Hodnocení zánětlivé celulizace (tumor infiltrujících lymfocytů) u solidních nádorů

Evaluation of Inflammatory Cells (Tumor Infiltrating Lymphocytes) in Solid Tumors

Dundr P.[1], Němejcová K.[1], Bártů M.[1], Matěj R.[1,2], Rohan Z.[1,2], Tichá I.[1]

[1] Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze
[2] Oddělení patologie a molekulární medicíny, Thomayerova nemocnice, Praha

Souhrn

Východiska: Nádorové mikroprostředí hraje významnou roli v celém procesu tumorigeneze i vztahu mezi nádorem a hostitelem. Jeho významnou složku představuje zánětlivá celulizace, jejíž hodnocení má u solidních nádorů prognostický a zdá se, že i prediktivní význam (ten je aktuální zejména s ohledem na potenciální predikci léčby imunitními checkpoint inhibitory). Problém však představuje metodický aspekt hodnocení, který je standardizován pouze pro určité typy nádorů. ***Cíl:*** Podat přehled současné problematiky týkající se hodnocení zánětlivé celulizace (nejčastěji označované jako tzv. tumor infiltrující lymfocyty – TIL) u solidních nádorů, konkrétně u karcinomu prsu, plic, dlaždicobuněčného karcinomu v oblasti hlavy a krku, maligního mezoteliomu, nádorů gastrointestinálního traktu, ženského genitálu, urogenitálního traktu, mozku a maligního melanomu. Zmíněny jsou metodické možnosti hodnocení včetně snahy o jejich standardizaci a hodnocení významu imunofenotypizace zánětlivého infiltrátu. S ohledem na klinický dopad je diskutován prognostický a také prediktivní význam. ***Závěr:*** Hodnocení TIL má u solidních nádorů často prediktivní význam, výsledky studií však nejsou zcela jednoznačné. Nejednoznačnost panuje i s ohledem na prediktivní využití tohoto markeru. Přes veškerý metodický rozvoj umožňující využití komplikovaných technologií hodnotících nejrůznější aspekty přítomného zánětlivého infiltrátu včetně funkčních charakteristik (obrazová analýza, multiplexní fluorescenční imunohistochemie, hmotnostní spektrometrie) je snahou v této fázi vývoje vyvinout a standardizovat levnou a všeobecně dostupnou metodiku umožňující široké využití hodnocení TIL v klinické praxi. Recentně navrhovaný sjednocený postup testování shodný pro všechny solidní nádory by mohl vyřešit jednu z hlavních limitací rutinního využití TIL, která je dána právě nejednotnou metodikou.

Klíčová slova

solidní nádory – tumor infiltrující lymfocyty – zánětlivá celulizace

Práce byla realizována za podpory MZ ČR (projekt RVO-VFN 64165 a projekt AZV 16-30954A), Univerzity Karlovy (projekt Progres Q28/LF1) a OPPK (Výzkumná laboratoř nádorových onemocnění CZ.2.16/3.1.00/24509).

This work was supported by program of the Czech Ministry of Health No. RVO-VFN 64165 and AZV project No. 16-30954A, Charles University and OPPK (CZ.2.16/3.1.00/24509).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.

prof. MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.
Ústav patologie 1. LF UK
a VFN v Praze
Studničkova 2
128 00 Praha 2
e-mail: pdundr@seznam.cz

Obdrženo/Submitted: 24. 9. 2017
Přijato/Accepted: 3. 10. 2017

doi: 10.14735/amko20173S10

Summary

Background: The tumor microenvironment plays an important role in tumorigenesis and the tumor-host relationship. An important part of the tumor microenvironment is inflammatory infiltration. Its evaluation in solid tumors has prognostic meaning and appears also to be predictive of outcome, which is particularly important for predicting responses to immune checkpoint inhibitors. However, the methodology used to assess inflammatory infiltration is problematic, because it has been standardized only for certain types of tumors. ***Objective:*** The present study provides an overview of current issues related to the evaluation of inflammatory cells (tumor infiltrating lymphocytes) in solid tumors, specifically in tumors of the breast, lung, head and neck, gastrointestinal tract, female genital tract, urogenital tract, brain, malignant mesothelioma, and malignant melanoma. Various methodologies for evaluation are mentioned, including the efforts that are being made to standardize these methodologies and the importance of immunophenotyping inflammatory infiltrates. With regard to clinical meaning, prognostic and predictive significance are also discussed. ***Conclusion:*** The evaluation of TILs in solid tumors often has predictive value; however, the results have been equivocal. There is also ambiguity about the predictive use of this marker. Despite all the methodological developments, which have resulted in the implementation of complicated technologies (image analysis, multiplex fluorescence immunohistochemistry, and mass spectrometry) for the evaluation of the various aspects of inflammatory infiltrates present in tumors, including their functional characteristics, there is still a need for standardization and development of inexpensive and universally available methodologies to enable the wide use of TIL evaluations in clinical settings. The recently proposed unified methodology may be used in all solid tumors and could help resolve one of the main limitations of the routine use of TIL, i.e., the inconsistent approach to assessment.

Key words

solid tumors – tumor-infiltratig lymphocytes – inflammatory cells

Úvod

Hodnocení zánětlivé celulizace (tzv. tumor infiltrujících lymfocytů – TIL) je u některých nádorů předmětem zájmu už poměrně dlouhou dobu, v současné době však nabývá na aktuálnosti nejen s ohledem na prognostický význam, ale i potenciál využít tento marker jako prediktor odpovědi na léčbu zejména imunitními checkpoint inhibitory [1,2]. V rutinní praxi je hodnocení TIL omezeno na několik solidních nádorů – kromě maligního melanomu (malignant melanoma – MM) však není automaticky běžnou součástí bioptického vyšetření. Důvodů je hned několik, k základním problémům patří zejména: 1. Metodický aspekt – u každého typu nádoru se postupuje poněkud jiným způsobem, od pouhého hodnocení v podobě odhadu z barvení hematoxylin-eozinem (kvalitativního či semikvantitativního) až po postupy využívající softwarové hodnocení (obrazovou analýzu) a imunohistochemickou subtypizaci přítomných zánětlivých elementů. U některých nádorů je způsob hodnocení standardizován s definováním přesných postupů, jinde však způsob hodnocení určen není, což limituje interpretaci a klinické využití získaných dat. Rutinní využití limituje i dostupnost metodiky (resp. zejména v případě tzv. imunoskóre (immunoscore – IS) u kolorektálního karcinomu (colorectal cancer – CRC) její nedostupnost) a případně i její náročnost (obrazová analýza, imunohistochemické vyšetření). 2. Prognostický význam – byť i je u většiny zkoumaných nádorů tento význam v části studií prokázán, nadále nejsou výsledky zcela jednoznačné a existují i studie, které ho neprokázaly (to však může mít různé příčiny diskutované níže, včetně nejednotné metodiky hodnocení TIL). Klinický význam a reálný dopad vyšetření je v tomto ohledu problematický. 3. Prediktivní význam – tento význam nabývá na důležitosti zejména (avšak nejen) s ohledem na imunoterapii – nadále však platí, že jde o prediktor ve fázi výzkumu a pro rutinní využití v klinické praxi není v současné době validovaný.

V následujícím sdělení jsou diskutovány možnosti, limitace a současný i budoucí možný klinický význam hodnocení zánětlivé celulizace (TIL) u nejčastějších solidních nádorů.

Maligní melanom

První práce hodnotící prognostický význam přítomnosti zánětlivé celulizace u MM byla uveřejněna již v roce 1981 [3]. O něco později definoval Clark et al metodiku hodnocení přítomnosti TIL s dělením na 3 stupně – absent, non-brisk, brisk, přičemž poslední dvě kategorie lze ještě dělit na periferní (infiltrát pouze v periferii nádoru) a difuzní (infiltrát v celém rozsahu nádoru) [4]. Jedná se o způsob hodnocení, který je dosud používán nejčastěji a odkazují se na něj i všechny hlavní guidelines, podle kterých by hodnocení TIL mělo být u MM standardní součástí bioptického vyšetření (The Royal College of Pathologists (UK), The Royal College of Pathologists of Australasia, College of American Pathologists – ICCR). Metodika hodnocení podle Clarka et al vykazuje vysokou reprodukovatelnost, není však optimální. Mezi hlavní problémy patří zejména: 1. heterogenita skupiny non-brisk (zahrnující případy se zcela minimální infiltrací i případy s výraznou, nikoliv však difuzní infiltrací, která může postihovat desítky procent objemu nádoru); 2. existence kategorie periferní brisk, která zejména u velkých nádorů nezohledňuje reálný rozsah infiltrace s ohledem na procentuální vyjádření (které je u velkých nádorů malé); 3. absence hodnocení stromálních a periferních TIL.

Snaha je tedy o nalezení jiného způsobu hodnocení s vyšší výpovědní hodnotou. V posledních letech bylo uveřejněno několik studií využívajících nové semikvantitativní přístupy, které uvedené nevýhody do určité míry řeší [5–7]. Pro jejich praktické využití by však bylo nutné větší rozšíření a „naprahování" výsledků do prognosticky významných skupin.

Literární data jsou s ohledem na prognostický význam hodnocení TIL u MM nejednoznačná. Studie používající hodnocení podle Clarka et al mají rozporuplné výsledky, u většiny se prognostický význam přítomnosti TIL prokázal,

jiné však tento význam neprokázaly či jej prokázaly pouze pro určité hodnocené parametry [8,9]. Mezi tyto studie patří např. práce Burtona et al (515 pacientů), kteří prokázali prognostický význam TIL s ohledem na postižení sentinelové uzliny (sentinel lymph node – SLN), neprokázali však nezávislý význam TIL pro přežití bez příznaků (disease-free survival – DFS) a celkové přežití (overall survival – OS) [10]. Vysvětlení těchto diskrepancí je pravděpodobně multifaktoriální, zahrnuje zejména použitou metodiku hodnocení, složení souboru a v neposlední řadě i faktory zahrnuté do multivariantní analýzy. Například v již zmíněné studii Burtona et al, která neprokázala prediktivní význam TIL pro DFS a OS, sami autoři upozorňují, že tento význam by byl prokázán v případě vyloučení stavu SLN z multivariantních analýz.

Na vliv metodiky poukazuje studie Saldanha et al (655 pacientů), ve které autoři prokázali statisticky signifikantní význam přítomnosti TIL pro přežití bez metastáz (metastasis-free survival – MFS), OS a specifické přežití pro nemoc (disease-specific survival – DSS) pouze při použití jimi navrženého nového systému hodnocení [7]. Při použití metodiky podle Clarka et al bylo v jejich studii statisticky signifikantní pouze přežití bez melanomu, nikoliv však DSS a OS.

Na dosud asi největším publikovaném souboru čítajícím 1 865 případů byla prokázána korelace mezi rozsahem (grade) TIL a rizikem postižení SLN (při metodice hodnocení používané v rámci Melanoma Institute Australia s dělením na 4 stupně podle rozsahu a denzity zánětlivé infiltrace) [5]. V této studii byl také prokázán prognostický význam TIL s ohledem na OS a riziko recidivy (grade TIL byl třetí prognosticky nejsilnější faktor – za Breslowovým skóre a ulcerací – s ohledem na přežití bez recidivy onemocnění (recurrence-free survival – RFS), s ohledem na DSS se jednalo o slabší, avšak statisticky významný prognostický faktor).

Studie Parka et al, při které byla použita modifikace skórovacího systému použitého při analýze TIL u MM ze studie TCGA (The Cancer Genome Atlas), klasifikovala MM (177 pacientů) podle lymfocytárního skóre (lymphocyte score – LS) v jednotlivých kompartmentech (tumor/okolí nádoru) [6,11]. Prognostický význam s ohledem na DFS či OS se nepodařilo prokázat, pouze ve skupině akrálně lentiginózního melanomu (80 pacientů) byla přítomnost vysokého LS v obou kompartmentech spojena s delším DFS.

Z uvedeného vyplývá, že hodnocení prognostického významu TIL je u MM do určité míry diskutabilní a naráží na několik problémů, které jsou zčásti metodického rázu. Hodnocení TIL by však dle guidelines mělo být součástí každého bioptického vyšetření MM. Toto hodnocení by mělo být na pracovišti standardizované a v nálezu by měl být uveden způsob, dle kterého bylo provedeno – podle současných doporučení by se i přes uvedené limitace mělo hodnotit podle Clarka et al, nicméně uvedení skórování TIL i podle některého z alternativních semikvantitativních způsobů či navrhovaného jednotného skórovacího postupu pro solidní nádory (viz níže) může přinést dodatečné informace. Nutné jsou však další studie zaměřené na metodický aspekt a srovnání prognostického významu přítomnosti TIL a u semikvantitativních systémů jejich přesné „naprahování" se snahou o vytvoření prognosticky co nejvíce relevantních skupin.

Byť i literární údaje jsou limitované, hodnocení TIL se zdá mít u MM i prediktivní význam, v jedné práci spojený zejména s výskytem CD8+ lymfocytů v invazivním okraji v periferii nádoru a v přilehlém stromatu [12].

Kolorektální karcinom

Role tumor infiltrujících lymfocytů u CRC je předmětem intenzivního studia již více než 10 let. Jedním z nejvýznamnějších pozorování je fakt, že klinický průběh onemocnění se může signifikantně lišit i mezi pacienty s onemocněním ve stejném stadiu a hodnocení TIL se zdá být markerem, který umožňuje s ohledem na prognózu přesnější stratifikaci pacientů než TNM klasifikace [13–17].

Asi nejznámější je u CRC koncepce IS. Stanovení IS je založeno na hodnocení denzity dvou lymfocytárních populací (CD3+, CD8+ nebo CD45RO+) a její kvantifikace pomocí obrazové analýzy pro dvě přesně vymezené oblasti daného nádoru – centrum (centre – CT) a invazivní okraj (invasive margin – IM) [13]. Na základě stanovených denzit je poté vyhodnoceno celkové skóre, které sahá od IS 0 (nízká denzita obou typů lymfocytů v obou hodnocených oblastech) až po IS 4 (vysoká denzita obou typů lymfocytů v obou hodnocených oblastech).

První poznatky v této oblasti a samotnou metodiku stanovení IS publikovali Galon et al, kteří zjistili, že karcinomy s vysokou denzitou T lymfocytů vykazují nižší pravděpodobnost diseminace do lymfovaskulárních a perineurálních struktur a do regionálních lymfatických uzlin [13]. Na základě kombinovaných analýz přítomnost TIL korelovala s příznivější prognózou bez ohledu na lokální rozsah tumoru a postižení lymfatických uzlin (stadia I, II a III). Naopak, slabá lokální imunitní odpověď korelovala se špatnou prognózou – a to i v případě pacientů s minimálně invazivními nádory (stadium I). Pro nádory v časných stadiích (TNM I–II) došla k obdobným závěrům i další studie, ve které autoři demonstrovali signifikantní rozdíly v celkovém přežití a relapsu onemocnění u pacientů s rozdílnými hodnotami imunoskóre [18].

Imunoskóre je také statisticky signifikantním nezávislým kritériem pro DFS a OS, což dále podporuje předpoklad, že jeho prognostická hodnota je v porovnání se samotnou TNM klasifikací vyšší [19]. Při zkombinování imunoskóre s klasickými klinicko-patologickými parametry zůstává z hlediska DFS a OS signifikantní pouze stanovení poměru počtu pozitivních lymfatických uzlin k celkovému počtu vyšetřených uzlin [20].

Možné využití upraveného IS v rutinní praxi se ovšem netýká pouze jeho prognostického významu u resekátů, ale má význam i u diagnostických biopsií. Jedna z recentních prací prokázala infiltraci CD8+ či CD45RO+ T lymfocyty u předoperačních biopsií jako spolehlivý nezávislý prognostický marker, který je asociovaný s příznivým OS po resekci (nezávisle na TNM stadiu a pooperační terapii) a predikuje lokálně méně pokro-

čilý nádor společně s absencí uzlinových metastáz a lymfovaskulární invaze [21]. Naopak nízká denzita CD8+ T lymfocytů byla spojena s vysokým rizikem pokročilého nádorového onemocnění.

Prediktivní potenciál IS byl do současné doby studován pouze v několika studiích, zdá se však, že hodnocení TIL by mohlo být významné i v tomto směru. Například studie publikovaná Morrisovou et al udává delší celkové přežití u pacientů s TIL, kteří obdrželi adjuvantní chemoterapii založenou na 5-fluorouracilu [22]. Obdobně při hodnocení předoperačních biopsií u pacientů vs karcinomem rekta (rectal carcinoma – RC), kteří podstoupili pCRT, dominovala vysoká infiltrace CD3+ T lymfocyty u skupiny pacientů, kteří na neoadjuvantní terapii odpověděli příznivě (72 %). Naopak u pacientů, kteří byli klasifikováni jako non-respondenti k neoadjuvantní terapii, vykazovalo 63 % biopsií nízkou denzitu infiltrátu [20]. Hodnocení míry imunitního infiltrátu v biopsiích by tak mohlo být jedním z nástrojů predikce pacientovy odpovědi na neoadjuvantní terapii.

Jiná studie se zabývala jaterními metastázami CRC, kdy vysoká denzita CD3+, CD8+ a granzym B+ lymfocytů v invazivním okraji byla prediktivní pro prodloužené RFS u pacientů léčených konvenční chemoterapií či chemoterapií v kombinaci s cetuximabem či bevacizumabem [23].

Vzhledem k potenciálním benefitům zařazení IS do rutinní praxe a určité snaze o vytvoření nové komponenty klasifikace CRC, která by se tak přejmenovala na TNM-I (TNM-Immune), probíhá od roku 2012 mezinárodní validační studie [24]. Tento systematický přístup k validaci je zastřešen pracovní skupinou The Worldwide Immunoscore Consortium, která zahrnuje 23 center v 17 zemích (vč. ČR) a > 3 000 pacientů. Celý uvedený systém IS je koncepcí založen na vysoce standardizovaném testování a prahování, které však není volně dostupné. Prognostický význam hodnocení TIL u CRC však prokázaly i další studie využívající alternativních způsobů hodnocení.

Žaludek

Přítomnost TIL byla u karcinomů žaludku hodnocena ve více studiích, často i s imunohistochemickou subtypizací přítomných elementů. Publikované výsledky svědčí pro fakt, že zejména vysoká přítomnost CD3 a CD8 T lymfocytů představuje příznivý prognostický faktor [25]. Diskutabilní je role CD4+, CD25+ a FOXP3+ regulačních T lymfocytů, kde jsou výsledky nesourodé, a objevují se jak závěry označující jejich vysokou denzitu za negativní prognostický faktor predikující horší OS [26], tak závěry, které naopak svědčí o pozitivním prognostickém významu [26–28].

Pro karcinomy žaludku je charakteristická častá asociace s infekčními onemocněními (*Helicobacter pylori*, Epstein-Barr virus – EBV) a s mikrosatelitovou instabilitou [2]. Karcinom žaludku asociovaný s EBV byl dokonce v roce 2014 označen za čtvrtý samostatný molekulární podtyp, který je charakterizovaný amplifikací PD-L1 a lepší prognózou [29]. Tato studie dále také ukazuje, že karcinom žaludku asociovaný s EBV infekcí vede k vyšší mobilizaci T lymfocytů do místa nádoru, což by mohlo vysvětlit lepší výsledky u pacientů s EBV+ karcinomem v porovnání s pacienty EBV–. Práce publikovaná Daiem et al k tomuto dále dodává, že z jimi vyšetřovaných 97 vzorků karcinomu žaludku bylo téměř 10 % vzorků EBV+ a tyto vzorky také vykazovaly nejen vysokou PD-L1 expresi, ale i vysokou denzitu TIL [30]. Obdobné výsledky vycházejí také z řady dalších studií a naznačují, že vysoká denzita TIL představuje nezávislý pozitivní prognostický marker a její asociace s pozitivitou PD-L1 by mohla řadit tyto pacienty mezi skupinu profitující z anti-PD-1/PD-L1 terapie [31–33]. Prognostický význam TIL u karcinomů asociovaných s EBV byl recentně potvrzen i další prací, která navíc rozděluje tyto karcinomy do tří histologických podtypů – lymphoepithelioma-like carcinoma, carcinoma with Crohn's disease-like lymphoid reaction, konvenční typ adenokarcinomu - a udává, že nejlepších výsledků dosahují pacienti s lymphoepithelioma-like podtypem infiltrace, kteří vykazují signifikantně delší OS a DFS v porovnání s ostatními dvěma podtypy [34]. Obecné hodnocení stromálních a intratumorálních TIL dále ukázalo, že stromální TIL pozitivita byla statisticky významně spojená s delším RFS a DFS, ale již ne s OS, zatímco intratumorální TIL nedosahovaly statistické významnosti. Histologická subklasifikace karcinomů společně s přítomností TIL by tak mohla být použita jako prognostické faktory pro RFS a DFS u pacientů s EBV asociovaným karcinomem žaludku či mikrosatelitní nestabilitou (microsatellite instability – MSI) high karcinomů.

Pankreas

Bohaté desmoplastické stroma představuje jednu ze základních charakteristik duktálního karcinomu pankreatu a řada studií potvrzuje, že role aktivovaného stromálního mikroprostředí má zásadní vliv na agresivitu tumoru a jeho odpověď na terapii [35,36]. Příznivý prognostický význam vysoké denzity TIL byl demonstrován pro několik jejich podtypů, především CD4+, CD8+ T lymfocyty a M1 intratumorální makrofágy [37]. Toto složení imunitního mikroprostředí je také spojeno s méně pokročilými TNM stadii a menším rozsahem nádorové invaze v době diagnózy [32,38]. Naopak přítomnost četných tumor infiltrujících makrofágů, M2 makrofágů, neutrofilů a poměr Treg/CD4+ jsou asociované s kratší dobou celkového přežití [37].

Játra

Řada recentních prací poukazuje na pozitivní prediktivní význam vysoké denzity CD3+, CD4+ a CD8+ TIL, které jsou zpravidla lokalizované intratumorálně. Jejich přítomnost je spojená se signifikantně delším OS, nižším počtem rekurencí během 5 let a prodlouženým RFS [2,32,39,40]. Při korelaci denzity CD3+ a CD8+ T lymfocytů s expresí PD-L1 je uváděný pozitivní vztah a PD-L1 se tak podílí na predikci nižšího počtu rekurencí a prodlouženého RFS [39,41]. Jiná studie se zabývala korelací vysoké denzity CD8+ TIL s expresí IL-2, přičemž pacienti s IL-2 pozitivními nádory vykazovali signifikantně delší OS [32]. Exprese IL-2 se tak objevuje jako další prognostický biomarker (potvrzený v uni- i multivariantních studiích) nezávislý na stadiu tumoru. Odlišné závěry pro expresi PD-L1 uvádí Chang et al, v jejichž práci představovala vysoká exprese PD-L1 nezávislý negativní prognostický faktor s ohledem na DFS a byla spojená

s lokálně více pokročilým nádorem, vaskulární invazí, nádorovou embolizací a vyššími preoperativními hodnotami sérového alfa-fetoproteinu (AFP) [42]. Ostatní studované biomarkery zahrnují zejména Treg lymfocyty, kdy několik prací potvrzuje přítomnost intratumorálních Treg lymfocytů jako negativní nezávislý prognostický faktor, který navíc koreluje s větší velikostí primárního tumoru [43]. Naopak infiltrace B lymfocyty společně s cytotoxickými T lymfocyty je u pacientů spojená s prognózou příznivější [44].

Prs

Prognosticky pozitivní význam přítomnosti TIL byl u karcinomu prsu potvrzen ve více studiích, a to bez ohledu na typ nádoru. Bylo prokázáno, že vyšší intenzita lymfocytárního infiltrátu bývá přítomna zejména u tzv. triple negativních a HER2+ nádorů, ve 20 %, resp. v 16 %, oproti karcinomům estrogen pozitivním, kdy bývá přítomna asi jen v 6 % [45]. Prognostický a i potenciálně prediktivní význam TIL u časných stadií triple negativních a HER2+ karcinomů byl následně potvrzen i v další poměrně recentní studii, kde se diskutuje i predikce odpovědi na imunoterapii checkpoint inhibitory a adjuvantní i neoadjuvantní chemoterapii [46]. V roce 2016 dvě velké metaanalytické a přehledové studie prokázaly, že pozitivní asociace vyšší hladiny TIL s DFS a OS platí pouze pro triple negativní a HER2+ karcinomy, nikoli pro karcinomy estrogen pozitivní [47,48].

Prediktivním významem TIL pro neoadjuvantní a adjuvantní chemoterapii se zabývalo hned několik klinických studií. Například Denkert et al prokázali TIL jako nezávislý prognostický faktor odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii [49]. Posléze se při analýze primárních prsních karcinomů s pozitivní lymfatickou uzlinou (u triple negativních karcinomů) zjistilo, že každý 10% nárůst intratumorózních a stromálních TIL je asociován se 17%, resp. 15% poklesem rizika relapsu a s 27% a 17% snížením rizika smrti, a to bez ohledu na typ užité chemoterapie [50,51]. Tyto výsledky byly potvrzeny dalšími studiemi, kde byl u triple negativních a HER2+ karcinomů s každým 10% zvýšením TIL prokázán pokles DFS (11–14 %) a snížení rizika úmrtí (cca o 17 %) [45,52,53]. I přítomnost v reziduálním nádoru po neoadjuvantní terapii je spojena s lepší prognózou [54].

Z hlediska lokalizace TIL bylo při samostatném hodnocení intratumorózních i stromálních TIL ve velkých prospektivních i retrospektivních studiích dosaženo obdobných výsledků, nicméně v multivariantních modelech se ukazuje, že hodnocení intratumorózních lymfocytů nejspíše nepřináší další prognosticky přínosnou informaci [51,55]. Z tohoto důvodu se u prsních karcinomů v současné době hodnotí pouze přítomnost stromálních lymfocytů a nikoli lymfocyty intratumorózní. Nicméně fakt, že hodnocení intratumorózních lymfocytů v barvení HE (hematoxylin-eozin) může být v některých případech značně obtížné, mohl v důsledku vést k podhodnocení jejich významu. V současné době běží práce zabývající se potenciálním významem intratumorózních TIL a jejich detekcí s využitím imunohistochemie a/nebo obrazové analýzy [56].

Co se týká imunofenotypizace infiltrátu, ukazuje se, že také může korelovat s prognózou. Například přítomnost FOXP3+ Treg je obecně asociována s horší prognózou a navíc je hladina Treg také spojena s dalšími nepříznivými prognostickými faktory, jako jsou grade, metastázy v lymfatických uzlinách, negativita estrogenních receptorů a pozitivita HER2 [57,58]. To ovšem platí jen pro estrogen pozitivní nádory, naopak u estrogen negativních nádorů má vyšší zastoupení FOXP3+ Treg lymfocytů prognosticky příznivý efekt jakožto marker aktivní imunitní odpovědi [59]. Toho by se dalo terapeuticky využít, protože je známo, že jak hormonální terapie, tak i cytotoxická terapie má imunomodulační účinky a některé léky, např. inhibitory aromatázy mohou působit proti imunosupresivnímu efektu estrogenů kupříkladu redukcí počtu Treg [60].

V současnosti také probíhá řada studií zabývajících se významem PD-1 a PD-L1 u TIL prsu jak z hlediska imunoterapie PD-1/PD-L1 inhibitory, tak z hlediska jejich využití v neoadjuvantní terapii, kdy se ukazuje, že exprese těchto markerů je pravděpodobně asociována s lepší odpovědí na neoadjuvantní chemoterapii [61].

S ohledem na metodiku patří v současné době karcinomy prsu mezi nádory s nejlépe propracovaným systémem hodnocení TIL. Ve výše uvedených studiích byly v minulosti užity různé metodiky skórování, přesto bylo z hlediska prognózy i predikce dosaženo obdobných výsledků [62,63]. Z důvodů sjednocení hodnocení TIL u prsních karcinomů byl roku 2013 pracovní skupinou International Immuno-oncology Biomarker Working Group navržen a posléze schváleny guidelines, který standardizuje metodiku hodnocení TIL [64]. Výhodou je, že se vychází pouze z barvení HE [49]. Hodnotí se pouze stromální lymfocyty, konkrétně celkový procentuální rozsah denzity lymfocytární infiltrace stromatu v oblasti vymezené hranicemi invazivního nádoru. Klinicky relevantní cut off, který by rozdělil nádory na TIL+ a TIL–, však dosud nebyl stanoven.

Hodnocení TIL dále naráží na problém nádorové heterogenity, která může hodnocení komplikovat, ale v těchto případech se doporučuje spíše celkové zhodnocení než uvádění procentuálního zastoupení TIL v hot spotech [64].

Duktální karcinom *in situ*

V případě duktálního karcinomu *in situ* (ductal carcinoma *in situ* – DCIS), kterému bylo doposud věnováno méně pozornosti, se ukazuje, že TIL pravděpodobně nemají prognostický význam, ale jsou častěji asociovány s určitými klinicko-patologickými znaky, jako jsou grade, komedo nekrózy, HER2+ a věk [53]. Další práce se zabývaly imunofenotypizací lymfocytárního infiltrátu, významem přítomnosti CD68+ makrofágů a dalšími, nicméně ke zhodnocení potenciálního efektu TIL u DCIS bude potřeba další výzkum [65].

Ženský genitál

Ovaria

Prognostický význam hodnocení TIL v nádorech ženského genitálního systému byl nejlépe prostudován u karcinomů ovaria, nicméně jednotné standardizované hodnocení TIL v této oblasti dosud neexistuje. První studie, která pro-

kázala význam TIL v ovariálních karcinomech jako prognosticky příznivý faktor pro PFS a OS, je z roku 2003 [66]. Závěry této studie byly podpořeny dalšími pracemi a metaanalýza deseti prací prokázala, že absence TIL v ovariálních karcinomech je bez ohledu na jejich typ asociována s horší prognózou [67]. Na druhou stranu se však objevily i studie, které prognostický přínos TIL neprokázaly [68,69].

Několik prací se zabývalo i významem TIL ve vztahu k neoadjuvatní chemoterapii [70,71]. Ukazuje se, že počet TIL se u primárně TIL+ nádorů po neoadjuvantní chemoterapii zvyšuje a kromě toho mohou tyto lymfocyty exprimovat CTLA-4, PD-1 a PD-L1, a mohly by tedy být potenciálně imunoterapeuticky ovlivnitelné [70,72]. Toho by se dalo v budoucnu využít zejména u pokročilých inoperabilních nádorů, kde by mohla chemoterapie „nabudit" imunitní odpověď, což je ovšem možné pouze u nádorů, ve kterých byly primárně TIL přítomné [72]. Nutné jsou však další studie.

Vyšší počet TIL byl také prokázán u *BRCA1* mutovaných nádorů (ovaria i prsu) a u high grade serózních karcinomů jsou TIL dokonce považovány za jedno z histologických kritérií predikce přítomnosti *BRCA1* mutace [73,74]. U *BRCA2* mutovaných nádorů jsou výsledky rozporuplné [74–76].

Co se týká metodiky hodnocení TIL, u ovariálních karcinomů byly hodnoceny pouze intratumorózní lymfocyty – většina studií zdůrazňuje pozitivní prognostický význam intraepiteliálně lokalizovaných lymfocytů [77,78] a pouze ve dvou studiích byl oproti tomu prokázán pozitivní prognostický význam stromálních lymfocytů [79,80]. Metodika prací byla značně nejednotná, lymfocyty byly počítány jak manuálně, tak metodami digitální analýzy, byly užity různé hranice pozitivity, lišil se i počet zorných polí a velikost zvětšení [78]. Kromě denzity a lokalizace se řada studií také zabývala imunofenotypizací infiltrátu, se snahou zjistit prognostický význam jednotlivých subtypů T lymfocytů a interakcí mezi T lymfocyty a epiteliálními buňkami. Některé práce prokázaly pozitivní korelaci s prognózou u CD8+ lymfocytů oproti CD3+ lymfocytům (vč. CD8+, granzym+ nebo TIA-1+), v dalších populacích (Treg lymfocyty) však byly výsledky rozporuplné [67,81,82]. Dalším prognosticky příznivým faktorem se ukazuje být i přítomnost stromálních B lymfocytů a plazmatických buněk, která ukazuje na důležitost interakce mezi T a B lymfocyty a naznačuje, že je třeba brát do úvahy i stromální infiltraci a neomezovat se pouze na intraepiteliální komponentu [83,84].

Endometrium

V oblasti karcinomů endometria dosud nebyla provedena větší studie, která by se obecněji zabývala prognostickým významem TIL u všech nádorových typů. Výzkum TIL byl donedávna zaměřen hlavně na MSI, která se vyskytuje u 10–20 % endometroidních karcinomů, ať už ve formě germinálních mutací (Lynchův syndrom), či epigenetických změn. U endometroidních karcinomů s vyšší denzitou TIL jsou častěji nacházeny mutace MMR a kolektivu autorů Shia et al se podařilo prokázat, že vyšší počet TIL a přítomnost peritumorózních lymfocytů jsou významnými prediktory MSI-H fenotypu těchto nádorů. U zvýšeného počtu intraepiteliálních TIL (s cut off 40 intraepiteliálních TIL na 10 zorných polí velkého zvětšení) byla prokázána senzitivita predikce MSI 85 % se specifičností 46 % [85]. Přítomnost peritumorózních lymfocytů sama o sobě má senzitivitu predikce MSI 54 % se specifičností 76 %. Jejich metodika byla použita i v následných studiích [85,86]. Z výše uvedeného vyplývá, že v karcinomech endometria se nelze omezit pouze na hodnocení intratumorózních lymfocytů, ale zásadní význam má i hodnocení peritumorózních lymfocytů.

Recentní práce se zabývala TIL u endometroidních karcinomů s mutací v genu POLE (ultramutované), která se vyskytuje asi v 7 % endometroidních karcinomů. Tyto nádory jsou kromě specifických histologických znaků charakterizované i vyšší denzitou TIL jak v epitelu, tak ve stromatu [87,88]. Endometroidní karcinomy s vyšší denzitou intratumorózních lymfocytů (tedy i MSI a POLE mutované nádory) jsou považovány za nádory s příznivější prognózou [89–91]. O objasnění se pokusilo několik studií, kde autoři navrhují vysvětlení, že nádory s vysokým počtem mutací nejspíše generují vyšší počet neoantigenů, a proto se v nich také vyskytuje vyšší počet CD3+ lymfocytů (Howitt et al, van Gool et al). Zároveň byla v těchto typech nádorů zjištěna i vyšší exprese PD-L1 a v současné době jsou zkoumány možnosti imunoterapeutického ovlivnění těchto typů nádorů, s prvními slibnými výsledky ve skupině MMR mutovaných karcinomů [92–94].

Z hlediska imunofenotypu a lokalizace jednotlivých populací T lymfocytů byl u endometroidních karcinomů prokázán prognostický význam intraepiteliálních CD8+ (vč. CD8+, PD-1+/CD103+) a stromálních CD3+ lymfocytů [90,95,96]. Oproti tomu Treg lymfocyty jsou asociovány naopak s prognózou špatnou [97].

Plíce

V nemalobuněčných karcinomech plic (non-small cell lung cancer – NSCLC), bez ohledu na podtyp (skvamocelulární či adenokarcinom), bylo imunitní mikroprostředí podrobně zkoumáno, protože hraje výraznou úlohu v patofyziologii plicní kancerogeneze. Obdobně jako v případě MM je přítomna vysoká mutační zátěž a současně je zřejmá dobrá odpověď na léčbu tzv. checkpoint inhibitory. Ve velké většině případů je v nádorovém mikroprostředí přítomna výrazná příměs TIL, které se ještě dělí na intratumorové a stromální. TIL jsou zastoupeny ve velké většině T lymfocyty, makrofágy a dendritickými buňkami. V metaanalytické studii shrnuli Zeng et al, že zvýšený počet CD8+, CD3+ a CD4+ má prognostický význam s ohledem na délku celkového přežití i riziko recidivy, obdobně jako poměr FOXP3/CD3 [98,99]. Význam B lymfocytů u NSCLC není zatím stále jasný, nicméně jejich vysoká denzita v okolí i ve vlastním nádoru pozitivně korelovala s délkou celkového přežití [99].

V současné době nejsou v rutinní praxi pravidla pro skórování jednotlivých podtypů TIL zavedena, i když bylo navrhováno zahrnutí systému IS obdobného charakteru jako u CRC. Kromě počítání imunitních buněk v rámci běžného barvení existují práce založené na se-

mikvantitativní analýze přítomnosti TIL s využitím speciálních metod vč. imunohistochemie a fluorescence. V rámci jednotlivých studií se však často liší reproducibilita a interobservační variabilita, a rutinní využitelnost analýz k diagnostice či prognostické stratifikaci je tak omezená.

Nejpřesněji definovaná kvantifikace TIL je součástí vyhodnocení exprese PD-L1 pomocí klonu SP142 anti-PD-L1 protilátky, která bude podmínkou k indikaci nového checkpoint inhibitoru atezolizumabu. V tomto případě je metodika poměrně jednoznačná, definice PD-L1 pozitivity je definována (v případě nedostačující pozitivity nádorových buněk, tzn. < 50 %) jako ≥ 1 % imunitních buněk exprimujících PD-L1. V případě NSCLC je exprese PD-L1 dále stratifikována na 4 kategorie IC0–IC3, přičemž hranice mezi IC0 a IC1 je ≥ 1 % imunitních buněk z celkové plochy hodnoceného vitálního nádoru (IC2 je ≥ 5 %, IC3 ≥ 10 %). Zatímco však PD-L1 pozitivita nádorových buněk je poměrně dobře reprodukovatelná, v případě hodnocení pozitivity PD-L1 na TIL stále existují velké interobservační rozdíly a v některých studiích je míra shody hodnotících patologů velmi nízká [100]. Navíc v tomto případě hodnocení nerozlišuje mezi stromálními a intratumorovými TIL. Protilátka též značí směs lymfocytů, makrofágů, dendritických buněk i granulocytů.

Mezoteliom

Význam TIL u maligního mezoteliomu (zejména pleury či peritonea) není zcela jasný, především s ohledem na relativně nízkou prevalenci, i když poznatků o významu TIL recentně přibývá. Zatím lze předpokládat negativní korelaci mezi přítomností stromálních TIL a délkou celkového přežití [2].

Uroteliální karcinom

Význam vlivu imunoterapie u uroteliálního karcinomu močového měchýře (urothelial carcinoma of the bladder – UCB) je podložen již zavedenou a intravezikální BCG terapií. Ta analogicky jako *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) v plicích indukuje Th1 řízenou cytotoxickou odpověď se zvýšením počtu CD3+, CD4+ a CD8+ lymfocytů aktivací makrofágů a se vznikem epiteloidních granulomů, která vede k regresi nádorové populace. Kvantita a typ TIL mají v případě UCB prognostický i prediktivní význam. Zvýšený počet s nádorem asociovaných makrofágů může být spojen s nepříznivou prognózou po aplikaci intravezikální BCG terapie, přičemž zvýšený počet CD4+ a GATA3+ T buněk byl spojen s příznivější prognózou [101].

Závěry publikovaných studií zabývajících se kvantifikací a typizací TIL však nejsou zcela jednoznačné a někdy jsou i v rozporu – v případě povrchových UCB (Tis či T1 kategorie) byla přítomnost CD3+, CD8+ a FOXP3+ asociována s dobrou i špatnou prognózou, nicméně je zde předpoklad, že dobrou výpovědní hodnotu může mít poměr mezi T efektorovými a Treg buňkami, resp. FOXP3/CD3 a FOXP3/CD8 poměr [102], kdy se zdá, že vyšší podíl Treg (FOXP3+) koreluje s horší prognózou. Poměr CD8+/Treg (CD25+) měl i prediktivní význam pro systémovou léčbu platinovými deriváty [103].

I v případě UCB je kvantita TIL součástí protokolu na vyhodnocení exprese PD-L1 (klon SP142) a i zde platí, že zvýšený podíl (< 1 %, resp. 5 %) PD-L1+ TIL je spojen s příznivější prognózou i odpovědí na léčbu PD-L1 inhibitory (atezolizumab v případě SP142).

Prostata

Pro adenokarcinomy prostaty (prostate cancer – PCa) je typická relativně nízká až prakticky nulová imunitní odpověď, a to i přes hypotézy, které dávají vznik karcinomu prostaty do souvislosti s chronickým zánětem. V PCa jsou TIL zastoupeny populací CD8+, CD4+ a Treg lymfocytů [2]. Jejich význam je zatím, z prognostického i prediktivního hlediska, spíše nejistý. Většina studií naznačuje, že zvýšený počet TIL je asociován s nepříznivou prognózou, recidivou onemocnění a přítomností metastáz, s čímž kontrastuje výsledek studie, kde byl jak výrazně zvýšený, tak i výrazně snížený počet CD3+ TIL asociován s kratší dobou do biochemické recidivy [2]. Navíc bylo prokázáno, že antiandrogenová léčba má za následek zvýšení počtu CD4+ a CD8+ TIL [104].

Renální karcinom

Nejvíce zastoupenými TIL v karcinomech z renálních buněk (renal cell carcinoma – RCC) jsou CD4+, CD8+, Treg, NK buňky (natural killer cells) a minoritně také B lymfocyty. Zvýšený počet TIL, zejména CD4+ a CD8+ T lymfocytů a jimi zvýšená exprese CD69, je u RCC a zejména u RCC ze světlých buněk asociován s vyšším grade a nepříznivou prognózou [2,105]. Jiné studie však ukázaly, že závisí na aktivitě dané populace T lymfocytů – zachovaná proliferační aktivita CD8+ TIL byla spojena s lepším celkovým přežitím u pokročilých RCC a zvýšený počet FOXP3+ Treg a CD4+, CD25+ a FOXP3– Treg byl spojen s nepříznivou prognózou. Komparativní analýza TIL mezi primárními a metastatickými ložisky RCC (studie však nerozlišila podtypy RCC a měla celkem 4 spárované případy) ukázala, že v metastázách je nižší denzita CD8+ lymfocytů a snížený poměr FOXP3+/CD8+ a zvýšená exprese PD-L1 [106]. I přes tyto konfliktní výsledky studií je význam imunitní odpovědi u RCC podložen možným užitím imunoterapie u pokročilých RCC (IL-2, PD-1 inhibitor nivolumab; exprese PD-L1 a její prognostický a prediktivní význam nejsou v současné době jasné).

Mozkové nádory

Centrální nervový systém (central nervous systém – CNS) má vůči imunitnímu systému specifické postavení, které je dáno zejména existencí hematoencefalické bariéry a absencí klasické lymfatické drenáže. Pro účely výzkumu a hodnocení významu TIL u nádorů CNS je navíc potřeba brát v potaz jejich odlišnou histogenezi.

V případě gliomů jsou TIL přítomny spíše v nižším počtu, většinou perivaskulárně či při invazivním okraji nádoru, který je však s ohledem na morfologický charakter zejména WHO G2–4 gliomů v řadě případů prakticky nedefinovatelný. Mezi nejpočetnější TIL v gliomech patří rezidentní mikrogliální buňky, periferní makrofágy, CD8+, CD4+, CD45R0+ a FOXP3+ T lymfocyty, NK buňky a granulocyty [107]. TIL jsou zvýšené zejména u glioblastomů se sarkomatioidní, epitelioidní, gemistocytární či obrovskobuněčnou diferenciací. Přesná prognos-

tická data však chybí a studie jsou často zatíženy metodickými rozdíly v kvantifikaci a typizaci TIL [2,108].

Analogická situace je u meningiomů, ve kterých jsou TIL obecně méně četné, nicméně u některých typů (např. meningiom bohatý na lymfocyty) jsou četnější a některé studie prokázaly zvýšený počet TIL u atypických a maligních meningiomů (WHO G2, resp. G3 meningiomy). TIL jsou u meningiomů zastoupeny zejména CD3+, CD4+, CD45+ a CD20+ lymfocyty, NK buňkami a makrofágy; jejich přesný prognostický a prediktivní význam je však zatím nejasný [2].

Hodnocení TIL v CNS má tak v současné době potenciál spíše v rámci analýzy metastáz epitelových nádorů či MM. V případě primárních nádorů CNS je význam TIL a potenciální imunoterapie zatím nejasný, nicméně i v tomto případě běží řada klinických studií se zaměřením na imunoterapii zejména high-grade gliomů [2].

Prediktivní význam hodnocení TIL

Prediktivní význam TIL nabývá na aktuálnosti především v souvislosti s hledáním nových prediktorů odpovědi na terapii imunitními checkpoint inhibitory. Nutné je však zmínit, že TIL mohou mít prediktivní význam i u jiných léčebných modalit (viz výše, např. u karcinomu prsu je vysoký výskyt TIL spojen s lepší odpovědí na neoadjuvantní chemoterapii; stejně tak výskyt TIL u jaterních metastáz CRC predikuje lepší odpověď na chemoterapii a u MM je výskyt TIL spojen s dobrou odpovědí na terapeutické vakcíny využívající MEGEA3 (melanoma-associated antigen 3) [109].

Odpověď na imunoterapii (zejména anti-PD-1/PD-L1) je v současné době obecně obtížně predikovatelná. U některých nádorů nemáme žádný prediktor (např. MM, nádory močových cest). U jiných nádorů (např. NSCLC) lze použít stanovení exprese PD-L1 – jedná se však o prediktor, který je velmi dynamický a s ohledem na predikci není z více důvodů optimální (problematika stanovení exprese PD-L1 je však nad rámec tohoto sdělení). Obecně je snahou nalézt další markery, které by vedly k lepší stratifikaci pacientů s ohledem na predikování odpovědi na imunoterapii, v současné době zejména léčbu anti-PD-1/PD-L1. V tomto kontextu připadá v úvahu např. hodnocení tzv. mutačního loadu, neoantigenů, výskytu určitých genetických změn (mutace MHC1, NF-1, interferonu γ), exprese PD-L1 či aberací PD-L1/PD-L2 na genetické úrovni (např. amplifikace genu atd.). Poměrně perspektivním prediktivním markerem je však právě i hodnocení TIL – ukazuje se, že nádory s přítomností vysokého počtu efektorových T lymfocytů vykazují lepší odpověď na imunoterapii než nádory bez těchto lymfocytů [110,111].

Vlastní biologický význam přítomnosti zánětlivého infiltrátu u solidních nádorů je daleko složitější a pouhá přítomnost zánětlivých elementů sama o sobě může reflektovat určitý stav imunitní odpovědi proti nádoru (či jejího potenciálu), jde však o parametr nedokonalý a s ohledem na komplexnost interakcí mezi nádorem a hostitelem nedostatečný – imunitní interakce jsou mj. ovlivněny stromálním mikroprostředím, globálním stavem imunity, antigenními vlastnostmi nádoru (neoantigeny, nádorové antigeny, virové antigeny), ale i faktory zevního prostředí, střevním mikrobiomem a v neposlední řadě i typem buněčné smrti, resp. její imunogenicitou [112–114].

Prediktivní význam TIL může souviset s faktem, jestli se efektorové T lymfocyty dostanou do kontaktu s nádorovými buňkami. Podle současné koncepce je možné nádory podle přítomnosti a rozsahu TIL s ohledem na nádorovou imunitu stratifikovat do tří základních fenotypických skupin: 1. Zánětlivá (immune-inflamed) charakterizovaná přítomností CD4 a CD8 T lymfocytů, myeloidních a monocytoidních buněk, které jsou v přímém kontaktu s nádorovými strukturami. Tento fenotyp svědčí pro přítomnost protinádorové odpovědi, která však byla z nějakého důvodu potlačena (nejspíše imunosupresivním prostředím v oblasti nádoru). U pacientů s tímto fenotypem se nejčastěji vyskytuje odpověď na imunoterapii. Není však vyjádřena vždy a přítomnost zánětlivé infiltrace v nádoru je tedy nezbytná, avšak sama o sobě nestačí. 2. Imunitně vyloučená (immune-excluded) pro tuto fenotypickou skupinu je typická přítomnost hojných zánětlivých elementů, které však nepronikají do nádoru a jsou lokalizovány v jeho okolí či stromatu. Po anti-PD-1/PD-L1 léčbě dochází k určitým známkám aktivace T lymfocytů, nikoliv však k jejich pronikání do nádorových struktur a odpověď na imunoterapii je vzácná. 3. Opuštěná (immune-desert) charakterizovaná absencí či pouze minimální přítomností zánětlivých elementů v nádoru, jeho stromatu i okolí. Tento fenotyp pravděpodobně svědčí pro nepřítomnost preexistující protinádorové imunity [112]. V kontextu uvedeného se hodnocení TIL nabízí jako potenciální prediktivní marker, zdá se však, že nutný bude komplexní přístup vyhodnocující více parametrů (mutační load, neoantigeny, exprese PD-L1 atd.), nikoliv jednotlivý parametr izolovaně – zatím se však nepodařilo nalézt algoritmus, který by využití v praxi umožnil.

Složení zánětlivého infiltrátu je v oblasti nádoru velmi heterogenní a komplexní. Tento infiltrát zahrnuje elementy podílející se na normální homeostáze, ale i elementy podílející se na vzniku a progresi nádoru např. tím, že potlačují imunitní odpověď [115]. Všechny tyto elementy interagují mezi sebou i s okolím [116]. Nezastupitelnou roli hrají např. i normální stromální fibroblasty a síť kolagenních vláken (prevence nádorového růstu), vaskularizace či nádorové stromální fibroblasty (podpora progrese nádoru) [117].

Základní roli ve vlastní protinádorové imunitě však hrají T lymfocyty. V iniciační fázi (priming) dochází z naivních T lymfocytů ke vzniku efektorových a paměťových T lymfocytů (z těch mohou vznikat terminálně diferencované buňky, jako jsou cytotoxické T lymfocyty). V časné fázi antigenní stimulace se nejprve jedná o sebeobnovující krátkodobé paměťové T lymfocyty – u lidí zatím nepotvrzeným předpokladem je, že toto jsou buňky, které selektivně proliferují po PD-1 blokádě [118]. Při dlouhodobější stimulaci antigenem však dochází k negativní regulaci (např. prostřednictvím PD-1), která vede ke zvyšujícímu se funkčnímu vyčerpání efektorových T lymfocytů [112]. Problematika těchto interakcí je důležitá zejména s ohledem na fakt, že u některých pacientů, kteří

podstoupí léčbu inhibitory PD-1/PD-L1, je vyjádřena pouze částečná odpověď – sice svědčící pro určitou účinnost léčby, nicméně bez dosažení žádoucího efektu v podobě kompletní eliminace nádorové populace. Příčiny mohou být vícečetné (rozvoj alternativních mechanizmů imunosuprese, ztráta dominantních antigenních determinant nádoru, vznik mutací vedoucích k rezistenci) – může se však jednat i o známku nově nastavené rovnováhy mezi nádorem a hostitelem svědčící pro to, že kompartment sebeobnovujících paměťových T lymfocytů je příliš malý a nestačí držet tempo s růstem nádoru.

V tomto kontextu se nabízí podrobnější imunofenotypizace zánětlivého infiltrátu se snahou o rozlišení a kvantifikaci jednotlivých subtypů T lymfocytů. Prací zabývajících se touto problematikou je poměrně velké množství a výsledky jsou rozporuplné. Vzhledem k rozdílným výsledkům z různých studií i u odlišných typů nádorů je obtížné přesně definovat subtypy lymfocytů asociovaných s dobrou a špatnou prognózou, nicméně obecně lze říci, že přítomnost cytotoxických lymfocytů (CD8+), paměťových lymfocytů (CD45RO+), Th1 lymfocytů, NK buněk, makrofágů s M1 fenotypem a dendritických buněk s DC1 fenotypem se zdá být pozitivním prognostickým faktorem [1,116]. Význam dalších lymfocytárních populací (Th2, Treg, Th17) je diskutabilní a zřejmě záleží na konkrétním typu nádoru a také na nádorovém mikroprostředí. Problematický na interpretaci je zejména význam přítomnosti CD4+ T lymfocytů. Obecně imunosupresivní efekt mají makrofágy s M2 fenotypem, dendritické buňky s DC2 fenotypem, tzv. myeloidní supresorové buňky (myeloid-derived supressor cells – MDSC) – tedy nezralé myeloidní buňky s imunosupresivním potenciálem (tyto buňky se však i s využitím imunohistochemických metod ve tkáni obtížně detekují).

Metodika hodnocení TIL

Z uvedeného přehledu vyplývá, že napříč jednotlivými typy nádorů a často i uvnitř jednotlivých nádorových typů ne vždy existuje shoda ve způsobu hodnocení TIL či se v některých případech jedná o metodiky, jejichž interpretace je v reálné praxi s ohledem na nedostatečnou stratifikaci pacientů do prognosticky významných skupin obtížná. Jednou z možností je vytvořit v rámci každého nádoru vlastní metodické postupy (jako je tomu např. u karcinomu prsu, u kterého je metodika standardizovaná, u CRC – tam však projekt IS nepředstavuje všeobecně dostupnou platformu, či u MM, kde je snaha o nalezení standardizovaného postupu, který by nahradil v současné době nejčastěji používaný způsob hodnocení dle Clarka et al). I přes veškerá pozitiva vyplývající ze standardizace u jednotlivých typů nádorů je toto v reálné praxi nepraktické a vyžaduje to ze strany patologa znalost a využívání různých systémů hodnocení, což je v případě více typů nádorů komplikované (nehledě na metodické nároky, které se mohou u jednotlivých způsobů hodnocení značně lišit). Tento problém by mohl vyřešit zcela recentně navrhovaný sjednocený systém hodnocení TIL vycházející ze standardizovaného způsobu hodnocení TIL u karcinomu prsu (International Immuno-Oncology Biomarker Working Groups guidelines for TIL assessment in solid tumors) [1]. Systém hodnotí procentuální rozsah (denzitu) lymfocytární infiltrace odděleně v oblasti stromatu a nádoru (u některých typů nádoru, jako je karcinom prsu, však lze hodnotit pouze stroma). Hodnotí se pouze oblast invazivního nádoru (zahrnující invazivní okraj a centrální oblast, které jsou přesně definovány a lze je reportovat samostatně). V tuto chvíli nejsou definovány klinicky relevantní úrovně TIL – jedná se pouze o metodický návrh, který je nutné ověřit v praxi a provést „naprahování" do prognosticky relevantních skupin. Atraktivní na tomto systému je kromě tolik žádoucí standardizace i relativní jednoduchost založená na faktu, že se jedná o systém vycházející z barvení HE bez nutnosti využití imunohistochemických metod či na většině pracovišť nedostupných počítačových systémů obrazové analýzy. Systém lze použít pro primární i metastatické léze. Je však nutno jej ověřit v reálné praxi a srovnat jeho výsledky se stávajícími způsoby hodnocení.

Závěr

Současné poznatky týkající se přítomnosti TIL u solidních nádorů svědčí pro fakt, že se jedná o parametr s prognostickým a pravděpodobně i prediktivním významem. V současné době až překotného rozvoje imunoterapie doprovázeného (dá se říci opožděně) snahou o nalezení prediktivních markerů se hodnocení TIL stává jedním z perspektivních parametrů, validace a rutinní využití nových biomarkerů je však komplikovaný proces a v tuto chvíli je nutné akceptovat fakt, že hodnocení TIL má velký potenciál stát se jedním z prediktorů odpovědi (nejen) na imunoterapii. Jeho současné využití v klinické praxi však není podloženo dostatkem důkazů a naráží na více problémů, vč. metodických. Přes veškerý metodický rozvoj umožňující využití komplikovaných technologií hodnotících nejrůznější aspekty přítomného zánětlivého infiltrátu včetně funkčních charakteristik (obrazová analýza, multiplexní fluorescenční imunohistochemie, hmotnostní spektrometrie) je snahou v této fázi vývoje (a finančních možností) vyvinout a standardizovat levnou a všeobecně dostupnou metodiku umožňující široké využití hodnocení TIL v klinické praxi.

Literatura

1. Hendry S, Salgado R, Gevaert T et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. Adv Anat Pathol 2017; 24(5): 235–251. doi: 10.1097/PAP.0000000000000162.
2. Hendry S, Salgado R, Gevaert T et al. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. Adv Anat Pathol 2017. doi: 10.1097/PAP.0000000000000161.
3. Day CL Jr, Sober AJ, Kopf AW et al. A prognostic model for clinical stage I melanoma of the trunk. Location near the midline is not an independent risk factor for recurrent disease. Am J Surg 1981; 142(2): 247–251. doi: 10.1016/0002-9610(81)90286-5.
4. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. J Natl Cancer Inst 1989; 81(24): 1893–1904.
5. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of senti-

nel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. J Clin Oncol 2012; 30(21): 2678–2683. doi: 10.1200/JCO.2011.37.8539.
6. Park CK, Kim SK. Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. Oncotarget 2017; 8(9): 14759–14769. doi: 10.18632/oncotarget.14736.
7. Saldanha G, Flatman K, Teo KW et al. A Novel Numerical Scoring System for Melanoma Tumor-infiltrating Lymphocytes Has Better Prognostic Value Than Standard Scoring. Am J Surg Pathol 2017; 41(7): 906–914. doi: 10.1097/PAS.0000000000000848.
8. Thomas NE, Busam KJ, From L et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. J Clin Oncol 2013; 31(33): 4252–4259. doi: 10.1200/JCO.2013.51.3002.
9. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. Cancer 1996; 77(7): 1303–1310. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR12>3.0.CO;2-5.
10. Burton AL, Roach BA, Mays MP et al. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. Am Surg 2011; 77(2): 188–192.
11. Cancer Genome Atlas N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. Cell 2015; 161(7): 1681–1696.
12. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature 2014; 515(7528): 568–571. doi: 10.1038/nature13954.
13. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science 2006; 313(5795): 1960–1964. doi: 10.1126/science.1129139.
14. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. J Clin Oncol 2011; 29(6): 610–618. doi: 10.1200/JCO.2010.30.5425.
15. Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA. Immune classification of colorectal cancer patients: impressive but how complete? Expert Opin Biol Ther 2013; 13(4): 517–526. doi: 10.1517/14712598.2013.751971.
16. Dahlin AM, Henriksson ML, Van Guelpen B et al. Colorectal cancer prognosis depends on T-cell infiltration and molecular characteristics of the tumor. Mod Pathol 2011; 24(5): 671–682. doi: 10.1038/modpathol.2010.234.
17. Zavadova E, Spacek J, Vocka M et al. Immunoscore and Its Predictive Value for Colorectal Cancer. Klin Onkol 2015; 28 (Suppl 4): 82–85. doi: 10.14735/amko20154S82.
18. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. J Clin Oncol 2009; 27(35): 5944–5951. doi: 10.1200/JCO.2008.19.6147.
19. Broussard EK, Disis ML. TNM staging in colorectal cancer: T is for T cell and M is for memory. J Clin Oncol 2011; 29(6): 601–603. doi: 10.1200/JCO.2010.32.9078.
20. Anitei MG, Zeitoun G, Mlecnik B et al. Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. Clin Cancer Res 2014; 20(7): 1891–1899. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2830.
21. Koelzer VH, Lugli A, Dawson H et al. CD8/CD45RO T-cell infiltration in endoscopic biopsies of colorectal cancer predicts nodal metastasis and survival. J Transl Med 2014; 12: 81. doi: 10.1186/1479-5876-12-81.
22. Morris M, Platell C, Iacopetta B. Tumor-infiltrating lymphocytes and perforation in colon cancer predict positive response to 5-fluorouracil chemotherapy. Clin Cancer Res 2008; 14(5): 1413–1417. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1994.
23. Halama N, Michel S, Kloor M et al. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. Cancer Res 2011; 71(17): 5670–5607. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0268.
24. Galon J, Mlecnik B, Bindea G et al. Towards the introduction of the ‚Immunoscore' in the classification of malignant tumours. J Pathol 2014; 232(2): 199–209. doi: 10.1002/path.4287.
25. Lee JY, Son T, Cheong JH et al. Association between Chemotherapy-Response Assays and Subsets of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Gastric Cancer: A Pilot Study. J Gastric Cancer 2015; 15(4): 223–230. doi: 10.5230/jgc.2015.15.4.223.
26. Liu K, Yang K, Wu B et al. Tumor-Infiltrating Immune Cells Are Associated With Prognosis of Gastric Cancer. Medicine (Baltimore) 2015; 94(39): e1631. doi: 10.1097/MD.0000000000001631.
27. Haas M, Dimmler A, Hohenberger W et al. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. BMC Gastroenterol 2009; 9: 65. doi: 10.1186/1471-230X-9-65.
28. Haas M, Buttner M, Rau TT et al. Inflammation in gastric adenocarcinoma of the cardia: how do EBV infection, Her2 amplification and cancer progression influence tumor-infiltrating lymphocytes? Virchows Arch 2011; 458(4): 403–411. doi: 10.1007/s00428-011-1058-1.
29. Kim SY, Park C, Kim HJ et al. Deregulation of immune response genes in patients with Epstein-Barr virus-associated gastric cancer and outcomes. Gastroenterology 2015; 148(1): 137–147. e9. doi: 10.1053/j.gastro.2014.09.020.
30. Dai C, Geng R, Wang C et al. Concordance of immune checkpoints within tumor immune contexture and their prognostic significance in gastric cancer. Mol Oncol 2016; 10(10): 1551–1558. doi: 10.1016/j.molonc.2016.09.004.
31. Chiaravalli AM, Feltri M, Bertolini V et al. Intratumour T cells, their activation status and survival in gastric carcinomas characterised for microsatellite instability and Epstein-Barr virus infection. Virchows Arch 2006; 448(3): 344–353. doi: 10.1007/s00428-005-0066-4.
32. Solinas C, Pusole G, Demurtas L et al. Tumor infiltrating lymphocytes in gastrointestinal tumors: Controversies and future clinical implications. Crit Rev Oncol Hematol 2017; 110: 106–116. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.11.016.
33. Wang M, Busuttil RA, Pattison S et al. Immunological battlefield in gastric cancer and role of immunotherapies. World J Gastroenterol 2016; 22(28): 6373–6384. doi: 10.3748/wjg.v22.i28.6373.
34. Kang BW, Seo AN, Yoon S et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer. Ann Oncol 2016; 27(3): 494–501. doi: 10.1093/annonc/mdv610.
35. Erkan M, Hausmann S, Michalski CW et al. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2012; 9(8): 454–467. doi: 10.1038/nrgastro.2012.115.
36. Nielsen MF, Mortensen MB, Detlefsen S. Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. World J Gastroenterol 2016; 22(9): 2678–2700. doi: 10.3748/wjg.v22.i9.2678.
37. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K et al. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. Br J Cancer 2013; 108(4): 914–923. doi: 10.1038/bjc.2013.32.
38. Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R et al. Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. Br J Cancer 2015; 112(11): 1782–1790. doi: 10.1038/bjc.2015.145.
39. Gabrielson A, Wu Y, Wang H et al. Intratumoral CD3 and CD8 T-cell Densities Associated with Relapse-Free Survival in HCC. Cancer Immunol Res 2016; 4(5): 419–430. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0110.
40. Chew V, Tow C, Teo M et al. Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients. J Hepatol 2010; 52(3): 370–379. doi: 10.1016/j.jhep.2009.07.013.
41. Sideras K, Biermann K, Verheij J et al. PD-L1, Galectin-9 and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes are associated with survival in hepatocellular carcinoma. Oncoimmunology 2017; 6(2): e1273309. doi: 10.1080/2162402X.2016.1273309.
42. Chang H, Jung W, Kim A et al. Expression and prognostic significance of programmed death protein 1 and programmed death ligand-1, and cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 in hepatocellular carcinoma. APMIS 2017; 125(8): 690–608. doi: 10.1111/apm.12703.
43. Chen KJ, Zhou L, Xie HY et al. Intratumoral regulatory T cells alone or in combination with cytotoxic T cells predict prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. Med Oncol 2012; 29(3): 1817–1826. doi: 10.1007/s12032-011-0006-x.
44. Garnelo M, Tan A, Her Z et al. Interaction between tumour-infiltrating B cells and T cells controls the progression of hepatocellular carcinoma. Gut 2017; 66(2): 342–351. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310814.
45. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. JAMA Oncol 2016; 2(10): 1354–1360. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.1061.
46. Savas P, Salgado R, Denkert C et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. Nat Rev Clin Oncol 2016; 13(4): 228–241. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.215.
47. Mao Y, Qu Q, Chen X et al. The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS One 2016; 11(4): e0152500. doi: 10.1371/journal.pone.0152500.
48. Wang Q, Zhao L, Yang X et al. Antibody 1A4 with routine immunohistochemistry demonstrates high sensitivity for ALK rearrangement screening of Chinese lung adenocarcinoma patients: A single-center large-scale study. Lung Cancer 2016; 95: 39–43. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.02.014.
49. Denkert C, Loibl S, Noske A et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. J Clin Oncol 2010; 28(1): 105–113. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7370.
50. Loi S, Michiels S, Salgado R et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. Ann Oncol 2014; 25(8): 1544–1550. doi: 10.1093/annonc/mdu112.
51. Loi S, Sirtaine N, Piette F et al. 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. J Clin Oncol 2013; 31(7): 860–867. doi: 10.1200/JCO.2011.41.0902.
52. Adams S, Gray RJ, Demaria S et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. J Clin Oncol 2014; 32(27): 2959–2966. doi: 10.1200/JCO.2013.55.0491.
53. Pruneri G, Gray KP, Vingiani A et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are a powerful prognostic marker in patients with triple-negative breast cancer enrolled in the IBCSG phase III randomized clinical trial 22-00. Breast Cancer Res Treat 2016; 158(2): 323–231. doi: 10.1007/s10549-016-3863-3.
54. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast

cancer: a retrospective multicenter study. Ann Oncol 2014; 25(3): 611–618. doi: 10.1093/annonc/mdt556.
55. Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM et al. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. Breast Cancer Res Treat 2014; 148(3): 467–476. doi: 10.1007/s10549-014-3185-2.
56. Wang ZQ, Milne K, Derocher H et al. CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer. Clin Cancer Res 2016; 22(24): 6290–6297. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0732.
57. Shou J, Zhang Z, Lai Y et al. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs: a systematic review and meta-analysis. BMC Cancer 2016; 16: 687. doi: 10.1186/s12885-016-2732-0.
58. West NR, Kost SE, Martin SD et al. Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. Br J Cancer 2013; 108(1): 155–162. doi: 10.1038/bjc.2012.524.
59. Liu S, Foulkes WD, Leung S et al. Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. Breast Cancer Res 2014; 16(5): 432. doi: 10.1186/s13058-014-0432-8.
60. Generali D, Bates G, Berruti A et al. Immunomodulation of FOXP3+ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients. Clin Cancer Res 2009; 15(3): 1046–1051. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1507.
61. Bertucci F, Goncalves A. Immunotherapy in Breast Cancer: the Emerging Role of PD-1 and PD-L1. Curr Oncol Rep 2017; 19(10): 64. doi: 10.1007/s11912-017-0627-0.
62. West NR, Milne K, Truong PT et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. Breast Cancer Res 2011; 13(6): R126. doi: 10.1186/bcr3072.
63. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. Ann Oncol 2014; 25(8): 1536–1543. doi: 10.1093/annonc/mdu191.
64. Salgado R, Denkert C, Demaria S et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Ann Oncol 2015; 26(2): 259–271. doi: 10.1093/annonc/mdu450.
65. Campbell MJ, Baehner F, O'Meara T et al. Characterizing the immune microenvironment in high-risk ductal carcinoma in situ of the breast. Breast Cancer Res Treat 2017; 161(1): 17–28. doi: 10.1007/s10549-016-4036-0.
66. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. N Engl J Med 2003; 348(3): 203–213. doi: 10.1056/NEJMoa020177.
67. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. Gynecol Oncol 2012; 124(2): 192–198. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.09.039.
68. Preston CC, Maurer MJ, Oberg AL et al. The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer. PLoS One 2013; 8(11): e80063. doi: 10.1371/journal.pone.0080063.
69. Shah CA, Allison KH, Garcia RL et al. Intratumoral T cells, tumor-associated macrophages, and regulatory T cells: association with p53 mutations, circulating tumor DNA and survival in women with ovarian cancer. Gynecol Oncol 2008; 109(2): 215–219. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.01.010.
70. Bohm S, Montfort A, Pearce OM et al. Neoadjuvant Chemotherapy Modulates the Immune Microenvironment in Metastases of Tubo-Ovarian High-Grade Serous Carcinoma. Clin Cancer Res 2016; 22(12): 3025–3036. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2657.
71. Mesnage SJL, Auguste A, Genestie C et al. Neoadjuvant chemotherapy (NACT) increases immune infiltration and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial ovarian cancer (EOC). Ann Oncol 2017; 28(3): 651–657. doi: 10.1093/annonc/mdw625.
72. Lo CS, Sanii S, Kroeger DR et al. Neoadjuvant Chemotherapy of Ovarian Cancer Results in Three Patterns of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Response with Distinct Implications for Immunotherapy. Clin Cancer Res 2017; 23(4): 925–934. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1433.
73. Cancer Genome Atlas Research N. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. Nature 2011; 474(7353): 609–615. doi: 10.1038/nature10166.
74. George J, Alsop K, Etemadmoghadam D et al. Nonequivalent gene expression and copy number alterations in high-grade serous ovarian cancers with BRCA1 and BRCA2 mutations. Clin Cancer Res 2013; 19(13): 3474–3484. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0066.
75. Clarke B, Tinker AV, Lee CH et al. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. Mod Pathol 2009; 22(3): 393–402. doi: 10.1038/modpathol.2008.191.
76. Soslow RA, Han G, Park KJ et al. Morphologic patterns associated with BRCA1 and BRCA2 genotype in ovarian carcinoma. Mod Pathol 2012; 25(4): 625–636. doi: 10.1038/modpathol.2011.183.
77. Stumpf M, Hasenburg A, Riener MO et al. Intraepithelial CD8-positive T lymphocytes predict survival for patients with serous stage III ovarian carcinomas: relevance of clonal selection of T lymphocytes. Br J Cancer 2009; 101(9): 1513–1521. doi: 10.1038/sj.bjc.6605274.
78. Darb-Esfahani S, Kunze CA et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. Oncotarget 2016; 7(2): 1486–1499. doi: 10.18632/oncotarget.6429.
79. Hagemann AR, Hagemann IS, Cadungog M et al. Tissue-based immune monitoring II: multiple tumor sites reveal immunologic homogeneity in serous ovarian carcinoma. Cancer Biol Ther 2011; 12(4): 367–377.
80. Barnett JC, Bean SM, Whitaker RS et al. Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. Gynecol Oncol 2010; 116(3): 556–562. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.11.020.
81. Milne K, Kobel M, Kalloger SE et al. Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. PLoS One 2009; 4(7): e6412. doi: 10.1371/journal.pone.0006412.
82. Hermans C, Anz D, Engel J et al. Analysis of FoxP3+ T-regulatory cells and CD8+ T-cells in ovarian carcinoma: location and tumor infiltration patterns are key prognostic markers. PLoS One 2014; 9(11): e111757. doi: 10.1371/journal.pone.0111757.
83. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K et al. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. Clin Cancer Res 2012; 18(12): 3281–3292. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0234.
84. Kroeger DR, Milne K, Nelson BH. Tumor-Infiltrating Plasma Cells Are Associated with Tertiary Lymphoid Structures, Cytolytic T-Cell Responses, and Superior Prognosis in Ovarian Cancer. Clin Cancer Res 2016; 22(12): 3005–3015. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2762.
85. Shia J, Black D, Hummer AJ et al. Routinely assessed morphological features correlate with microsatellite instability status in endometrial cancer. Hum Pathol 2008; 39(1): 116–125. doi: 10.1016/j.humpath.2007.05.022.
86. Garg K, Leitao MM Jr, Kauff ND et al. Selection of endometrial carcinomas for DNA mismatch repair protein immunohistochemistry using patient age and tumor morphology enhances detection of mismatch repair abnormalities. Am J Surg Pathol 2009; 33(6): 925–933. doi: 10.1097/PAS.0b013e318197a046.
87. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. Nature 2013; 497(7447): 67–73. doi: 10.1038/nature12113.
88. Church DN, Stelloo E, Nout RA et al. Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer. J Natl Cancer Inst 2015; 107(1): 402. doi: 10.1093/jnci/dju402.
89. Cermakova P, Melichar B, Tomsova M et al. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with endometrial carcinoma. Anticancer Res 2014; 34(10): 5555–5561.
90. de Jong RA, Leffers N, Boezen HM et al. Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. Gynecol Oncol 2009; 114(1): 105–110. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.03.022.
91. Suemori T, Susumu N, Iwata T et al. Intratumoral CD8+ Lymphocyte Infiltration as a Prognostic Factor and Its Relationship With Cyclooxygenase 2 Expression and Microsatellite Instability in Endometrial Cancer. Int J Gynecol Cancer 2015; 25(7): 1165–1172. doi: 10.1097/IGC.0000000000000482.
92. Howitt BE, Shukla SA, Sholl LM et al. Association of Polymerase e-Mutated and Microsatellite-Instable Endometrial Cancers With Neoantigen Load, Number of Tumor-Infiltrating Lymphocytes, and Expression of PD-1 and PD-L1. JAMA Oncol 2015; 1(9): 1319–1323. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.2151.
93. Le DT, Uram JN, Wang H et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N Engl J Med 2015; 372(26): 2509–2520. doi: 10.1056/NEJMoa1500596.
94. van Gool IC, Eggink FA, Freeman-Mills L et al. POLE Proofreading Mutations Elicit an Antitumor Immune Response in Endometrial Cancer. Clin Cancer Res 2015; 21(14): 3347–3355. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0057.
95. Ino K, Yamamoto E, Shibata K et al. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. Clin Cancer Res 2008; 14(8): 2310–2317. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4144.
96. Workel HH, Komdeur FL, Wouters MC et al. CD103 defines intraepithelial CD8+ PD1+ tumour-infiltrating lymphocytes of prognostic significance in endometrial adenocarcinoma. Eur J Cancer 2016; 60: 1–11. doi: 10.1016/j.ejca.2016.02.026.
97. Yamagami W, Susumu N, Tanaka H et al. Immunofluorescence-detected infiltration of CD4+FOXP3+ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. Int J Gynecol Cancer 2011; 21(9): 1628–1634. doi: 10.1097/IGC.0b013e31822c271f.
98. Zeng DQ, Yu YF, Ou QY et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer. Oncotarget 2016; 7(12): 13765–13781. doi: 10.18632/oncotarget.7282.
99. Remark R, Becker C, Gomez JE et al. The non-small cell lung cancer immune contexture. A major determinant of tumor characteristics and patient outcome. Am J Respir Crit Care Med 2015; 191(4): 377–390. doi: 10.1164/rccm.201409-1671PP.
100. Rehman JA, Han G, Carvajal-Hausdorf DE et al. Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer. Mod Pathol 2017; 30(3): 340–349. doi: 10.1038/modpathol.2016.186.
101. Pichler R, Fritz J, Zavadil C et al. Tumor-infiltrating immune cell subpopulations influence the oncolo-

gic outcome after intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy in bladder cancer. Oncotarget 2016; 7(26): 39916–39930. doi: 10.18632/oncotarget.9537.

102. Horn T, Laus J, Seitz AK et al. The prognostic effect of tumour-infiltrating lymphocytic subpopulations in bladder cancer. World J Urol 2016; 34(2): 181–187. doi: 10.1007/s00345-015-1615-3.

103. Baras AS, Drake C, Liu JJ et al. The ratio of CD8 to Treg tumor-infiltrating lymphocytes is associated with response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in patients with muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder. Oncoimmunology 2016; 5(5): e1134412. doi: 10.1080/2162402X.2015.1134412.

104. Gannon PO, Poisson AO, Delvoye N et al. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. J Immunol Methods 2009; 348(1–2): 9–17. doi: 10.1016/j.jim.2009.06.004.

105. Geissler K, Fornara P, Lautenschlager C et al. Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer. Oncoimmunology 2015; 4(1): e985082. doi: 10.4161/2162402X.2014.985082.

106. Baine MK, Turcu G, Zito CR et al. Characterization of tumor infiltrating lymphocytes in paired primary and metastatic renal cell carcinoma specimens. Oncotarget 2015; 6(28): 24990–5002.

107. Gieryng A, Pszczolkowska D, Walentynowicz KA et al. Immune microenvironment of gliomas. Lab Invest 2017; 97(5): 498–518. doi: 10.1038/labinvest.2017.19.

108. Bienkowski M, Preusser M. Prognostic role of tumour-infiltrating inflammatory cells in brain tumours: literature review. Curr Opin Neurol 2015; 28(6): 647–658. doi: 10.1097/WCO.0000000000000251.

109. Gajewski TF, Louahed J, Brichard VG. Gene signature in melanoma associated with clinical activity: a potential clue to unlock cancer immunotherapy. Cancer J 2010; 16(4): 399–403. doi: 10.1097/PPO.0b013e3181eacbd8.

110. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature 2014; 515(7528): 563–567. doi: 10.1038/nature14011.

111. Ji RR, Chasalow SD, Wang L et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. Cancer Immunol Immunother 2012; 61(7): 1019–1031. doi: 10.1007/s00262-011-1172-6.

112. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Nature 2017; 541(7637): 321–330. doi: 10.1038/nature21349.

113. Inoue H, Tani K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. Cell Death Differ 2014; 21(1): 39–49. doi: 10.1038/cdd.2013.84.

114. Garg AD, Dudek-Peric AM, Romano E et al. Immunogenic cell death. Int J Dev Biol 2015; 59(1–3): 131–140. doi: 10.1387/ijdb.150061pa.

115. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med 2013; 19(11): 1423–1437. doi: 10.1038/nm.3394.

116. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer 2012; 12(4): 298–306. doi: 10.1038/nrc3245.

117. Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss SJ. Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. J Cell Biol 2009; 185(1): 11–19. doi: 10.1083/jcb.200807195.

118. Angelosanto JM, Blackburn SD, Crawford A et al. Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection. J Virol 2012; 86(15): 8161–8170. doi: 10.1128/JVI.00889-12.