

DOI: 10.18027/2224-5057-2022-12-3s1-3-8

Цитирование: Ковалева О. В., Подлесная П. А., Петренко А. А., Грачев А. Н. Состав и фенотип опухолевой стромы как маркер прогноза заболевания. Злокачественные опухоли 2022 ; #3s1 : 3–8.

СОСТАВ И ФЕНОТИП ОПУХОЛЕВОЙ СТРОМЫ КАК МАРКЕР ПРОГНОЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ

О.В. Ковалева, П.А. Подлесная, А.А. Петренко, А.Н. Грачев

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Для корреспонденции: ovkovaleva@gmail.com

Резюме: Рассматривая микроокружение опухоли, исследователи отмечают большое количество типов клеток, его составляющих. Изучаются различные типы клеток, начиная от стромальных фибробластов и клеток иммунной системы, заканчивая эндотелиальными клетками и адипоцитами. Однако, несмотря на большое количество исследований, использование не стандартизированных маркеров стромальных клеток и подходов в оценке прогноза заболевания до сих пор не привели к их использованию в рутинной клинической практике. Для многих солидных опухолей неотъемлемой составляющей опухолевой стромы является резидентный микробиом, способный в значительной степени повлиять на характер активации иммунокомпетентных клеток микроокружения и анализ состава которого, на сегодняшний день также предлагается использовать в качестве прогностического маркера. В настоящем обзоре литературы проанализирована информация по микробиому и клеточному составу и фенотипу иммунологической составляющей опухолевой стромы новообразований легкого, механизмам их взаимодействия и влиянию этого взаимодействия на прогрессию опухоли. А также изучена возможность их использования для оценки прогноза заболевания и в качестве мишеней для терапии.

Ключевые слова: микробиом, строма, опухоль, прогноз

ВВЕДЕНИЕ

Состав микроокружения солидной опухоли во многом зависит от ее типа, но обычно включает в себя иммунные клетки, стромальные клетки, кровеносные сосуды и внеклеточный матрикс. Так, фибробласты, ассоциированные с опухолью, реорганизуют окружающий матрикс, создавая пути миграции для распространения опухолевых клеток. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, являются одной из основных частей опухолевого инфильтрата и обладают рост-стимулирующими и иммуносупрессорными функциями, а Т-клетки опухоли способствуют ее ускользанию от иммунного ответа. В опухолях НМРЛ, как и в большинстве других типов солидных опухолей, воспалительный инфильтрат играет немаловажную роль в развитии и прогрессии заболевания. С одной стороны, он может и должен участвовать в противоопухолевом иммунном ответе, но часто наблюдается обратная ситуация, и иммунокомпетентные клетки опухолевой стромы совместно с опухолевыми подавляют иммунный ответ и способствуют росту опухоли.

Макрофаги

Макрофаги являются основными клетками системы врожденного иммунитета. Макрофаги присутствуют

во многих тканях человеческого организма и могут адаптировать свой фенотип к изменяющемуся микроокружению [1, 2]. Подобно дихотомии Т-клеток, в процессе которой происходит их разделение на Th1 и Th2 в зависимости от производимых ими цитокинов (INF- γ и IL-4 соответственно), описана дихотомия макрофагов, в соответствии с которой выделяют классически активированные макрофаги M1, и альтернативно активированные макрофаги M2 [3, 4]. Эти два фенотипа соответствуют экстремальным состояниям макрофагов, изменяющихся в процессе регуляции воспаления.

К макрофагам первого типа активации относятся макрофаги, развивающиеся при стимуляции провоспалительными цитокинами, например INF- γ или бактериальными продуктами, такими как, например, LPS. К макрофагам второго типа активации относятся макрофаги, развивающиеся в результате воздействия Th2 ассоциированных цитокинов IL-4, IL-13, IL-10; трансформирующего фактора роста бета и противовоспалительных факторов, таких как глюкокортикоиды и ретиноиды [5]. Многочисленные клинические исследования показывают ассоциацию повышенной плотности M2 макрофагов внутри опухоли с неблагоприятным прогнозом при многих солидных опухолях. Для некоторых типов опухолей, например для рака легкого, показано, что большую прогностическую ценность имеет соотношение M1/M2 фенотипов, а также их лока-

лизация [6]. Для выявления макрофагов в опухоли, в частности, при оценке клеточного состава опухолевого микроокружения широко используется общий макрофагальный маркер CD68 [7]. Высокое содержание CD68+ макрофагов в опухоли часто ассоциировано с сильной васкуляризацией и метастазированием, а также со снижением общей выживаемости, например, при раке молочной железы [8]. Следует отметить, что для тех типов опухолей, в которых большое количество макрофагов, ассоциированных с опухолью является индикатором плохого прогноза, так же на плохой прогноз указывает повышенная экспрессия макрофагальных ростовых факторов и хемокинов.

Одним из маркеров M2-макрофагов является рецептор CD163. Он принимает участие в иммунных и гомеостатических процессах и способствует ограничению продукции провоспалительных цитокинов и дифференцировке макрофагов в направлении M2. Традиционно количество CD163+ макрофагов ассоциируется с плохим прогнозом для пациентов с НМРЛ [9–13]. Также показано, что высокая экспрессия CD163 в клетках стромы у пациентов с НМРЛ достоверно коррелировала со снижением общей и безрецидивной выживаемости [11].

Лимфоциты

T-лимфоциты играют важную роль в адаптивном иммунном ответе, и их способность распознавать широкий набор антигенов необходима для поддержания нормального гомеостаза. Однако, роль T-клеток в противоопухолевом иммунитете остается довольно сложной для изучения ввиду ее многогранности. Процесс ухода от иммунного ответа достигается как наличием дисфункциональных антигенпрезентирующих клеток, включая дендритные клетки и макрофаги, так и повышенной экспрессией ингибирующих молекул B7 aberrантными стромальными или опухолевыми клетками [14]. Также важным механизмом ухода от иммунологического надзора является перепрограммирование T-клеток в иммуносупрессорный фенотип (Treg), которые индуцируют выработку IL-6 и IL-10 макрофагами, что приводит, в частности, к повышенной экспрессии B7-H4 посредством аутокринных и паракринных механизмов [15]. Hurkmans et. al. продемонстрировали, что высокое содержание CD8+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) является потенциальным прогностически благоприятным маркером пациентов с НМРЛ, получающих ниволумаб [16]. Emens et al. показали, что у пациентов с тройным негативным раком молочной железы с высоким уровнем CD8+ TILs до начала терапии атезолизумабом наблюдались более высокие показатели выживаемости [17]. Одной из популяций TILs в опухоли являются регуляторные T-клетки (Treg), одним из основных факторов развития которых является транскрипционный фактор FoxP3 [18–20]. Первоначально Tregs были определены как иммуносупрессивные CD4+ T-клетки, экспрессирующие на своей поверхности α -субъединицу рецептора интерлейкина-2 (CD25) [21]. В настоящее время ядерная

экспрессия FoxP3 считается наиболее специфичным маркером этого типа клеток [22]. FoxP3 признан маркером активности Treg в экспериментальных моделях, и данный тип клеток обладают способностью активно ингибировать CD4+, CD8+, дендритные клетки (DC), натуральные киллеры (NK) и B-клетки [23]. Также одним из маркеров Treg является CTLA-4, который взаимодействует с IL-10 и TGF- β , особенно в контексте прогрессии онкологических заболеваний. Tregs рекрутируются в опухоль с помощью цитокинов, в первую очередь CCL22. Также показано, что Treg-клетки увеличивают продукцию VEGF и промотируют ангиогенез [24].

Прогностическая значимость FoxP3+ клеток, инфильтрирующих различные типы опухолей, в литературе в большинстве своем определена и описана. Большинство исследователей склоняются к тому, что большое количество регуляторных T-клеток является неблагоприятным прогностическим фактором [25, 26]. Однако для некоторых типов опухолей, например для рака пищевода и колоректального рака (КРР), большое количество FoxP3+ Tregs в опухоли может быть маркером хорошего прогноза [27].

Еще одной популяцией лимфоцитов в опухоли являются B-клетки. В некоторых типах опухолей B-клетки составляют до 25% от общего числа стромальных клеток. Более того, при раке молочной железы B-клетки могут составлять до 40% от общего числа стромальных клеток [28]. CD20 является трансмембранным белком, который экспрессируется на поверхности B-клеток предшественников и зрелых B-клеток, что позволяет его использовать в различных клинических исследованиях в качестве общего B-клеточного маркера. Вклад влияния B-клеток в развитие и прогрессию опухолей изучен достаточно хорошо. Например, в случае мягкотканых сарком высокий уровень содержания B-клеток в опухолях коррелировал с более длительной общей выживаемостью в независимости от гистологического типа опухолей, в то время как корреляция между содержанием T-клеток и общей выживаемостью отсутствовала [29]. Для большинства злокачественных опухолей показана прямая корреляция между содержанием B-клеток и прогнозом заболевания. А именно, высокое содержание B-клеток в строме является благоприятным прогностическим фактором для рака молочной железы [30], колоректального рака [31], НМРЛ [32], рака яичников [33] и меланомы [34].

Стромальные маркеры, экспрессируемые опухолевыми клетками

Дополнительно стоит отметить, что большой интерес для исследования и клинические перспективы имеет изучение некоторых маркеров стромальных клеток, которые экспрессируются непосредственно на опухолевых клетках. К таким молекулам можно отнести как общеизвестные PD-L1 и IDO1, ингибиторы которых используются в клинической практике или проходят испытания, так и менее известные iNOS и CHID1. Так iNOS является одним

из белков семейства NOS, регулирующих продукцию NO, экспрессия которой индуцируется воспалительными стимулами, что приводит к синтезу более высоких уровней NO в условиях хронического воспаления [35]. Ввиду наличия тесной связи между процессами хронического воспаления и развития онкологических заболеваний, роль iNOS активно исследуется в контексте канцерогенеза. Показано, что повышенная экспрессия iNOS ассоциирована с ангиогенезом, устойчивостью к химиотерапии, метастазированием и иммунной резистентностью некоторых злокачественных опухолей. Кроме того, в ряде исследований показано, что экспрессия iNOS коррелирует с неблагоприятным прогнозом заболевания [36–38], однако в целом прогностическое значения экспрессии данного белка в опухолях остается противоречивым. Для НМРЛ опубликовано два исследования, свидетельствующих о том, что экспрессия iNOS в опухолях данной локализации может служить маркером хорошего прогноза [39, 40].

Микробиом

В настоящее время все больше внимания уделяется изучению микробных сообществ, ассоциированных с онкологическими заболеваниями различных нозологий. Накапливается все больше информации о механизмах взаимодействия микроорганизмов и опухолей, путях бактериальной индукции онкологических процессов и их клиническом значении. За последнее десятилетие множество научных работ посвящены изучению роли бактерии *Helicobacter pylori* в развитие злокачественных опухолей желудка, и такую связь уже можно считать доказанной. Также множество работ посвящены исследованию вклада микробного сообщества кишечника и патогенных микроорганизмов в развитие колоректального рака и других опухолей ЖКТ. Изучение развития рака легкого под воздействием бактериальной составляющей долгое время оставалось в тени, однако сейчас обнаружены некоторые закономерности между данным видом рака и микробиомом [41]. Несмотря на то, что в литературе встречается подтверждение участия микроорганизмов в развитии онкологических заболеваний легких, механизмы такого взаимодействия изучены достаточно фрагментарно. Микроорганизмы могут индуцировать онкогенез посредством выработки бактериальных токсинов или других агентов, а также вызывать хронические воспалительные процессы, что, в свою очередь, часто является фактором, способствующим развитию заболеваний.

Опираясь на результаты, полученные рядом исследовательских групп при помощи высокопроизводительного секвенирования, можно сделать вывод о том, что микробиом легких филогенетически разнообразен [42, 43]. В качестве примера микроорганизмов, которые преобладают в легких здоровых людей, можно выделить тип *Bacteroidetes* и таких его представителей, как *Prevotella* и *Veillonella spp* [43]. Также характерными представителями микробиома нижних отделов дыхательных путей являются *Pseudomonas*,

Streptococcus, *Fusobacterium*, *Megasphaera*, *Sphingomonas* [43, 44].

В легких в значительном числе случаев воспаление вызвано определенными патогенными и условно патогенными микроорганизмами. Так, показано, что опухолевые процессы в легких связаны и могут индуцироваться такими микроорганизмами, как *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter spp.*, *E. coli*, *Pneumococcus* [45]. Также, в образцах тканей опухоли легкого по сравнению с условно нормальной тканью наблюдается повышенное содержание представителей *Granulicatella*, *Abiotrophia*, *Streptococcus* [46]. При онкологических заболеваниях в легких может наблюдаться развитие патогенных микроорганизмов, таких как *Legionella* [47] и *Moraxella* (i. e. *Moraxella catarrhalis*) [48, 49]. Также некоторые микроорганизмы ассоциированы с определенным гистологическим типом опухолей. Представители родов *Acidovorax*, *Klebsiella*, *Rhodofera*, *Comamonas*, и *Polaromonas* обнаруживаются в большинстве случаев плоскоклеточного рака легкого и не характерны для аденокарцином. Примечательно, что фактор курения существенно сказывается на развитии данных микроорганизмов в легких [50].

Среди прочих перспективных биомаркеров, присутствие которых связано с онкологическими процессами — представители родов *Capnocytophaga*, *Selenomonas*, *Veillonella* и *Neisseria*. В работе Yan и др. показано, что повышенное содержание вышеупомянутых представителей микробиома характерно как для плоскоклеточного рака легкого, так и для аденокарциномы [51]. Другие исследователи показали, что составы микробных сообществ пациентов с раком легкого при наличии эмфиземы или без нее характеризовались значительно более низким содержанием протеобактерий (первичных родов *Acinetobacter* и *Acidovorax*) и более высокой распространенностью *Firmicutes* (*Streptococcus*) и *Bacteroidetes* (*Prevotella*) по сравнению с пациентами, страдающими только эмфиземой. Эти данные по мнению авторов также свидетельствуют о прикладной диагностической значимости анализа микробиома легкого [52].

Комплексный анализ микробиома и воспалительного инфильтрата опухолей

В последние годы большинство исследователей сходятся во мнении, что для эффективной диагностики, мониторинга и прогнозирования течения заболевания перспективно использовать комбинации различных маркеров. Одной из таких перспективных комбинаций может являться комплексная морфологическая оценка стромы в совокупности и бактериальной нагрузкой. Использование комплексного анализа клеточного и бактериального состава в опухоли предложено относительно недавно [53, 54], однако набирает популярность [55–57]. В первом исследовании, посвященном данной проблеме показано, что таксономическое разнообразие микробиома и присутствие бактерий родов *Saccharopolyspora*, *Pseudoxanthomonas* и *Streptomyces* может способствовать противоопухолевому

иммунному ответу, посредством привлечения и активации CD8+ Т-клеток тем самым обеспечивая благоприятный прогноз заболевания.

Дальнейшие исследования показали, что что повышенное содержание бактерий наблюдается в группах опухолей НМРЛ с высокой экспрессией iNOS в опухолевых клетках и высоким содержанием FoxP3+ стромальных Т-клеток. В целом добавление оценки общей бактериальной нагрузки в опухоли кардинально меняет картину выживаемости пациентов. В случае повышенной экспрессии iNOS высокая бактериальная нагрузка достоверно является благоприятным прогностическим фактором, в то время как повышенная бактериальная нагрузка при большом количестве FoxP3 клеток является, наоборот, маркером плохого прогноза [54]. Для почечно-клеточного рака также показана прогностическая значимость маркеров опухолевого микроокружения, например CD66b+ нейтрофилов в зависимости от общей бактериальной нагрузки опухолей [55].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день известно, что легкие обладают уникальным составом резидентных микроорганизмов, независимо от популяционных и географических особенностей. Также, стоит отметить, что спектр условно-патогенных микроорганизмов, активность которых возрастает существенным образом при развитии в легких онкологических заболеваний, достаточно широк, и этот список ежегодно пополняется новыми видами. Все это создает предпосылки для дальнейшего изучения состава микробиома легких и его значения при развитии опухолей. Это крайне интересная и трудоемкая задача, требующая использования различных методических подходов для получения достоверных результатов. Механизмы взаимовлияния бактерий и опухолевых клеток частично изучены, однако все полученные данные фрагментарны и узкоспецифичны. Понимание общих механизмов влияния бактерий не только на возникновение, но и на прогрессирование опухолей и ответа их на терапию, несомненно приведет к практическому применению комплекса маркеров, как клеточного, так и бактериального происхождения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00291, <https://rscf.ru/project/22-15-00291>.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stout R. D., Suttles J. Functional plasticity [of] macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 2004 ; 76 (3) : 509–13.
2. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Kothe K., Muller-Molinet I., Kanno K., Utikal J., Goerdts S. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology.* 2006 ; 211 (6–8) : 473–86. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.05.017>.
3. Locati M., Mantovani A., Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Advances in immunology.* 2013 ; 120 : 163–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417028-5.00006-5>.
4. Gratchev A., Schledzewski K., Guillot P., Goerdts S. Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin pharmacology and applied skin physiology.* 2001 ; 14 (5) : 272–9. [https://doi.org/10.1016/S0895-9056\(01\)00057-7](https://doi.org/10.1016/S0895-9056(01)00057-7).
5. Goerdts S., Orfanos C. E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 1999 ; 10 (2) : 137–42.
6. Mei J., Xiao Z., Guo C., Pu Q., Ma L., Liu C., Lin F., Liao H., You Z., Liu L. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: A systemic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2016 ; 7 (23) : 34217–28. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9079>.
7. Holness C. L., Simmons D. L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood.* 1993 ; 81 (6) : 1607–13.
8. Leek R. D., Lewis C. E., Whitehouse R., Greenall M., Clarke J., Harris A. L. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996 ; 56 (20) : 4625–9.
9. Yang L., Wang F., Wang L., Huang L., Wang J., Zhang B., Zhang Y. CD163+ tumor-associated macrophage is a prognostic biomarker and is associated with therapeutic effect on malignant pleural effusion of lung cancer patients. *Oncotarget.* 2015 ; 6 (12) : 10592–603. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3547>.
10. Gao J., Ren Y., Guo H., Mao R., Xie H., Su H., She Y., Deng J., Yang M., Han B., et al. A new method for predicting survival in stage I non-small cell lung cancer patients: nomogram based on macrophage immunoscore, TNM stage and lymphocyte-to-monocyte ratio. *Ann Transl Med.* 2020 ; 8 (7) : 470. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.03.113>.
11. Sumitomo R., Hirai T., Fujita M., Murakami H., Otake Y., Huang C. L. M2 tumor-associated macrophages promote tumor progression in non-small-cell lung cancer. *Experimental and therapeutic medicine.* 2019 ; 18 (6) : 4490–8. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8068>.
12. Shen J., Sun X., Pan B., Cao S., Cao J., Che D., Liu F., Zhang S., Yu Y. IL-17 induces macrophages to M2-like phenotype via NF-kappaB. *Cancer Manag Res.* 2018 ; 10 : 4217–28. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S174899>.
13. Jackute J., Zemaitis M., Pranys D., Sitkauskienė B., Miliauskas S., Vaitkienė S., Sakalauskas R. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC immunology.* 2018 ; 19 (1) : 3. <https://doi.org/10.1186/s12865-018-0241-4>.
14. Antonia S. J., Extermann M., Flavell R. A. Immunologic nonresponsiveness to tumors. *Crit Rev Oncog.* 1998 ; 9 (1) : 35–41. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.v9.i1.30>.
15. He C., Qiao H., Jiang H., Sun X. The inhibitory role of b7-h4 in antitumor immunity: association with cancer progression and survival. *Clinical & developmental immunology.* 2011 ; 2011 : 695834. <https://doi.org/10.1155/2011/695834>.

16. Hurkmans D.P., Kuipers M.E., Smit J., van Marion R., Mathijssen R.H.J., Postmus P.E., Hiemstra P.S., Aerts J., von der Thusen J.H., van der Burg S.H. Tumor mutational load, CD8 (+) T cells, expression of PD-L1 and HLA class I to guide immunotherapy decisions in NSCLC patients. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. 2020; 69 (5) : 771–7. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02506-x>.
17. Emens L.A., Cruz C., Eder J.P., Braiteh F., Chung C., Tolaney S.M., Kuter I., Nanda R., Cassier P.A., Delord J.P., et al. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA Oncol*. 2019; 5 (1) : 74–82. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.4224>.
18. Schubert L.A., Jeffery E., Zhang Y., Ramsdell F., Ziegler S.F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem*. 2001; 276 (40) : 37672–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104521200>.
19. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*. 2003; 4 (4) : 330–6. <https://doi.org/10.1038/ni904>.
20. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003; 299 (5609) : 1057–61. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>.
21. Sakaguchi S., Mikami N., Wing J.B., Tanaka A., Ichiyama K., Ohkura N. Regulatory T Cells and Human Disease. *Annu Rev Immunol*. 2020; 38 : 541–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041717>.
22. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005; 6 (4) : 345–52.
23. Scotta C., Soligo M., Camperio C., Piccolella E. FOXP3 induced by CD28 / B7 interaction regulates CD25 and anergic phenotype in human CD4+ CD25- T lymphocytes. *Journal of immunology*. 2008; 181 (2) : 1025–33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1025>.
24. Facciabene A., Peng X., Hagemann I.S., Balint K., Barchetti A., Wang L.P., Gimotty P.A., Gilks C.B., Lal P., Zhang L., et al. Tumor hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T (reg) cells. *Nature*. 2011; 475 (7355) : 226–30. <https://doi.org/10.1038/nature10169>.
25. Tao H., Mimura Y., Aoe K., Kobayashi S., Yamamoto H., Matsuda E., Okabe K., Matsumoto T., Sugi K., Ueoka H. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer*. 2012; 75 (1) : 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.06.002>.
26. Shimizu K., Nakata M., Hirami Y., Yukawa T., Maeda A., Tanemoto K. Tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2010; 5 (5) : 585–90. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181d60fd7>.
27. Shang B., Liu Y., Jiang S.J., Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. 2015; 5 : 15179. <https://doi.org/10.1038/srep15179>.
28. Marsigliante S., Biscozzo L., Marra A., Nicolardi G., Leo G., Lobbreglio G.B., Storelli C. Computerised counting of tumour infiltrating lymphocytes in 90 breast cancer specimens. *Cancer letters*. 1999; 139 (1) : 33–41. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(98\)00379-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(98)00379-6).
29. Petitprez F., de Reynies A., Keung E.Z., Chen T.W., Sun C.M., Calderaro J., Jeng Y.M., Hsiao L.P., Lacroix L., Bougouin A., et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature*. 2020; 577 (7791) : 556–60. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1906-8>.
30. Mahmoud S.M., Lee A.H., Paish E.C., Macmillan R.D., Ellis I.O., Green A.R. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 132 (2) : 545–53. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1620-1>.
31. Edin S., Kaprio T., Hagstrom J., Larsson P., Mustonen H., Bockelman C., Strigard K., Gunnarsson U., Haglund C., Palmqvist R. The Prognostic Importance of CD20 (+) B lymphocytes in Colorectal Cancer and the Relation to Other Immune Cell subsets. *Scientific reports*. 2019; 9 (1) : 19997. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56441-8>.
32. Germain C., Gnjjatic S., Tamzalit F., Knockaert S., Remark R., Goc J., Lepelley A., Becht E., Katsahian S., Bizouard G., et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014; 189 (7) : 832–44. <https://doi.org/10.1164/rccm.201309-1611OC>.
33. Santoiemma P.P., Reyes C., Wang L.P., McLane M. W., Feldman M.D., Tanyi J.L., Powell D.J., Jr. Systematic evaluation of multiple immune markers reveals prognostic factors in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2016; 143 (1) : 120–7. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.07.105>.
34. Garg K., Maurer M., Griss J., Bruggen M.C., Wolf I.H., Wagner C., Willi N., Mertz K.D., Wagner S.N. Tumor-associated B cells in cutaneous primary melanoma and improved clinical outcome. *Human pathology*. 2016; 54 : 157–64. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.03.022>.
35. Nathan C., Xie Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994; 78 (6) : 915–8. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90266-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90266-6).
36. Garrido P., Shalaby A., Walsh E.M., Keane N., Webber M., Keane M.M., Sullivan F.J., Kerin M.J., Callagy G., Ryan A.E., et al. Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways. *Oncotarget*. 2017; 8 (46) : 80568–88. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19631>.
37. Chen C.N., Hsieh F.J., Cheng Y.M., Chang K.J., Lee P.H. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer. *Journal of surgical oncology*. 2006; 94 (3) : 226–33. <https://doi.org/10.1002/jso.20372>.
38. Raspollini M.R., Amunni G., Villanucci A., Boddi V., Baroni G., Taddei A., Taddei G.L. Expression of inducible nitric oxide syn-

- thase and cyclooxygenase-2 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome. *Gynecol Oncol.* 2004; 92 (3) : 806–12. <https://doi.org/10.1016/j.jygyno.2003.12.023>.
39. Puhakka A., Kinnula V., Napankangas U., Saily M., Koistinen P., Paakko P., Soini Y. High expression of nitric oxide synthases is a favorable prognostic sign in non-small cell lung carcinoma. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica.* 2003; 111 (12) : 1137–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2003.apm1111210.x>.
 40. Kovaleva O.V., Rashidova M.A., SamoiloVA D.V., Podlesnaya P.A., Tabiev R.M., Mochalnikova V.V., Gratchev A. CHD1 Is a Novel Prognostic Marker of Non-Small Cell Lung Cancer. *International journal of molecular sciences.* 2021; 22 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms22010450>.
 41. Dong Q., Chen E.S., Zhao C., Jin C. Host-Microbiome Interaction in Lung Cancer. *Front Immunol.* 2021; 12 : 679829. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.679829>.
 42. Erb-Downward J.R., Thompson D.L., Han M.K., Freeman C.M., McCloskey L., Schmidt L.A., Young V.B., Toews G.B., Curtis J.L., Sundaram B., et al. Analysis of the lung microbiome in the «healthy» smoker and in COPD. *PloS one.* 2011; 6 (2) : e16384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016384>.
 43. Hilty M., Burke C., Pedro H., Cardenas P., Bush A., Bossley C., Davies J., Ervine A., Poulter L., Pachter L., et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS one.* 2010; 5 (1) : e8578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008578>.
 44. Beck J.M., Young V.B., Huffnagle G.B. The microbiome of the lung. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine.* 2012; 160 (4) : 258–66. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.02.005>.
 45. Laroumagne S., Salinas-Pineda A., Hermant C., Murriss M., Gourraud P.A., Do C., Segonds C., Didier A., Mazieres J. [Incidence and characteristics of bronchial colonisation in patient with lung cancer: a retrospective study of 388 cases]. *Rev Mal Respir.* 2011; 28 (3) : 328–35. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2010.05.020>.
 46. Hosgood H.D., 3rd, Sapkota A.R., Rothman N., Rohan T., Hu W., Xu J., Vermeulen R., He X., White J.R., Wu G., et al. The potential role of lung microbiota in lung cancer attributed to household coal burning exposures. *Environ Mol Mutagen.* 2014; 55 (8) : 643–51. <https://doi.org/10.1002/em.21878>.
 47. Yu G., Gail M.H., Consonni D., Carugno M., Humphrys M., Pesatori A.C., Caporaso N.E., Goedert J.J., Ravel J., Landi M.T. Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features. *Genome biology.* 2016; 17 (1) : 163. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1021-1>.
 48. Wong J.L., Evans S.E. Bacterial Pneumonia in Patients with Cancer: Novel Risk Factors and Management. *Clin Chest Med.* 2017; 38 (2) : 263–77. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.12.005>.
 49. Liu H.X., Tao L.L., Zhang J., Zhu Y.G., Zheng Y., Liu D., Zhou M., Ke H., Shi M.M., Qu J.M. Difference of lower airway microbiome in bilateral protected specimen brush between lung cancer patients with unilateral lobar masses and control subjects. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2018; 142 (4) : 769–78. <https://doi.org/10.1002/ijc.31098>.
 50. Greathouse K.L., White J.R., Vargas A.J., Bliskovsky V.V., Beck J.A., von Muhlinen N., Polley E.C., Bowman E.D., Khan M.A., Robles A.I., et al. Interaction between the microbiome and TP53 in human lung cancer. *Genome biology.* 2018; 19 (1) : 123. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1501-6>.
 51. Yan X., Yang M., Liu J., Gao R., Hu J., Li J., Zhang L., Shi Y., Guo H., Cheng J., et al. Discovery and validation of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *American journal of cancer research.* 2015; 5 (10) : 3111–22.
 52. Liu Y., O'Brien J.L., Ajami N.J., Scheurer M.E., Amirian E.S., Armstrong G., Tsavachidis S., Thrift A.P., Jiao L., Wong M.C., et al. Lung tissue microbial profile in lung cancer is distinct from emphysema. *American journal of cancer research.* 2018; 8 (9) : 1775–87.
 53. Riquelme E., Zhang Y., Zhang L., Montiel M., Zoltan M., Dong W., Quesada P., Sahin I., Chandra V., San Lucas A., et al. Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes. *Cell.* 2019; 178 (4) : 795–806 e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.008>.
 54. Kovaleva O., Podlesnaya P., Rashidova M., SamoiloVA D., Petrenko A., Zborovskaya I., Mochalnikova V., Kataev V., Khlopko Y., Plotnikov A., et al. Lung Microbiome Differentially Impacts Survival of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Depending on Tumor Stroma Phenotype. *Biomedicines.* 2020; 8 (9). <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090349>.
 55. Kovaleva O.V., Podlesnaya P., Sorokin M., Mochalnikova V., Kataev V., Khlopko Y.A., Plotnikov A.O., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E., Gratchev A. Macrophage Phenotype in Combination with Tumor Microbiome Composition Predicts RCC Patients' Survival: A Pilot Study. *Biomedicines.* 2022; 10 (7). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071516>.
 56. Kovaleva O., Podlesnaya P., Rashidova M., SamoiloVA D., Petrenko A., Mochalnikova V., Kataev V., Khlopko Y., Plotnikov A., Gratchev A. Prognostic Significance of the Microbiome and Stromal Cells Phenotype in Esophagus Squamous Cell Carcinoma. *Biomedicines.* 2021; 9 (7). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070743>.
 57. Jain T., Sharma P., Are A.C., Vickers S.M., Dudeja V. New Insights Into the Cancer-Microbiome-Immune Axis: Decrypting a Decade of Discoveries. *Front Immunol.* 2021; 12 : 622064. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.622064>.