριση στη θεραπεία (εκτομή καρκίνου, χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία) και της επιβίωσης των ασθενών στην πλειονότητα των καρκίνων που έχουν μελετηθεί. Εκτός από τα επίπεδά τους, που μπορούν να αλλάξουν δυναμικά κατά την εξέλιξη του όγκου και ως απόκριση στην αντικαρκινική θεραπεία, πολύ σημαντική είναι και η εντόπιση των TILs, η οποία ποικίλει και μπορεί να είναι στο TN, TS και IM και είναι εξίσου σημαντική στην αξιολόγηση της σημασίας τους.

Παρότι η διήθηση και ο ρόλος των διαφόρων υποπληθυσμών TILs έχει μελετηθεί αρκετά, χρειάζεται να μελετηθούν περισσότερο, ιδιαίτερα όσον αφορά τον ρόλο τους ως κρίσιμο συστατικό του TME, που αναδύεται ως σημαντικός παράγοντας στην κατανόηση της σχέσης μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του όγκου, καθώς και των αλληλεπιδράσεων που εμφανίζουν τόσο μεταξύ τους όσο και με τα υπόλοιπα συστατικά του όγκου που ενδέχεται να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα της έκβασης του ασθενούς. Εξαιρετικά σημαντικό είναι να οριστεί ειδικά για τον εκάστοτε τύπο καρκίνου και τον υπότυπο TIL, η τιμή «cut off» σύμφωνα με την οποία θα καθορίζονται η ομάδες ασθενών με αυξημένη ή μειωμένη διήθηση TILs. Για να το κατορθώσουμε αυτό, χρειάζεται να ξεκαθαριστούν οι υπότυποι TILs που θα αποτελούν προγνωστικούς δείκτες για κάθε τύπο και υπότυπο καρκίνου, καθώς και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων δρουν. Δυστυχώς οποιαδήποτε συσχέτιση μεταξύ των TILs και του κλινικού αποτελέσματος δεν παρέχει σημαντική πληροφόρηση για τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς και είναι απαραίτητες περισσότερες μελέτες σε μεγαλύτερους και διαφορετικούς πληθυσμούς για να τους αναλύσουμε και να τους κατανοήσουμε σε βάθος. Αναμένεται ότι η παρουσία ή η μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκεκριμένων TILs, θα μπορέσει να εφαρμοστεί όχι μόνο ως προγνωστικός δείκτης έκβασης της θεραπείας αλλά και σαν βιολογικός δείκτης για την επιλογή ασθενών κατάλληλων για ανοσοθεραπεία ή και για την παρακολούθηση των ασθενών κατά τη διάρκεια της αντικαρκινικής θεραπείας και τον έλεγχο της ανταπόκρισης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συζητήθηκαν πολλές εργασίες οι οποίες έχουν δείξει ότι η υψηλή πυκνότητα διαφόρων υποτύπων TILs είναι ένας καλός

προγνωστικός βιοδείκτης για ασθενείς με τους πιο συχνούς τύπους καρκίνου. Ωστόσο πολλές μελέτες έχουν καταλήξει σε αντικρουόμενα ευρήματα για κάποιους τύπους TILs και την πιθανή συσχέτισή τους με την πρόγνωση συγκεκριμένων θεραπειών και της έκβασης των ασθενών. Οι αντικρουόμενες αναφορές ενδεχομένως οφείλονται στο μέγεθος του δείγματος, στους διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών, στη θέση της διήθησης, στους διάφορους τύπους των TILs και στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, στο στάδιο και στον τύπο του καρκίνου και στα διαφορετικά συστήματα αξιολόγησης των TILs (αυτοματοποιημένα ή μη). Στο πλαίσιο αυτό, θεωρείται σκόπιμο να αναφερθούν και να συγκριθούν τα ευρήματα που είναι κοινώς αποδεκτά και υποστηρίζονται από τις περισσότερες, μεγαλύτερες και πιο πρόσφατες έρευνες στη διεθνή βιβλιογραφία.

Όσον αφορά τον **καρκίνο του Μαστού**, η επίδραση των TILs στην κλινική έκβαση του είναι περισσότερο εμφανής όταν οι υπότυποι του αξιολογούνται ξεχωριστά. Γενικότερα, παρατηρείται αυξημένη πυκνότητα διήθησης TILs στην καλοήγη υπερπλασία πόρου του μαστού, ακόμα μεγαλύτερη στο DCIS και φτάνει στη μέγιστη πυκνότητα στον διηθητικό καρκίνο του μαστού, δηλαδή καθώς αναπτύσσεται σε διηθητική κακοήθεια. Τα αυξημένα επίπεδα διήθησης CD8+ και CD4+ T-κύτταρων έχουν αποδειχθεί ότι προβλέπουν βελτιωμένη κλινική έκβαση και ειδική επιβίωση στον BC, όπως και η αυξημένη διήθηση κυττάρων με έκφραση T-BET+ προβλέπει βελτιωμένη DFS σε όλους τους υποτύπους καρκίνου του μαστού, ενώ η παρουσία του δείκτη FOXP3+ στον όγκο έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση [Sahar M A Mahmoud et al (2011), Hussein M. and Hassan H. (2006)].

Πιο συγκεκριμένα, στον DCIS, η αυξημένη διήθηση FOXP3+ σχετίζεται με μειωμένη RFS και ενδεχομένως αντιπροσωπεύει έναν δείκτη για τον εντοπισμό ασθενών με όψιμη υποτροπή (late-relapse) που μπορεί να ωφεληθούν από τη θεραπεία με αρωματάση μετά την καθιερωμένη θεραπεία με ταμοξιφαίνη. Στον διηθητικό καρκίνο του μαστού, το μεγαλύτερο κλινικό όφελος έχει παρατηρηθεί σε όγκους με λεμφοκυτταρική διήθηση μεγαλύτερη από 50% (LPBC), που συνήθως είναι TNBC και HER2+. Ωστόσο, ακόμη και μικρές σταδιακές αυξήσεις των TILs (10%), στο TS και TN, οδηγούν σε καλύτερη επιβίωση, μείωση κινδύνου υποτροπής, μείωση κινδύνου θανάτου και καλύτερη ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία. Έτσι, θεραπείες που αυξάνουν έστω και μέτρια τα TILs μπορούν να ωφελήσουν τα κλινικά αποτελέσματα σε αυτούς τους υποτύπους. Όσον αφορά τα υποσύνολα TILs, υψηλά επίπεδα διήθησης CD4+ και CD8+ TILs, στον TNBC, είναι προγνωστικά μιας θετικής

μακροπρόθεσμης πρόγνωσης με καλύτερη OS και DFS, ενώ σε ασθενείς με TNBC και HER2+ που έχουν λάβει χημειοθεραπεία, η παρουσία αυξημένων επιπέδων TILs συσχετίστηκε με βελτιωμένη επιβίωση, μειωμένη RFS και μεγαλύτερα ποσοστά pCR. Στον HER2+, αυξημένη διήθηση TILs με έκφραση TBET+ προβλέπει βελτιωμένη RFS σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με trastuzumab, ενώ η αυξημένη διήθηση CD8+ TILs σχετίζεται με καλύτερη RFS στον HER2- από ότι στον HER2+. Τέλος, στους όγκους HR+ BC όπου είναι HER2-, καθώς και σε HR- (χωρίς ορμονικούς υποδοχείς), υψηλά επίπεδα TILs, σχετίζονται με ευνοϊκό DFS 5 ετών. Ειδικά, όταν δεν υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία, τα υψηλά επίπεδα διήθησης TILs σχετίζονται με στατιστικά μικρότερα ποσοστά μακρινής μεταστατικής υποτροπής στα στάδια I-II του BC. Θεραπείες που μειώνουν τη διήθηση FOXP3+, μπορούν να βελτιώσουν επικουρικά την κλινική ανταπόκριση αυτών των ασθενών μέσω αύξησης της λεμφοκυτταρικής διήθησης [Kolberg-Liedtke et al. (2022), Okcu O. et al. (2022), Takada K. et al. (2021), Gao et al. (2020), Stanton and Disis (2016), Hida et al. (2016), Loi S. et al. (2013), Liu S. et al. (2012), Denkert C. et al. (2010), Bates et al. (2006)].

Έτσι, τα TILs φαίνεται ότι είναι μια προγνωστική και βιολογική παράμετρος που μπορεί να προβλέψει και να καθορίσει την ανταπόκριση και επιτυχία της θεραπείας, καθώς και τον κίνδυνο υποτροπής στον BC. Παράλληλα, η αποτελεσματικότητα των TILs στην ογκοκαταστολή αυξάνεται με την ανοσοθεραπεία καθώς και μεθόδους επικουρικής θεραπείας, όπως επικουρική χημειοθεραπεία (CT), ορμονοθεραπεία, και ακτινοθεραπεία και έχει φανεί πως μια υψηλή διήθηση TILs (CD8+ TILs και CD4+ TILs) και χαμηλή διήθηση FOXP3+ TILs σχετίζεται με βελτιωμένους χρόνους χωρίς νόσο και συνολικής επιβίωσης στον BC, ειδικά στους υποτύπους TNBC και HER2 που αντιμετωπίζονται με χημειοθεραπεία. Γενικά, η παρουσία TILs βοηθά στην επιλογή ασθενών που θα υποβληθούν σε χημειοθεραπεία, ενώ μπορούν να αξιολογηθούν γρήγορα σε όλα τα εργαστήρια, χωρίς καμία δαπάνη.

Στον **καρκίνο του Πνεύμονα**, η έρευνά μας επικεντρώθηκε στον βασικό ιστολογικό υπότυπό του, τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ). Φαίνεται να υπάρχει ομοφωνία στα δεδομένα των ερευνών που εξετάστηκαν όσον αφορά τη σχέση των διαφόρων υποτύπων TILs με την έκβαση της θεραπείας. Σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργικές θεραπευτικές εκτομές του ΜΜΚΠ και δεν είχαν λάβει επικουρική ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία πριν την επέμβαση, τα υψηλά επίπεδα διήθησης κυρίως των CD8+ TILs αλλά και των CD4+, CD3+ και CD20+ T κυττάρων, στο TN και στο TS και τα μειωμένα επίπεδα FOXP3+

εντός του όγκου, συσχετίστηκαν με στατιστικά σημαντικά καλύτερη OS, PFS, DFS, RFS και DSS, σε σύγκριση με ασθενείς με τα αντίθετα επίπεδα. Όσον αφορά τα συνδυαστικά αποτελέσματα, ασθενείς με αναλογία $CD8^{+HIGH}/FOXP3^{+LOW}$ είχαν τη μεγαλύτερη επιβίωση ενώ εκείνοι με πρότυπο $CD8^{+LOW}/FOXP3^{+HIGH}$ είχαν ιδιαίτερα κακή έκβαση, με περίπου το μισό χρόνο επιβίωσης σε σχέση με τους πρώτους (31,0 μήνες vs 17,2 μήνες). Ωστόσο, σημειώνεται ότι η προγνωστική αξία των $CD8^{+HIGH}/FOXP3^{+LOW}$ ενδεχομένως οφείλεται κυρίως στην επίδραση των $CD8^{+}TILs$. Ακόμα, χαμηλές πυκνότητες ώριμων δενδριτικών κυττάρων και $CD8^{+} T$ -κυττάρων φάνηκαν να προσδιορίζουν υποομάδες ασθενών με ΜΜΚΠ με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο θανάτου. Έτσι, θα μπορούσαν τα υψηλά επίπεδα διήθησης των $CD3^{+}$, $CD4^{+}$, $CD20^{+}$ και κυρίως των $CD8^{+} T$ κυττάρων να αναγνωρίζονται ως ευνοϊκοί προγνωστικοί βιοδείκτες ενώ αντίθετα η αυξημένη διήθηση $FOXP3^{+} TILs$ να αναγνωρίζεται ως φτωχός προγνωστικός βιοδείκτης έκβασης. Ακόμα, επειδή σε ασθενείς με χειρουργική εκτομή του ΜΜΚΠ σταδίου I, το υψηλό ποσοστό διήθησης $CD8^{+}TILs$, φάνηκε να είναι καλύτερος προγνωστικός δείκτης για το DFS από τα παραδοσιακά χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου, προτείνεται ασθενείς με χαμηλά επίπεδα $CD8^{+} TILs$ να λαμβάνονται υπόψιν για επικουρική χημειοθεραπεία, ακόμη και αν δεν έχουν χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου [Chen et al. (2020), Tian C. et al (2015), O'Callaghan et al. (2015), Geng Y. et al. (2015), Petersen RP. et al. (2006)].

Όσον αφορά, στη σχέση των $TILs$ με την έκβαση των ασθενών με προχωρημένο ΜΜΚΠ, που λάμβαναν θεραπεία με αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού (ICIs)-nivolumab και χημειοθεραπεία, δείχθηκε ότι η υψηλή πυκνότητα $TILs$ συσχετίστηκε με ευνοϊκά αποτελέσματα στην ομάδα ασθενών με ΜΜΚΠ που έλαβαν ανοσοθεραπεία (nivolumab), αλλά όχι και στην ομάδα που έλαβε χημειοθεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, στη θεραπεία με nivolumab, τα υψηλά επίπεδα $TILs$ (κυρίως $CD8^{+}$) συσχετίστηκαν με ευνοϊκό OS, PFS και ποσοστό ανταπόκρισης (RR), με σχεδόν εξαπλάσια PFS στην ομάδα των ασθενών με υψηλά έναντι χαμηλά επίπεδα διήθησης $TILs$ (13,0 μήνες vs 2,2 μήνες). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αξιολόγηση των $TILs$ είναι χρήσιμη στην επιλογή ασθενών κυρίως για ανοσοθεραπεία. Ωστόσο, σίγουρα απαιτούνται περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος για να ξεκαθαριστεί η σχέση των $TILs$ με την χημειοθεραπεία στην έκβαση της νόσου και θεραπείας των ασθενών με ΜΜΚΠ [Gataa I. et al. (2021), Fumet et al. (2018), Teng F. et al (2016)].

Συμπερασματικά, αυτό που έχει φανεί μέχρι στιγμής από προκλινικές και κλινικές μελέτες είναι ότι τα αυξημένα επίπεδα CD3+, CD4+, CD20+ και CD8+TILs, με μεγαλύτερη σημασία να δίνεται στα CD8+ TILs και τα χαμηλά επίπεδα FOXP3+ TILs συσχετίζονται στατιστικά σημαντικά με την πρόγνωση ασθενών με ΜΜΚΠ, την επιβίωση των ασθενών μετά τη θεραπεία με χειρουργική επέμβαση εκτομής του ΜΜΚΠ, την ανοσοθεραπεία, ενώ για τη σχέση τους με τη χημειοθεραπεία απαιτούνται περαιτέρω μελέτες.

Στον **καρκίνο του Παχέος Εντέρου (CRC)**, τα δεδομένα των μελετών δείχνουν ότι η πυκνότητα των διαφόρων TILs συσχετίζεται με τη βελτίωση της έκβασης των ασθενών με CRC και μείωση της μετάστασης. Συγκεκριμένα, η αυξημένη συγκέντρωση των CD3+, CD4+, CD8+, CD45RO+ TILs και του Granzyme B, τόσο στο κέντρο του όγκου όσο και στο IM, συσχετίστηκε με στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη OS των ασθενών με CRC και με ασθενείς που δεν εμφάνισαν υποτροπή. Ακόμα, φάνηκε τα CD3+ TILs να διατηρούν την προγνωστική αξία μόνο σε ασθενείς με «node-negative» CRC (χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις), επομένως πρωιμότερο στάδιο (Στάδιο II) και σημειώθηκε το ενδεχόμενο τα υψηλά επίπεδα CD8+ να δρουν κατασταλτικά στη μετάσταση. Πιο αναλυτικά, οι υψηλές πυκνότητες διήθησης των κυττάρων CD8+ TILs του όγκου συσχετίστηκαν με ευνοϊκή προγνωστική σημασία και βελτιωμένη OS και DFS. Επίσης, αυξημένη διήθηση CD3+, CD8+ στο IM συσχετίστηκε με τα στάδια I-II του TNM CRC και την απουσία μεταστάσεων στους λεμφαδένες, ενώ η χαμηλότερη πυκνότητα CD8+ παρατηρήθηκε στο διηθητικό μέτωπο σε ασθενείς με CRC με απομακρυσμένες μεταστάσεις σε σχέση με ασθενείς χωρίς μεταστάσεις. Από την άλλη, τα CD3+ και CD4+ είχαν υψηλότερη πυκνότητα στο διηθητικό μέτωπο σε λιγότερο προχωρημένους καρκίνους (χαμηλότερα στάδια TNM), ενώ εμφάνισαν πολύ μικρότερες πυκνότητες σε CRC με μεγαλύτερο βάθος εισβολής όγκου [Markowski, A.R. (2022), Jylardistos P. (2019), Galon et al. (2006)].

Όσον αφορά, τη σχέση μεταξύ των TILs και της έκβασης της θεραπευτικής χειρουργικής επέμβασης και της χημειοθεραπείας, φάνηκε πως ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε θεραπευτική χειρουργική επέμβαση για πρωτοπαθείς μη μεταστατικούς CRC και παρουσίαζαν χαμηλά επίπεδα TILs συσχετίστηκαν με κακώς διαφοροποιημένους (υψηλού βαθμού) CRC και περινευρική εισβολή ενώ φάνηκε ομάδες ασθενών, με CRC σταδίου III και υψηλή συγκέντρωση TILs να έχουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά OS 5 ετών και DFS σε σχέση με την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης. Έτσι, θεωρήθηκε πως μια φλεγμονώδης κυτταρική αντίδραση

στο διηθητικό όριο του όγκου είναι χρήσιμος προγνωστικός παράγοντας επιβίωσης μετά από χειρουργική επέμβαση CRC, ιδιαίτερα για ασθενείς με νόσο σταδίου III ή καρκίνο του ορθού. Επιπλέον, η αυξημένη πυκνότητα TILs είχε προγνωστική αξία για μια θετική απόκριση ασθενών με CRC σταδίου III, στην επικουρική μετεγχειρητική χημειοθεραπεία με 5-φθοριουρακίλη (5-FU) και συσχετίστηκε με βελτιωμένη OS σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλά επίπεδα TILs. Μία μελέτη σε ένα πειραματικό μοντέλο καρκίνου σε ποντικούς, παρουσίασε ότι η βραχυπρόθεσμη χορήγηση φθοριουρακίλης μπορεί να αυξήσει τον πολλαπλασιασμό και την κυτταροτοξικότητα των CD8+ T κυττάρων, ενώ η επαναλαμβανόμενη χορήγηση επιφέρει μείωση των CD8+, αν και ο απόλυτος αριθμός των κυττάρων του ανοσοποιητικού μπορεί να ανακάμψει σχετικά γρήγορα μετά τη διακοπή της χημειοθεραπείας. Έτσι, χρειάζεται προσοχή στη χορήγηση μακροχρόνιας χημειοθεραπείας, καθώς η αντικαρκινική λειτουργία των ανοσοκυττάρων παραμένει μειωμένη για παρατεταμένη περίοδο [Wu et al. (2016), Morris M. et al. (2006), Prall F. et al. (2004)].

Τέλος, σε ασθενείς με CRC με μετάσταση στο ήπαρ που είχαν υποβληθεί σε θεραπευτική ηπατεκτομή, φάνηκε πως ο αυξημένος βαθμός διήθησης CD8+ TILs συσχετίστηκε με την πρόγνωση (βελτιωμένη OS και RFS), ενώ αντίθετα σε ασθενείς που έλαβαν μακροχρόνια χημειοθεραπεία πριν από τη χειρουργική επέμβαση, ο βαθμός διήθησης TIL δεν συσχετίστηκε με την πρόγνωση. Επιπλέον, η διήθηση των CD8+ TILs ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα υποτροπής σε σύγκριση με την ομάδα χωρίς υποτροπές μετά την ηπατεκτομή και η ομάδα αυξημένων επιπέδων CD8+ TILs συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με CEA \leq 5 ng/ml και πολύ καλύτερη RFS και OS από την ομάδα χαμηλής πυκνότητας, υποδεικνύοντας ότι η πυκνότητα των CD8+ TILs μπορεί να επηρεάσει έντονα το θεραπευτικό αποτέλεσμα και την πρόγνωση της ηπατικής μετάστασης [Wang E. et al. (2021)].

Συμπερασματικά, κυρίως τα CD3+ σχετίζονται με πρωιμότερα στάδια CRC, ωστόσο οι υψηλές πυκνότητες διήθησης CD3+, CD4+, CD8+, CD45RO+ TILs και του Granzyme B συσχετίστηκαν ξεκάθαρα με βελτιωμένη OS, DFS και RFS των ασθενών με CRC, μειωμένα ποσοστά υποτροπής και μετάστασης, όπως στην πιο συχνή περίπτωση μετάστασης στο ήπαρ. Υπογραμμίζεται, ότι η χορήγηση 5-FU σε ασθενείς με CRC σταδίου III, πρέπει να γίνεται για μικρό χρονικό διάστημα και όχι παρατεταμένα ώστε να έχει θετική επίδραση στην έκβαση ασθενών με CRC.

Εν συνεχεία, στον **καρκίνο του Προστάτη (PCa)**, έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες ότι οι αυξημένες πυκνότητες των CD8+ TILs, του υποδοχέα χημειοκίνης C-C

τύπου 7 (CCR7) και η αυξημένη αναλογία κυττάρων CD8+/FOXP3+ καθώς και τα μειωμένα επίπεδα PD-1 TILs, CD45+ και FOXP3+ TILs έχουν συσχετιστεί με βελτιωμένη έκβαση ασθενών με PCa που έχουν υποβληθεί σε ριζική προστατεκτομή (RP). Να σημειωθεί ότι, ο CCR7 έχει σημαντική ρόλο στην καθοδήγηση των κυττάρων προς και εντός των λεμφικών οργάνων και έχει μεγάλη σημασία στη λειτουργία του θύμου και στην απόκτηση ανοσίας και ανοχής, ενώ ο υποδοχέας είναι βασικός ρυθμιστής στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και στην κίνηση των δενδριτικών κυττάρων [Alrumaihi F. et al. (2022)].

Πιο συγκεκριμένα, σε ασθενείς με εντοπισμένο PCa που έχουν υποβληθεί σε RP, η υψηλή πυκνότητα CD8+ TILs έχει συσχετιστεί με βελτιωμένη 5ετή συνολική επιβίωση και ειδική επιβίωση των ασθενών, ενώ παρατηρείται και μία τάση για υψηλότερη 5ετή ελεύθερη βιοχημικής υποτροπής επιβίωση (5-year bRFS) και επιβίωση χωρίς μεταστάσεις (MFS), σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών με χαμηλή πυκνότητα. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται και στην κοόρτη PCa υψηλού κινδύνου, όπου η υψηλή ενδοογκική διήθηση CD8+ TILs στο δείγμα RP φάνηκε να είναι ένας ανεξάρτητος ευνοϊκός προγνωστικός παράγοντας για τη συνολική επιβίωση. Ακόμα, σημειώνεται ότι η ανοσοτροποποίηση προ-RP και οι νεοεπικουρικοί ανοσοθεραπευτικοί χειρισμοί, που προάγουν την ενδοκαρκινική διήθηση CD8+ μπορεί να είναι ευεργετική και να προσφέρει ένα όφελος επιβίωσης στους ασθενείς. Αντίθετα, η χαμηλή πυκνότητα CD8+ TILs μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμος βιοδείκτης για την αναγνώριση, εκ των προτέρων ασθενών με υψηλό κίνδυνο εξέλιξης της νόσου και θνησιμότητας όπου μπορεί να ωφεληθούν από την επιθετική επικουρική θεραπεία [Yang Y. et al (2021), Vicier et al. (2019)].

Επιπλέον, η νέο-επικουρική ορμονική θεραπεία (NHT) που βασίζεται στη στέρηση ανδρογόνων, και χορηγείται για τη βελτίωση της πρόγνωσης και του επιτυχούς ποσοστού της τοπικής θεραπείας, συμπεριλαμβανομένης της RP και της ακτινοθεραπείας, σε ασθενείς με PCa, ενίσχυσε την έκφραση της IL-7 και της CXCL10 στο φυσιολογικό ιστό του προστάτη και όχι μόνο αποκατέστησε την εξάντληση των λεμφοκυττάρων CD8+ που εμφανίζεται στον PCa αλλά και αύξησε σημαντικά το μέσο αριθμό κυττάρων CD8+ στον νεοπλασματικό ιστό. Γενικότερα, οι ασθενείς με υψηλότερες συχνότητες ενδοογκικών CD8+ και μειωμένα επίπεδα FOXP3+ εμφάνισαν σημαντικά βελτιωμένη DFS σε σύγκριση με ασθενείς με αντίθετα επίπεδα. Ακόμα, και η ομάδα με υψηλή αναλογία κυττάρων CD8+/FOXP3+ είχε σημαντική βελτίωση της DFS σε σύγκριση με την ομάδα χαμηλής αναλογίας. Έτσι, στην ομάδα

CD8+/FOXP3+^{HIGH}, ελάχιστοι ασθενείς εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή σε σύγκριση με την ομάδα CD8+/Treg^{LOW}. Ωστόσο, φάνηκε απουσία συσχέτισης μεταξύ της ΝΗΤ και της υψηλής αναλογίας CD8+/FOXP3+ εντός του όγκου, που είναι ενδεικτική καλής πρόγνωσης [Sorrentino C. et al (2011)].

Τέλος, η διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ των TILs και της έκβασης ασθενών, με τοπικά προχωρημένο PCa, που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία «διάσωσης» (SRT) μετά από RP λόγω υποτροπής της νόσου, έδειξε ότι οι υψηλότερες πυκνότητες CD8+ στρώματος και οι χαμηλότερες πυκνότητες PD-1 TILs σε δείγματα υποτροπής συσχετίστηκαν με μακρότερο bPFS, ενώ τα υψηλά επίπεδα στρωματικών CD8+ και ενδοογκικών CCR7 TILs και τα χαμηλά επίπεδα στρωματικών CD45 και FOXP3 TILs συσχετίστηκαν με παρατεταμένο PFS και OS [Nardone V. et al (2016)].

Όλα αυτά δείχνουν ότι το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον του PCa και η αυξημένη αναλογία CD8+/FOXP3+, η αυξημένη πυκνότητα των CD8+ TILs και CCR7, καθώς και τα μειωμένα επίπεδα PD-1 TILs, CD45+ και FOXP3+ TILs συσχετίζονται με βελτιωμένη OS, DFS, PFS, MFS και 5ετή bRFS των ασθενών με PCa και παρέχουν το σκεπτικό για το σχεδιασμό προοπτικών δοκιμών για την εξέταση του ρόλου της ανοσολογικής θεραπείας σε ασθενείς με PCa.

Καταλήγοντας, στον **καρκίνο του Στομάχου**, η πυκνότητα των TILs παρουσιάζεται να είναι ένας αξιόπιστος βιοδείκτης έκβασης της θεραπείας και πρόβλεψης των κλινικών αποτελεσμάτων των ασθενών με GC, αδenoκαρκίνωμα. Γενικότερα, τα υψηλά επίπεδα TILs συσχετίστηκαν με χαμηλότερο βάθος εισβολής, λιγότερη συμμετοχή των λεμφαδένων, προγενέστερο στάδιο TNM (III-IV έναντι I-II) και με ομάδες ασθενών με σημαντικά καλύτερη OS σε σύγκριση με ομάδες μειωμένων διηθήσεων TILs. Πιο συγκεκριμένα, η αυξημένη έκφραση των CD3+, CD4+ και κυρίως των CD8+ TILs που ήταν ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας βελτιωμένης επιβίωσης σε ασθενείς με GC, συσχετίστηκαν με αυξημένη και ευνοϊκή OS. Αντίθετα, η υψηλή έκφραση FOXP3+ συσχετίστηκε με μειωμένη OS και RFS. Ακόμα, σε ασθενείς με γαστρεκτομή και διάγνωση για πρωτοπαθές γαστρικό αδenoκαρκίνωμα όπου δεν είχαν λάβει προεγχειρητική χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία, η αυξημένη διήθηση TILs συσχετίστηκε με χαμηλό ποσοστό μετάστασης καρκίνου, καλύτερη OS, προστατευτική ανοσολογική απόκριση του ξενιστή κατά του όγκου GC και στατιστικά σημαντική συσχέτιση με μικρό μέγεθος του όγκου, αρνητική μετάσταση LN και χαμηλό στάδιο pTN. Η επιβίωση των ασθενών με TIL^{HIGH} ήταν σχεδόν διπλάσια από ασθενείς με TIL^{LOW} (78,17 ± 2,00 μήνες vs 41,21

± 2,09 μήνες) και έτσι συμπεραίνεται ότι το υψηλό επίπεδο TILs είχε προστατευτική επίδραση στην επιβίωση των ασθενών [Tian C. et al (2021), Zhang D. et al. (2019), Jung S.L (2018)].

Συγκεκριμένα, η υψηλότερη αναλογία FOXP3+/CD8+ ήταν ένας ανεξάρτητος παράγοντας για χειρότερη OS σε ασθενείς με GC, που είχαν υποβληθεί σε γαστρεκτομή, ενώ και η παρουσία υψηλών επιπέδων ενδοκαρκινικών FOXP3+ συσχετίστηκε με χειρότερη OS. Έτσι, ο συνδυασμός εξάλειψης των FOXP3+ και διέγερσης των CD8+ δραστικών T κυττάρων μπορεί να είναι μια αποτελεσματική ανοσοθεραπεία για την παράταση της επιβίωσης των ασθενών μετά την χειρουργική επέμβαση. Ομάδες με αυξημένη διήθηση CD3+, CD8+ και CD45RO+ έδειξαν χαμηλότερη συχνότητα μετάστασης στους λεμφαδένες και είχαν σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης από τις αντίστοιχες ομάδες χαμηλής πυκνότητας, γεγονός που σημαίνει πως η πυκνότητα αυτών των υποτύπων TILs είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της μετάστασης στους λεμφαδένες και της επιβίωσης των ασθενών με GC [Zhengbin S. et al. (2010), Lee H.E et al (2008)].

Επίσης, τόσο η υψηλή έκφραση PD-L1 όσο και η αυξημένη συγκέντρωση διαλυτού PD-L1 (sPD-L1) στον προεγχειρητικό ορό, συσχετίστηκαν με χειρότερη έκβαση ασθενών με GC που είχαν υποβληθεί σε γαστρεκτομή. Αποδείχθηκε ότι η έκφραση του PD-L1 ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με GC προχωρημένου σταδίου, με παρουσία μετάστασης στους λεμφαδένες και συσχετίστηκε σημαντικά με κακή πρόγνωση για την OS και DFS. Παράλληλα, ασθενείς με υψηλό sPD-L1 ορού εμφάνισαν φτωχότερη OS και DFS από εκείνους με χαμηλό sPD-L1 και έτσι τόσο η έκφραση sPD-L1 στον ορό όσο και η έκφραση PD-L1 στον ιστό μπορεί να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί βιοδείκτες για την υποτροπή και την πρόγνωση σε ασθενείς με GC [Shigemori T. et al. (2019)].

Η μελέτη της σχέσης της νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας (NAC) με τα TILs στον GC, έδειξε ότι μετά τη NAC τα ποσοστά των T-reg που εκφράζουν PD-L1 και των FOXP3+ μειώθηκαν σημαντικά και αυτό σχετίζεται με καλύτερη απόκριση και ευνοϊκή πρόγνωση. Αντίθετα, φάνηκε πως μετά τη NAC τα CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αυξήθηκαν σημαντικά και η αύξηση αυτή ήταν πιο σημαντική στους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με XELOX και σε ασθενείς με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία και βελτιωμένη OS. Έτσι, τα επίπεδα των CD8+ T κυττάρων μετά τη NAC προβλέπουν σημαντικά την πρόγνωση και ανταπόκριση των ασθενών, όπως και τα αυξημένα επίπεδα των GZMB+ T κυττάρων, CD57+ NK και

CD20+ B κυττάρων. Επιπρόσθετα, δείχθηκε και συσχέτιση των TILs με την μετεγχειρητική επικουρική χημειοθεραπεία (PAC), σε ασθενείς με GC με γαστρεκτομή. Συγκεκριμένα, ασθενείς με αυξημένα επίπεδα CD8+ TILs και μειωμένα επίπεδα CD68+ μακροφάγων που σχετίζονται με τον όγκο (TAM), συσχετίστηκαν με μειωμένη λεμφαγγειακή εισβολή και μετάσταση στους λεμφαδένες και σημαντικά βελτιωμένη OS και RFS μετά από την PAC, σε σύγκριση με ασθενείς με τα αντίθετα χαρακτηριστικά. Έτσι, αναγνωρίστηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες έκβασης της PAC στον GC, οι οποίοι μπορούν να ενσωματωθούν στο τρέχον σύστημα σταδιοποίησης TNM και να προβλέψουν καλύτερα το όφελος επιβίωσης από την PAC. Τέλος, ευρήματα ερευνών προτείνουν ότι η θεραπεία με αντι-PD-1, σε ασθενείς με mGC, μπορεί να ενισχύσει την ευαισθησία και απόκριση του πρωτογενούς GC στην ανακουφιστική ακτινοθεραπεία (RT) μέσω ανοσοενεργοποίησης στο TME και αύξηση αναλογίας CD8+/FOXP3+ έτσι ώστε η RT να είναι πιο αποτελεσματική για τους ασθενείς [Xing X. et. al (2022), Sasaki A. et al. (2020), Lu J. et al. (2019)].

Συμπερασματικά, υπάρχουν ακόμα περαιτέρω προκλήσεις που πρέπει να ξεπεραστούν πριν χρησιμοποιηθούν τα TILs ως προγνωστικοί βιοδείκτες στην κλινική θεραπεία του GC, όπως ότι οι κατάλληλες τιμές cut-off πρέπει να τυποποιηθούν. Ωστόσο, υποδηλώνεται έντονα ότι τα υψηλά επίπεδα διήθησης TILs, κυρίως CD8+, είναι πιθανοί βιοδείκτες και ακριβείς προγνωστικοί παράγοντες καλής πρόγνωσης σε ασθενείς με GC. Το κλινικό όφελος της αυξημένης έκφρασης των TILs στον ιστό του GC, θα συμβάλει στη μελλοντική έρευνα σχετικά με συμβατικές και νέες θεραπείες που στοχεύουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Έπειτα, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αναφερθούν οι πιθανοί τρόποι δράσης και λειτουργίας των κύριων υποτύπων TILs που μελετήθηκαν στην πλειονότητα των ερευνών και συσχετίστηκαν είτε με θετική είτε με αρνητική έκβαση των ασθενών στις διάφορες θεραπείες, όπου αναλύθηκαν σε κάποιο βαθμό στη μετα-ανάλυση του Chen B. et al (2020). Τα T κύτταρα που υπάρχουν στον όγκο είναι κυρίως μίγματα CD8+ και CD4+ T κυττάρων. Ο κύριος ρόλος των CD4+ T κυττάρων στην ανοσολογική απόκριση στον καρκίνο φαίνεται να είναι η εκκίνηση των CD8+ T κυττάρων και η διατήρηση του πολλαπλασιασμού τους. Ακόμα, τα ενεργοποιημένα CD4+ λεμφοκύτταρα μπορούν και ενεργοποιούν τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs), μέσω διαφόρων μηχανισμών για τη διατήρηση και ενίσχυση της αντικαρκινικής απόκρισης τους στους όγκους. Από την άλλη πλευρά, τα ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs) ένας υποτύπος CD4+ T κυττάρων με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες, όταν εκφράζουν

υψηλά επίπεδα CD4+/CD25+ στην κυτταρική τους επιφάνεια, φαίνεται να σχετίζονται με ευνοϊκή πρόγνωση για τους ασθενείς με καρκίνο. Από την άλλη, τα ρυθμιστικά T κύτταρα (TREG), που χαρακτηρίζονται από έκφραση του FOXP3+, παίζουν σημαντικό ρόλο στον ανοσοκατασταλτικό μηχανισμό του καρκίνου και πιθανόν είναι ο λόγος χειρότερης πρόγνωσης και υποτροπής κάποιων όγκων, καθώς τα FOXP3+ T κύτταρα, που αντιπροσωπεύουν το 5–10% των συνολικών CD4+ T κυττάρων, αναστέλλουν τις αντικαρκινικές δραστηριότητες του ανθρώπου μέσω της μείωσης της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων, καθώς και μέσω της αναστολής της λειτουργίας των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CTL), και ενδέχεται να προάγουν μια αντιφλεγμονώδη ανοσολογική απόκριση που θα μπορούσε να ενισχύσει την ανάπτυξη του όγκου. Ακόμα, σχετικά με τα CD8+ TILs, σχεδόν σε όλες τις έρευνες που εξετάστηκαν για τους συχνότερους καρκίνους, η αυξημένη παρουσία τους ήταν προγνωστικός παράγοντας ευνοϊκότερης έκβασης και ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία και αυτό ίσως σχετίζεται με τον ρόλο τους στην άμεση θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Όσον αφορά τα CD3+ TILs, τα δεδομένα έδειξαν ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων και στην βελτίωση της πρόγνωσης σε ασθενείς με καρκίνο. Το CD20+ είναι ένα αντιγόνο B-λεμφοκυττάρων που εκφράζεται στη επιφάνειά τους και παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των B κυττάρων, με αποτέλεσμα η υψηλή πυκνότητα CD20+ TILs να σχετίζεται με ευνοϊκό OS, ειδικά για ασθενείς με ΜΜΚΠ [Chen B. et al (2020)].

Οι δύο τύποι TILs που διερευνήθηκαν κυρίως στην πλειονότητα των μελετών και συσχετίστηκαν ως προγνωστικοί παράγοντες έκβασης των ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου είναι τα CD8+ και FOXP3+ TILs, που μελετήθηκαν τόσο ξεχωριστά όσο και η αναλογία τους (CD8+/FOXP3+). Υπάρχουν πολλές πιθανές βιολογικές εξηγήσεις που μπορεί να εξηγούν τις προφανείς αντίθετες επιδράσεις τους. Μια απλή υπόθεση είναι ότι τα κύτταρα CD8+ εντός του όγκου ενεργοποιούνται λειτουργικά και ελέγχουν την ανάπτυξη του όγκου μέσω των κυτοκινών που στοχεύουν και σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα, ενώ τα FOXP3+ εμφανίζουν ανοσοκατασταλτικό φαινότυπο που διευκολύνει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Έτσι, μια σχετική αύξηση στην ενδοογκική συσσώρευση των FOXP3+ έναντι των πληθυσμών δραστικών κυττάρων μπορεί να είναι αρκετή για να ξεπεραστεί η κυτταροτοξική λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων. Μια ποικιλία μηχανισμών πιστεύεται ότι προάγουν αυτήν την κατασταλτική λειτουργία, συμπεριλαμβανομένων

της επαφής κυττάρου-κυττάρου, του τοπικού ανταγωνισμού για αυξητικούς παράγοντες και της έκκρισης ανασταλτικών κυτοκινών. Επιπλέον, υπάρχουν αδιάσειστα στοιχεία ότι τα FOXP3+ αναστέλλουν την αποτελεσματική κυτταροτοξική δραστηριότητα των CD8+ μέσω της οδού σηματοδότησης μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-beta). Με αυτόν τον τρόπο, μια περίσσεια FOXP3+ εντός του όγκου μπορεί να αμβλύνει τους μηχανισμούς δράσης του ξενιστή, επιτρέποντας την εξέλιξη του καρκίνου [Chen B. et al (2020)].

Βασιζόμενοι σε όλα τα προηγούμενα αποτελέσματα ότι τα αυξημένα επίπεδα συγκεκριμένων υποτύπων TILs συσχετίζονται σημαντικά με την πρόγνωση σε διάφορους τύπους καρκίνου και την επιβίωση των ασθενών μετά τη θεραπεία με χειρουργική επέμβαση εκτομής, την ανοσοθεραπεία καθώς και τη χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία τον πιο συχνών καρκίνων, θεωρούμε ιδιαίτερα σημαντική την περαιτέρω μελέτη του ανοσιακού μικροπεριβάλλοντος των διαφόρων καρκίνων. Σίγουρα, η εστίαση στους υποπληθυσμούς των TILs, στους ρόλους και τις αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ τους όσο και με τα καρκινικά κύτταρα, σε ακόμα μεγαλύτερα δείγματα ασθενών θα βοηθήσει στη βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών δράσης της ανοσιακής απόκρισης και συγκεκριμένα των TILs στους όγκους και μπορεί να οδηγήσει σε νέες, πιο αποτελεσματικές ανοσολογικές θεραπείες με ικανότητα στόχευσης του εκάστοτε καρκίνου, στην καλύτερη επιλογή ασθενών με ευνοϊκότερη πρόγνωση, την παρακολούθηση της υποτροπής ή της μετάστασης στο μέλλον, επιλογή θεραπείας, στην αξιοποίησή τους ως προγνωστικούς βιοδείκτες και την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Ακόμα, μια τυποποιημένη μεθοδολογία για την αξιολόγηση των TILs είναι πλέον απαραίτητη ως προϋπόθεση για την ενσωμάτωση αυτής της παραμέτρου στην τυπική ιστοπαθολογική πρακτική, σε ερευνητικό περιβάλλον καθώς και σε κλινικές δοκιμές. Για τον καρκίνο του μαστού, υπάρχει ένα διεθνές πρότυπο βαθμολογίας TIL (TIL scoring), το οποίο ορίστηκε από τη Διεθνή Ομάδα Εργασίας TILs του 2014, ωστόσο δεν ισχύει το ίδιο για άλλους τύπους όπως είναι ο καρκίνος του στομάχου και άλλων τύπων. Η κατά γενική συναίνεση άποψη της Διεθνούς Ομάδας Εργασίας TILs είναι ότι τα TIL μπορεί να παρέχουν περισσότερες σχετικές βιολογικές πληροφορίες όταν βαθμολογούνται ως συνεχής μεταβλητή, καθώς αυτό θα επιτρέψει πιο ακριβείς στατιστικές αναλύσεις [Salgado R. et al. (2014)].

Επίσης, προτείνουμε τη συστηματικότερη μελέτη της πιθανότητας προσθήκης κριτηρίων που σχετίζονται με ανοσολογικούς δείκτες στην ταξινόμηση AJCC TNM

και την εφαρμογή των αποτελεσμάτων στους διάφορους τύπους καρκίνου, καθώς φάνηκε από πληθώρα μελετών ότι το σύστημα βαθμολόγησης TNM δεν μπορεί να αντικατοπτρίσει τις πλήρεις πληροφορίες του TME και της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι, τα TILs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικό συμπλήρωμα και ο συνδυασμός των TILs και του σταδίου TNM μπορεί να παρέχει ολοκληρωμένες προγνωστικές πληροφορίες για ασθενείς με καρκίνο, καλύτερη ταξινόμηση των ασθενών και επιλογή κατάλληλης θεραπείας. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα TILs είναι ετερογενή και διαφορετικοί υποπληθυσμοί έχουν διαφορετικές λειτουργίες, απαιτείται η ανάπτυξη ακριβών αξιολογήσεων αυτού του πολύπλοκου συστήματος. Ο μελλοντικός προσανατολισμός θα επικεντρωθεί στην κατανόηση των υποπληθυσμών TILs και της λειτουργικής τους κατάστασης ενώ τα TILs είναι ένα ιστολογικό προγνωστικό χαρακτηριστικό δυνητικής αξίας, που επί του παρόντος δεν αποτελεί μέρος της σταδιοποίησης του όγκου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Anika Niambi A-S, (2020), Advanced Hematology in Integrated Cardiovascular Chinese Medicine (Volume 3, Pages 41-46), Academic Press
2. Barbosa, A. M., Martinho, O., Nogueira, R., Campos, J., Lobo, L., Pinto, H., Longatto-Filho, A., Castro, A. G., Martins, S. F., & Torrado, E. (2021). Increased CD3⁺, CD8⁺, or FOXP3⁺ T Lymphocyte Infiltrations Are Associated with the Pathogenesis of Colorectal Cancer but Not with the Overall Survival of Patients. *Biology*, *10*(8), 808. <https://doi.org/10.3390/biology10080808>
3. Basu, A., Ramamoorthi, G., Jia, Y., Faughn, J., Wiener, D., Awshah, S., Kodumudi, K., & Czerniecki, B. J. (2019). Immunotherapy in breast cancer: Current status and future directions. *Advances in cancer research*, *143*, 295–349. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2019.03.006>
4. Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., Leek, R. D., Garcia, J. F., Harris, A. L., & Banham, A. H. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of HIGH-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *24*(34), 5373–5380. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.05.9584>
5. Bethmann, D., Feng, Z., & Fox, B. A. (2017). Immunoprofiling as a predictor of patient's response to cancer therapy-promises and challenges. *Current opinion in immunology*, *45*, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.01.005>
6. Cancer.Net (2022), <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/statistics>
7. Cancer.Net (2022), <https://www.cancer.net/cancer-types/stomach-cancer/statistics>
8. Chen, B., Li, H., Liu, C., Xiang, X., Wang, S., Wu, A., Shen, Y., & Li, G. (2020). Prognostic value of the common tumour-infiltrating lymphocyte subtypes for patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *PloS one*, *15*(11), e0242173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242173>
9. De Boo, L., Cimino-Mathews, A., Lubeck, Y., Daletzakis, A., Opdam, M., Sanders, J., Hooijberg, E., van Rossum, A., Loncova, Z., Rieder, D., Trajanoski, Z., Vollebergh, M., Sobral-Leite, M., van de Vijver, K., Broeks, A., van der Wiel, R., van Tinteren, H., Linn, S., Horlings, H. M., & Kok, M. (2020). Tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) and BRCA-like status in stage III breast cancer patients randomised to adjuvant intensified platinum-based chemotherapy versus conventional chemotherapy. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, *127*, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.12.003>

10. Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B. M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., von Törne, C., Weichert, W., Engels, K., Solbach, C., Schrader, I., Dietel, M., & von Minckwitz, G. (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(1), 105–113. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.7370>
11. Dyba, T., Randi, G., Bray, F., Martos, C., Giusti, F., Nicholson, N., Gavin, A., Flego, M., Neamtiu, L., Dimitrova, N., Negrão Carvalho, R., Ferlay, J., & Bettio, M. (2021). The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 157, 308–347. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.07.039>
12. Encyclopedia Britannica (2022), <https://www.britannica.com/science/lymphocyte>
13. Fumet, J. D., Richard, C., Ledys, F., Klopfenstein, Q., Joubert, P., Routy, B., Truntzer, C., Gagné, A., Hamel, M. A., Guimaraes, C. F., Coudert, B., Arnould, L., Favier, L., Lagrange, A., Ladoire, S., Saintigny, P., Ortiz-Cuaran, S., Perol, M., Foucher, P., Hofman, P., ... Ghiringhelli, F. (2018). Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy. *British journal of cancer*, 119(8), 950–960. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0220-9>
14. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., & Pagès, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5795), 1960–1964. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>
15. Gao, Z. H., Li, C. X., Liu, M., & Jiang, J. Y. (2020). Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. *BMC cancer*, 20(1), 1150. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07654-y>
16. Gataa, I., Mezquita, L., Rossoni, C., Auclin, E., Kossai, M., Aboubakar, F., Le Moulec, S., Massé, J., Masson, M., Radosevic-Robin, N., Alemany, P., Rouanne, M., Bluthgen, V., Hendriks, L., Caramella, C., Gazzah, A., Planchard, D., Pignon, J. P., Besse, B., & Adam, J. (2021). Tumour-infiltrating lymphocyte density is

- associated with favourable outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with immunotherapy. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 145, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.10.017>
17. Geng Y, Shao Y, He W, Hu W, Xu Y, Chen J, Wu C, Jiang J: Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Cancer: a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem* 2015; 37:1560-1571. doi: 10.1159/000438523
 18. Gentles, A. J., Newman, A. M., Liu, C. L., Bratman, S. V., Feng, W., Kim, D., Nair, V. S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C. D., Diehn, M., West, R. B., Plevritis, S. K., & Alizadeh, A. A. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature medicine*, 21(8), 938–945. <https://doi.org/10.1038/nm.3909>
 19. Global Cancer Observatory (2022), *World Cancer Research Fund International*, <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/>
 20. He, Y., Yu, H., Rozeboom, L., Rivard, C. J., Ellison, K., Dziadziuszko, R., Suda, K., Ren, S., Wu, C., Hou, L., Zhou, C., & Hirsch, F. R. (2017). LAG-3 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Relationship with PD-1/PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 12(5), 814–823. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.01.019>
 21. Hida, A. I., Sagara, Y., Yotsumoto, D., Kanemitsu, S., Kawano, J., Baba, S., Rai, Y., Oshiro, Y., Aogi, K., Sagara, Y., & Ohi, Y. (2016). Prognostic and predictive impacts of tumor-infiltrating lymphocytes differ between Triple-negative and HER2-positive breast cancers treated with standard systemic therapies. *Breast cancer research and treatment*, 158(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3848-2>
 22. Hormone Therapy for Prostate Cancer, Prostate Cancer Foundation, <https://www.pcf.org/about-prostate-cancer/prostate-cancer-treatment/hormone-therapy-prostate-cancer/>
 23. Huh, J. W., Lee, J. H., & Kim, H. R. (2012). Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with colorectal cancer. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, 147(4), 366–372. <https://doi.org/10.1001/archsurg.2012.35>
 24. Hussein, M. R., & Hassan, H. I. (2006). Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and

- infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. *Journal of clinical pathology*, 59(9), 972–977. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.031252>
25. Jylardistos P. (2019). Study of the immune microenvironment in colorectal cancer
 26. Kazemi, M. H., Sadri, M., Najafi, A., Rahimi, A., Baghernejadan, Z., Khorramdelazad, H., & Falak, R. (2022). Tumor-infiltrating lymphocytes for treatment of solid tumors: It takes two to tango? *Frontiers in immunology*, 13, 1018962. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1018962>
 27. Kolberg-Liedtke, C., Feuerhake, F., Garke, M., Christgen, M., Kates, R., Grischke, E. M., Forstbauer, H., Braun, M., Warm, M., Hackmann, J., Uleer, C., Aktas, B., Schumacher, C., Kuemmel, S., Wuerstlein, R., Graeser, M., Nitz, U., Kreipe, H., Gluz, O., & Harbeck, N. (2022). Impact of stromal tumor-infiltrating lymphocytes (sTILs) on response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative early breast cancer in the WSG-ADAPT TN trial. *Breast cancer research: BCR*, 24(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13058-022-01552-w>
 28. Kow A. W. C. (2019). Hepatic metastasis from colorectal cancer. *Journal of gastrointestinal oncology*, 10(6), 1274–1298. <https://doi.org/10.21037/jgo.2019.08.06>
 29. Laheurte, C., Dosset, M., Vernerey, D., Boullerot, L., Gaugler, B., Gravelin, E., Kaulek, V., Jacquin, M., Cuche, L., Eberst, G., Jacoulet, P., Fabre, E., Le Pimpec-Barthes, F., Tartour, E., De Carvalho Bittencourt, M., Westeel, V., & Adotévi, O. (2019). Distinct prognostic value of circulating anti-telomerase CD4⁺ Th1 immunity and exhausted PD-1⁺/TIM-3⁺ T cells in lung cancer. *British journal of cancer*, 121(5), 405–416. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0531-5>
 30. Lee, H. E., Chae, S. W., Lee, Y. J., Kim, M. A., Lee, H. S., Lee, B. L., & Kim, W. H. (2008). Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *British journal of cancer*, 99(10), 1704–1711. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604738>
 31. Lee, J. S., Won, H. S., Sun, S., Hong, J. H., & Ko, Y. H. (2018). Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 97(32), e11769. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011769>
 32. Liu, J., Geng, X., Hou, J. *et al.* New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. *Cancer Cell Int* 21, 389 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02089-2>

33. Liu, S., Lachapelle, J., Leung, S., Gao, D., Foulkes, W. D., & Nielsen, T. O. (2012). CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast cancer research: BCR*, *14*(2), R48. <https://doi.org/10.1186/bcr3148>
34. Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eeno, F., Rouas, G., Francis, P., Crown, J. P., Hitre, E., de Azambuja, E., Quinaux, E., Di Leo, A., Michiels, S., Piccart, M. J., & Sotiriou, C. (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *31*(7), 860–867. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.0902>
35. Lu, J., Xu, Y., Wu, Y., Huang, X. Y., Xie, J. W., Wang, J. B., Lin, J. X., Li, P., Zheng, C. H., Huang, A. M., & Huang, C. M. (2019). Tumor-infiltrating CD8+ T cells combined with tumor-associated CD68+ macrophages predict postoperative prognosis and adjuvant chemotherapy benefit in resected gastric cancer. *BMC cancer*, *19*(1), 920. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6089-z>
36. Markowski, A. R., Markowska, A. J., Ustymowicz, W., Pryczynicz, A., & Guzińska-Ustymowicz, K. (2022). Simultaneous analysis of tumor-infiltrating immune cells density, tumor budding status, and presence of lymphoid follicles in CRC tissue. *Scientific reports*, *12*(1), 21732. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26225-8>
37. Morris, M., Platell, C., & Iacopetta, B. (2008). Tumor-infiltrating lymphocytes and perforation in colon cancer predict positive response to 5-fluorouracil chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(5), 1413–1417. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1994>
38. Nardone, V., Botta, C., Caraglia, M., Martino, E. C., Ambrosio, M. R., Carfagno, T., Tini, P., Semeraro, L., Misso, G., Grimaldi, A., Boccellino, M., Facchini, G., Berretta, M., Vischi, G., Rocca, B. J., Barone, A., Tassone, P., Tagliaferri, P., Del Vecchio, M. T., Pirtoli, L., ... Correale, P. (2016). Tumor infiltrating T lymphocytes expressing FOXP3, CCR7 or PD-1 predict the outcome of prostate cancer patients subjected to salvage radiotherapy after biochemical relapse. *Cancer biology & therapy*, *17*(11), 1213–1220. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1235666>

39. National Breast Cancer Foundation (2020), <https://www.nationalbreastcancer.org/types-of-breast-cancer/>
40. National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor-infiltrating-lymphocyte>
41. Nelson, A., Lukacs, J. D., & Johnston, B. (2021). The Current Landscape of NKT Cell Immunotherapy and the Hills Ahead. *Cancers*, *13*(20), 5174. <https://doi.org/10.3390/cancers13205174>
42. Ness, N., Andersen, S., Valkov, A., Nordby, Y., Donnem, T., Al-Saad, S., Busund, L. T., Bremnes, R. M., & Richardsen, E. (2014). Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer. *The Prostate*, *74*(14), 1452–1461. <https://doi.org/10.1002/pros.22862>
43. O'Callaghan, D. S., Rexhepaj, E., Gately, K., Coate, L., Delaney, D., O'Donnell, D. M., Kay, E., O'Connell, F., Gallagher, W. M., & O'Byrne, K. J. (2015). Tumour islet FOXP3+ T-cell infiltration predicts poor outcome in nonsmall cell lung cancer. *The European respiratory journal*, *46*(6), 1762–1772. <https://doi.org/10.1183/13993003.00176-2014>
44. Okcu, O., Öztürk, S. D., Öztürk, Ç., Şen, B., Yasin, A. İ., & Bedir, R. (2022). Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs)/volume and prognosis: The value of TILs for survival in HER2 and TN breast cancer patients treated with chemotherapy. *Annals of diagnostic pathology*, *58*, 151930. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2022.151930>
45. Pan, Y., Yu, Y., Wang, X., & Zhang, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in immunology*, *11*, 583084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>
46. Petersen, R. P., Campa, M. J., Sperlazza, J., Conlon, D., Joshi, M. B., Harpole, D. H., Jr, & Patz, E. F., Jr (2006). Tumor infiltrating FOXP3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*, *107*(12), 2866–2872. <https://doi.org/10.1002/cncr.22282>
47. Prall, F., Dührkop, T., Weirich, V., Ostwald, C., Lenz, P., Nizze, H., & Barten, M. (2004). Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Human pathology*, *35*(7), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.01.022>
48. Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F. L., Penault-Llorca, F., Perez, E. A.,

- Thompson, E. A., Symmans, W. F., Richardson, A. L., Brock, J., Criscitiello, C., Bailey, H., Ignatiadis, M., Floris, G., Sparano, J., ... International TILs Working Group 2014 (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(2), 259–271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>
49. Sasaki, A., Nakamura, Y., Togashi, Y., Kuno, H., Hojo, H., Kageyama, S., Nakamura, N., Takashima, K., Kadota, T., Yoda, Y., Mishima, S., Sawada, K., Kotani, D., Kawazoe, A., Kuboki, Y., Taniguchi, H., Kojima, T., Doi, T., Yoshino, T., Yano, T., ... Shitara, K. (2020). Enhanced tumor response to radiotherapy after PD-1 blockade in metastatic gastric cancer. *Gastric cancer: official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 23(5), 893–903. <https://doi.org/10.1007/s10120-020-01058-4>
50. Schreiber, S., Hammers, C. M., Kaasch, A. J., Schraven, B., Dudeck, A., & Kahlfuss, S. (2021). Metabolic Interdependency of Th2 Cell-Mediated Type 2 Immunity and the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*, 12, 632581. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.632581>
51. Scolyer R.A and Busam K.J, Pathology of Melanocytic Tumors (2019), pages 386-396
52. Shen, Z., Zhou, S., Wang, Y. *et al.* Higher intratumoral infiltrated FOXP3+ Treg numbers and FOXP3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**, 1585–1595 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0816-9>
53. Shigemori, T., Toiyama, Y., Okugawa, Y., Yamamoto, A., Yin, C., Narumi, A., Ichikawa, T., Ide, S., Shimura, T., Fujikawa, H., Yasuda, H., Hiro, J., Yoshiyama, S., Ohi, M., Araki, T., & Kusunoki, M. (2019). Soluble PD-L1 Expression in Circulation as a Predictive Marker for Recurrence and Prognosis in Gastric Cancer: Direct Comparison of the Clinical Burden Between Tissue and Serum PD-L1 Expression. *Annals of surgical oncology*, 26(3), 876–883. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-07112-x>
54. Sorrentino, C., Musiani, P., Pompa, P., Cipollone, G., & Di Carlo, E. (2011). Androgen deprivation boosts prostatic infiltration of cytotoxic and regulatory T lymphocytes and has no effect on disease-free survival in prostate cancer

- patients. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(6), 1571–1581. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2804>
55. Stanton, S. E., & Disis, M. L. (2016). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Journal for immunotherapy of cancer*, 4, 59. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0165-6>
56. Takada, K., Kashiwagi, S., Asano, Y. *et al.* Prediction of distant metastatic recurrence by tumor-infiltrating lymphocytes in hormone receptor-positive breast cancer. *BMC Women's Health* 21, 225 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12905-021-01373-7>
57. Teng, F., Meng, X., Wang, X., Yuan, J., Liu, S., Mu, D., Zhu, H., Kong, L., & Yu, J. (2016). Expressions of CD8+TILs, PD-L1 and FOXP3+TILs in stage I NSCLC guiding adjuvant chemotherapy decisions. *Oncotarget*, 7(39), 64318–64329. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11793>
58. Thompson, E., Taube, J. M., Elwood, H., Sharma, R., Meeker, A., Warzecha, H. N., Argani, P., Cimino-Mathews, A., & Emens, L. A. (2016). The immune microenvironment of breast ductal carcinoma in situ. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 29(3), 249–258. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.158>
59. Tian, C., Jing, H., Wang, C., Wang, W., Cui, Y., Chen, J., & Sha, D. (2021). Prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes assessed by H&E-stained section in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*, 11(1), e044163. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-044163>
60. Tian, C., Lu, S., Fan, Q., Zhang, W., Jiao, S., Zhao, X., Wu, Z., Sun, L., & Wang, L. (2015). Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8⁺ or CD3⁺ T lymphocytes and interleukin-2 expression in radically resected non-small cell lung cancer. *Chinese medical journal*, 128(1), 105–110. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.147828>
61. Uryvaev, A., Passhak, M., Hershkovits, D., Sabo, E., & Bar-Sela, G. (2018). The role of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as a predictive biomarker of response to anti-PD1 therapy in patients with metastatic non-small cell lung cancer or metastatic melanoma. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 35(3), 25. <https://doi.org/10.1007/s12032-018-1080-0>

62. Vicier C, Werner L, Huang Y, et al. Immune infiltrate with CD8 LOW or PD-L1 HIGH associated with metastatic prostate cancer after radical prostatectomy (RP). *J Clin Oncol*. 2019; 37:86
63. Wang, E., Shibutani, M., Nagahara, H., Fukuoka, T., Iseki, Y., Okazaki, Y., Kashiwagi, S., Tanaka, H., & Maeda, K. (2021). Prognostic value of the density of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer liver metastases. *Oncology letters*, 22(6), 837. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13098>
64. Wang, S., Sun, J., Chen, K. *et al.* Perspectives of tumor-infiltrating lymphocyte treatment in solid tumors. *BMC Med* **19**, 140 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02006-4>
65. Xing, X., Shi, J., Jia, Y., Dou, Y., Li, Z., Dong, B., Guo, T., Cheng, X., Li, X., Du, H., Hu, Y., Jia, S., Zhang, J., Li, Z., & Ji, J. (2022). Effect of neoadjuvant chemotherapy on the immune microenvironment in gastric cancer as determined by multiplex immunofluorescence and T cell receptor repertoire analysis. *Journal for immunotherapy of cancer*, 10(3), e003984. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003984>
66. Yang, Y., Attwood, K., Bshara, W., Mohler, J. L., Guru, K., Xu, B., Kalinski, P., & Chatta, G. (2021). HIGH intratumoral CD8⁺ T-cell infiltration is associated with improved survival in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *The Prostate*, 81(1), 20–28. <https://doi.org/10.1002/pros.24068>
67. Yu, W., Wang, S., Rong, Q., Ajayi, O. E., Hu, K., & Wu, Q. (2022). Profiling the Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Gastric Cancer Reveals Its Implication in the Prognosis. *Genes*, 13(6), 1017. <https://doi.org/10.3390/genes13061017>
68. Yunger, S., Bar El, A., Zeltzer, L. A., Fridman, E., Raviv, G., Laufer, M., Schachter, J., Markel, G., Itzhaki, O., & Besser, M. J. (2019). Tumor-infiltrating lymphocytes from human prostate tumors reveal anti-tumor reactivity and potential for adoptive cell therapy. *Oncoimmunology*, 8(12), e1672494. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1672494>
69. Zhang, D., He, W., Wu, C., Tan, Y., He, Y., Xu, B., Chen, L., Li, Q., & Jiang, J. (2019). Scoring System for Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Its Prognostic Value for Gastric Cancer. *Frontiers in immunology*, 10, 71. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00071>

70. Zhang, Y., Campbell, B. K., Styli, S. S., Corcoran, N. M., & Hovens, C. M. (2022). The Prostate Cancer Immune Microenvironment, Biomarkers and Therapeutic Intervention. *Uro*, 2(2), 74–92. <https://doi.org/10.3390/uro2020010>