

УДК 616.345-006.6-04-076-092.6-085-089.86+612.017.1+576.385
DOI: 10.56871/RBR.2023.82.53.002

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ LAG-3 У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

© Андрей Валерьевич Четверяков, Виктор Львович Цепелев

Читинская государственная медицинская академия. 672000, г. Чита, ул. Горького, 39а

Контактная информация: Андрей Валерьевич Четверяков — аспирант кафедры госпитальной хирургии. E-mail: yasnogorsk94@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-8472-107X

Для цитирования: Четверяков А.В., Цепелев В.Л. Патогенетическое значение LAG-3 у пациентов с колоректальным раком // Российские биомедицинские исследования. 2023. Т. 8. № 2. С. 12–17. DOI: <https://doi.org/10.56871/RBR.2023.82.53.002>

Поступила: 06.03.2023

Одобрена: 05.04.2023

Принята к печати: 10.05.2023

Резюме. Введение. Ген активации лимфоцитов-3 (Lymphocyte-activation gene 3, LAG-3) участвует в ингибировании Т-клеточного иммунного ответа. Данный механизм используют опухолевые клетки для «ускользания» от иммунного надзора. Роль LAG-3 в канцерогенезе при различных локализациях требует дальнейшего изучения. **Цель исследования.** Оценка уровня LAG-3 в сыворотке крови, ткани опухоли и лимфатических узлов у пациентов с новообразованиями толстой кишки. **Материалы и методы.** Под наблюдением находились 44 пациента с колоректальным раком, а также 25 больных с доброкачественными новообразованиями толстой кишки, проходивших лечение в ГУЗ «Краевой онкологический диспансер» г. Читы в период с 2019 по 2020 гг. Контрольная группа включала 25 пациентов, которым выполняли пластику колостомы, сформированной ранее по поводу травмы толстой кишки. Концентрацию LAG-3 определяли в сыворотке крови, в супернатанте гомогенате ткани опухоли и лимфатических узлов с помощью метода проточной цитофлуориметрии. **Результаты.** Уровень LAG-3 в сыворотке крови у пациентов с раком толстой кишки превышал данный показатель группы контроля в 2,42 раза ($p = 0,02$). Концентрация LAG-3 в сыворотке крови у больных с колоректальным раком выше в 2,39 раза ($p = 0,01$) по отношению к группе пациентов с доброкачественной опухолью толстой кишки. Уровень LAG-3 в ткани опухоли у пациентов с раком толстой кишки больше в 5,15 раза ($p < 0,001$), чем в группе контроля. Концентрация LAG-3 в ткани лимфатических узлов у пациентов со злокачественным новообразованием составила 835,2 пг/мл. **Заключение.** Результаты исследований показывают увеличение уровня LAG-3 в сыворотке крови у больных раком толстой кишки в сравнении с контрольной группой. Отмечено также увеличение концентрации LAG-3 в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком. Полученные данные могут быть использованы при назначении таргетной терапии у данной категории больных.

Ключевые слова: колоректальный рак; LAG-3; иммунитет; иммунные контрольные точки.

PATHOGENETIC SIGNIFICANCE OF LAG-3 IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

© Andrey V. Chetveryakov, Victor L. Tsepelev

Chita State Medical Academy. Gorky str., 39a, Chita, Russian Federation, 672000

Contact information: Andrey V. Chetveryakov — Postgraduate Student, Department of Hospital Surgery. E-mail: yasnogorsk94@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-8472-107X

For citation: Chetveryakov AV, Tsepelev VL. Pathogenetic significance of LAG-3 in patients with colorectal cancer // Russian biomedical research (St. Petersburg). 2023; 8(2): 12–17. DOI: <https://doi.org/10.56871/RBR.2023.82.53.002>

Received: 06.03.2023

Revised: 05.04.2023

Accepted: 10.05.2023

Abstract. Background. The lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) is involved in inhibiting the T-cell immune response. This mechanism is used by tumor cells to «escape» from immunity. The role of LAG-3 in carcinogenesis at various localizations requires further research. **Aim.** We aimed to assess LAG-3 level in blood serum and tumor tissue in patients with tumor of

the colon. **Materials and methods.** The study was carried out in the Regional Oncology Dispensary in Chita and included 44 patients with colorectal cancer and 25 patients with benign tumor of the colon who were treated between 2019 to 2020. The control group comprised 25 patients who had been operated due to colon injury at the Regional Clinical Hospital in Chita. We determined LAG-3 concentration in blood serum, the supernatant of the homogenate of tumor tissue and lymph nodes using the flow cytometry method on the CytoFlex LX analyzer (Beckman Coulter, USA), using the LEGENDplex™ HU multiplex analysis kit (Immune Checkpoint, USA). The statistical significance of the differences was determined by the nonparametric Mann-Whitney U test. **Results.** The level of LAG-3 in the blood serum of patients with colon cancer exceeded this indicator in the control group by 2.42 times ($p=0.02$). The concentration of LAG-3 in the blood serum of patients with colorectal cancer was 2.39 times higher ($p=0.01$) compared to the group of patients with benign colon tumor. LAG-3 level in tumor tissue in patients with colon cancer was 5.15 times higher ($p<0.001$) than in the control group. The concentration of LAG-3 in the lymph node tissue in patients with malignant neoplasm was 835.2 pg/ml. **Conclusion.** The data obtained demonstrated an increase in LAG-3 level in blood serum in patients with colorectal cancer in comparison with the control group. There was also an increase in the concentration of LAG-3 in tumor tissue in patients with colorectal cancer. The obtained data can be used in the administration of targeted therapy for this group of patients.

Key words: colorectal cancer; LAG-3; immunity; immune control check points.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время ведется активное изучение механизмов ингибирования Т-клеточного иммунного ответа у больных со злокачественными новообразованиями различной локализации. Установлено, что данную роль выполняют контрольные иммунные точки, которые способствуют «ускользанию» злокачественных клеток от иммунного надзора [1]. Одной из таких молекул является ген активации лимфоцитов-3 (Lymphocyte activation gene 3, LAG-3, CD223) [2, 3]. Экспрессия LAG-3 отмечается на поверхности Т-клеток, естественных киллеров (natural killers, NK-cell) и дендритных клеток (dendritic cells, DCs). Молекула LAG-3 связывается с главным комплексом гистосовместимости-II (Major histocompatibility complex-II, MHC-II) на поверхности антиген презентующих клеток (АПК), что исключает взаимодействие Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) сMHC-II и приводит к подавлению активации Т-клеток [4]. Отмечено, что LAG-3 эффективно предупреждает развитие аутоиммунных реакций. Однако его уникальность и способность взаимодействовать с MHC-II используется опухолевыми клетками для «ускользания» от иммунного ответа [5]. Установлена повышенная экспрессия LAG-3 в ткани опухоли у пациентов с раком яичников, желудка, молочной железы, поджелудочной железы, у больных с меланомой [6–8]. В исследованиях R. Agocs (2021) получены данные о высокой экспрессии LAG-3 в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком (КРР). Автор также отмечает, что высокая экспрессия вышеуказанной молекулы может быть использована как прогностический биомаркер [9]. Дальнейшее изучение роли LAG-3 в канцерогенезе при КРР является актуальным.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью нашей работы явилось изучение уровня LAG-3 в сыворотке крови, ткани опухоли и лимфатических узлов у больных с новообразованиями толстого кишечника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на базе ГУЗ «Краевой онкологический диспансер» г. Читы, включало 44 пациента с колоректальным раком, а также 25 больных с доброкачественными новообразованиями толстой кишки, проходивших лечение в период с 2019 по 2020 гг. Контрольная группа включала 25 пациентов, проходивших лечение (пластика колостомы, сформированной ранее по поводу травм толстой кишки) в ГУЗ «Краевая клиническая больница» г. Читы. Пациенты были обследованы в соответствии с клиническими рекомендациями, утвержденными Минздравом России [10]. Исследование выполнено согласно требованиям комиссии по этике ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, а также в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013). *Критерием включения* в исследование явилось согласие пациента на участие в исследовании, наличие опухоли толстой кишки. *Критерии исключения:* пациенты с положительным ВИЧ-статусом, аутоиммунными заболеваниями, вирусными и бактериальными инфекциями, а также больные, проходившие курс химиотерапевтического или лучевого лечения перед оперативным пособием.

При гистологическом исследовании в 39 случаях (88,6%) ткань опухоли была представлена умеренно дифференцированной аденокарциномой (G2), в трех случаях (6,8%) — высокодифференцированной аденокарциномой (G1), в двух случаях (4,6%) — низкодифференцированной аденокарциномой (G3). У 6 пациентов диагностирована I стадия процесса, у 24 — II стадия, у 8 — III стадия и у 6 — IV стадия рака.

Забор крови проводили за 2 часа до начала оперативного вмешательства. Биоптаты ткани опухоли и ткани лимфатических узлов массой до 1 г гомогенизировали при помощи гомогенизатора Ultra-Turax T 10 basic (IKA, Германия) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), далее центрифугировали при 5000 об./мин в течение 10 минут и отбирали супернатант. Концентрацию

LAG-3 в сыворотке крови и супернатанте тканей определяли методом проточной цитофлуориметрии на анализаторе CytoFlex LX (Beckman Coulter, США), используя набор для мультиплексного анализа LEGENDplex™ HU (Immune Checkpoint, США) в соответствии с инструкциями производителя.

При проведении статистического анализа руководствовались принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы публикуемой литературы» (SAMPL) [11, 12]. Номинальные данные описывали с указанием абсолютных значений и процентных долей. Номинальные данные описывали с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение результатов исследования проводили при помощи критерия χ^2 Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы [13]. Нормальность распределения количественных признаков при численности исследуемых групп менее 50 человек оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Учитывая распределение признаков, отличное от нормального во всех исследуемых группах, полученные данные представляли в виде медианы, первого и третьего квартилей: Me [Q₁; Q₃]. Ранговый анализ вариаций по Краскелу–Уоллису (H) выполняли для сравнения трех независимых групп по одному количественному признаку. Затем, при наличии статистически значимых различий, с учетом поправки Бонферрони, проводили попарное сравнение с помощью критерия Манна–Уитни [14]. Для определения фактической степени параллелизма между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена. Силу связи между исследуемыми параметрами определяли по шкале Чеддока [15]. Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (International Business Machines Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами установлено, что уровень LAG-3 в сыворотке крови у пациентов с раком толстой кишки превышал данный по-

казатель группы контроля в 2,42 раза [1,69; 3,44] ($U = 273,5$, $p = 0,02$). Концентрация LAG-3 в сыворотке крови у больных с KPP выше в 2,39 раза [1,5; 3,29] по отношению к группе пациентов с доброкачественной опухолью толстой кишки ($U = 266,0$, $p = 0,01$). Следует отметить, что уровень данной молекулы у пациентов контрольной группы и больных с доброкачественной опухолью толстой кишки не имел статистически значимых различий ($U = 189,0$, $p = 0,78$) (табл. 1).

Аналогичная динамика наблюдалась при исследовании данной молекулы в ткани новообразования. Уровень LAG-3 в ткани опухоли у пациентов с раком толстой кишки был выше в 5,15 раза [4,09; 7,13] по сравнению с группой контроля ($U = 23,0$, $p < 0,001$). Концентрация LAG-3 в ткани новообразования у больных с KPP была выше в 1,8 раза [1,43; 2,58] по отношению к группе больных с доброкачественной опухолью толстой кишки ($p = 0,008$). У пациентов с KPP определяли концентрацию LAG-3 в ткани регионарных лимфатических узлов, уровень которой составил 835,2 [708,5; 1082,2] пг/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наши исследования показали, что у больных с раком толстой кишки концентрация растворимой формы молекулы LAG-3 в сыворотке крови была выше, чем в группе контроля и в группе пациентов с доброкачественной опухолью толстой кишки. Увеличение концентрации данного белка отмечено в исследовании Ying Peng (2022) у пациентов с немелкоклеточным раком легкого [16], а также у больных раком желудка [17]. Аналогичная динамика зарегистрирована нами при исследовании данной молекулы в ткани опухоли. Данные об увеличении экспрессии LAG-3 в опухолевой ткани получены также у пациентов с В-клеточной лимфомой, раком легкого и яичников [18].

Белки MHC-II и фибриногеноподобный белок 1 (fibrinogen-likeprotein 1, FGL-1) являются лигандами для LAG-3 [4]. На ранней стадии онкогенеза MHC-II рекрутирует CD4+ Т-клетки и усиливает противоопухолевый иммунный ответ. Вместе с тем после связывания MHC-II с LAG-3 включаются механизмы иммуносупрессии, сопровождающиеся нарушением пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов. Установлено, что экспрессирующие MHC-II клетки меланомы блокируют функции

Таблица 1

Уровень LAG-3 у больных с новообразованиями толстого кишечника.

Table 1

LAG-3 level in patients with colon tumor

Концентрация LAG-3 (пг/мл)	Группы исследуемых пациентов			Тестовая статистика, df = 2
	контрольная группа, n = 25	доброкачественная опухоль, n = 25	колоректальный рак, n = 44	
Сыворотка крови	15,0 [14,5; 20,8]	15,2 [15,1; 23,4]	36,3 [35,1; 49,7]	H = 9,3 p = 0,009
Ткань опухоли	16,8 [16,5; 20,1]	46,4 [45,6; 57,5]	86,6 [82,3; 117,7]	H = 42,7 p < 0,001

Примечание: H — критерий Краскела–Уоллиса; p — уровень значимости различий.



проникающих в опухоль CD4+Т-клеток, тем самым уклоняясь от распознавания и уничтожения иммунной системой [19, 20]. Следует уделить внимание факту высокой экспрессии LAG-3 на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (Tumor-infiltrating lymphocytes, TILs). В частности, повышенный уровень экспрессии LAG-3 зарегистрирован у пациентов с немелкоклеточным раком легкого, саркомой мягких тканей, раком яичников, меланомой [18, 21]. Повышенная экспрессия LAG-3, обнаруживаемая на Т-клетках, является маркером агрессивного течения злокачественного новообразования и влияет на выживаемость и прогноз для пациентов [22]. К тому же, некоторыми авторами отмечено участие LAG-3 в дифференцировке регуляторных Т-клеток (Treg), которые способствуют развитию иммуносупрессии. В то же время блокада LAG-3 препятствует индукции Treg [23]. Особый интерес вызывает способность молекулы LAG-3 взаимодействовать с другими иммунными контрольными точками, в особенности с PD-1 (programmed cell death-1, PD-1). Такое взаимодействие приводит к комбинированному подавляющему эффекту в отношении TCR и Т-клеточного иммунного ответа в целом [24].

Таким образом, наши исследования показали, что молекула LAG-3 играет значимую роль в механизмах канцерогенеза и является перспективной иммунотерапевтической мишенью при колоректальном раке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований демонстрируют увеличение уровня LAG-3 в сыворотке крови и ткани опухоли у больных с КРР в сравнении с контрольной группой. Полученные данные могут быть использованы при назначении таргетной терапии у данной категории больных.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Информированное согласие на публикацию. Авторы получили письменное согласие пациентов на публикацию медицинских данных.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article,

final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Consent for publication. Written consent was obtained from the patient for publication of relevant medical information within the manuscript.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klapholz M. Presence of Tim3 + and PD-1 + CD8 + T cells identifies microsatellite stable colorectal carcinomas with immune exhaustion and distinct clinicopathological features *The Journal of Pathology*. 2022. DOI: 10.1002/path.5877.
2. Liao X. A Review of emerging biomarkers for immune checkpoint inhibitors in tumors of the gastrointestinal tract. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2022; 28: e935348-1. DOI: 10.12659/MSM.935348.
3. Yadav D. Cancer immunotherapy by immune checkpoint blockade and its advanced application using bio-nanomaterials. *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press. 2022.
4. Guy C., Mitrea D.M., Chou P.C. et al. LAG3 associates with TCR-CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor-Lck dissociation. *Nature Immunology*. 2022; 23(5): 757–67. DOI: 10.1038/s41590-022-01176-4.
5. Jonkman T.H., Dekkers K.F., Sliker R.C. et al. Functional genomics analysis identifies T and NK cell activation as a driver of epigenetic clock progression. *Genome biology*. 2022; 23(1): 1–21. DOI: 10.1186/s13059-021-02585-8.
6. Mehdizadeh S., Bayatipoor H., Pashangzadeh S. et al. Immune checkpoints and cancer development: Therapeutic implications and future directions. *Pathol Res Pract*. 2021; 223: 153485. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153485.
7. Fucikova J. Immunological control of ovarian carcinoma by chemotherapy and targeted anticancer agents. *Trends in Cancer*. 2022; DOI: 10.1016/j.trecan.2022.01.010.
8. Zhou C. Monitoring pre-and post-operative immune alterations in patients with locoregional colorectal cancer who underwent laparoscopy by single-cell mass cytometry. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13: 807539–807539.
9. Rhyner Agocs G., Assarzagdegan N., Kirsch R. et al. LAG-3 Expression Predicts Outcome in Stage II Colon Cancer. *Journal of personalized medicine*. 2021; 11(8): 749. DOI: 10.3390/jpm11080749.
10. Общероссийский национальный союз. Ассоциация онкологов России. Злокачественные новообразования ободочной кишки и ректосигмоидного отдела. Клинические рекомендации. 2020.
11. Alshogran O.Y., Al-Delaimy W.K. Understanding of international committee of medical journal editor's authorship criteria among faculty members of pharmacy and other health sciences in Jordan. *J Empir Res Hum Res Ethics*. 2018; 13(3): 276-84. DOI: 10.1177/1556264618764575.

12. Lang T.A., Altman D.G. Basic statistical reporting for articles published in biomedical journals: Statistical analyses and methods in the published literature or the SAMPL guidelines. *Int J Nurs Stud.* 2015; 52(1): 5–9. DOI: 10.1016/j.ijnurstu.2014.09.006.
13. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа количественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS. *Забайкальский медицинский вестник.* 2020; 1: 140–50.
14. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа качественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS. *Забайкальский медицинский вестник.* 2020; 1: 151–63.
15. Мудров В.А. Алгоритмы корреляционного анализа данных в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS. *Забайкальский медицинский вестник.* 2020; 2: 169–76.
16. Peng Y., Zhang C., Rui Z. et al. A comprehensive profiling of soluble immune checkpoints from the sera of patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Lab Anal.* 2022; 36(2): e24224. DOI: 10.1002/jcla.24224.
17. Li N. Soluble LAG-3 acts as a potential prognostic marker of gastric cancer and its positive correlation with CD8+ T cell frequency and secretion of IL-12 and INF- γ in peripheral blood. 2018; 341–51. DOI: 10.3233/CBM-181278.
18. Chen F. Immunohistochemistry analyses of LAG-3 expression across different tumor types and co-expression with PD-1. *J Clin Oncol.* 2020; 38(15): e15086–e15086. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e15086.
19. Baleeiro R.B., Bouwens C.J., Liu P. et al. MHC class II molecules on pancreatic cancer cells indicate a potential for neo-antigen-based immunotherapy. *Onc Immunology.* 2022; 11(1): 2080329. DOI: 10.1080/2162402x2022.2080329.
20. Pyke R.M. Evolutionary pressure against MHC class II binding cancer mutations. *Cell.* 2018; 175(2): 416–28. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.048.
21. Karlsson J. Molecular profiling of driver events in metastatic uveal melanoma *Nature communications.* 2020; 11(1): 1–13.
22. Gertel S., Polachek A., Elkayam O. Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) regulatory T cells: An evolving biomarker for treatment response in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews.* 2022; 21(6): 103085. DOI: 10.1016/j.autrev.2022.103085.
23. Tawbi H.A., Schadendorf D., Lipson E.J. et al. Relatlimab and nivolumab versus nivolumab in untreated advanced melanoma. *New England Journal of Medicine.* 2021; 386(1): 24–34.
24. Edwards C.J., Sette A., Cox C. et al. The multi-specific VH-based Humabody CB213 co-targets PD1 and LAG3 on T cells to promote anti-tumour activity. *British journal of cancer.* 2022; 126(8): 1168–77. DOI: 10.1038/s41416-021-01684-4.
25. Liao X. A Review of emerging biomarkers for immune checkpoint inhibitors in tumors of the gastrointestinal tract. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research.* 2022; 28: e935348-1. DOI: 10.12659/MSM.935348.
26. Yadav D. Cancer immunotherapy by immune checkpoint blockade and its advanced application using bio-nanomaterials. *Seminars in Cancer Biology.* Academic Press. 2022.
27. Guy C., Mitrea D.M., Chou P.C. et al. LAG3 associates with TCR-CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor-Lck dissociation. *Nature Immunology.* 2022; 23(5): 757–67. DOI: 10.1038/s41590-022-01176-4.
28. Jonkman T.H., Dekkers K.F., Sliker R.C. et al. Functional genomics analysis identifies T and NK cell activation as a driver of epigenetic clock progression. *Genome biology.* 2022; 23(1): 1–21. DOI: 10.1186/s13059-021-02585-8.
29. Mehdizadeh S., Bayatipoor H., Pashangzadeh S. et al. Immune checkpoints and cancer development: Therapeutic implications and future directions. *Pathol Res Pract.* 2021; 223: 153485. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153485.
30. Fucikova J. Immunological control of ovarian carcinoma by chemotherapy and targeted anticancer agents. *Trends in Cancer.* 2022; DOI: 10.1016/j.trecan.2022.01.010.
31. Zhou C. Monitoring pre-and post-operative immune alterations in patients with locoregional colorectal cancer who underwent laparoscopy by single-cell mass cytometry. *Frontiers in immunology.* 2022; 13: 807539–807539.
32. Rhyner Agoecs G., Assarzagdegan N., Kirsch R. et al. LAG-3 Expression Predicts Outcome in Stage II Colon Cancer. *Journal of personalized medicine.* 2021; 11(8): 749. DOI: 10.3390/jpm11080749.
33. Obshcherossiyskiy natsional'nyy soyuz. Assotsiatsiya onkologov Rossii. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya obodochnoy kishki i rektosigmoidnogo otdela [Malignant neoplasms of the colon and rectosigmoid]. *Klinicheskiye rekomendatsii.* 2020. (in Russian).
34. Alshogran O.Y., Al-Delaimy W.K. Understanding of international committee of medical journal editor's authorship criteria among faculty members of pharmacy and other health sciences in Jordan. *J Empir Res Hum Res Ethics.* 2018; 13(3): 276-84. DOI: 10.1177/1556264618764575.
35. Lang T.A., Altman D.G. Basic statistical reporting for articles published in biomedical journals: Statistical analyses and methods in the published literature or the SAMPL guidelines. *IntJNursStud.* 2015; 52(1): 5–9. DOI: 10.1016/j.ijnurstu.2014.09.006.
36. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа количественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS [Algorithms for statistical analysis of quantitative traits in biomedical research using the SPSS software package]. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik.* 2020; 1: 140–50. (in Russian).
37. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа качественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS [Algorithms for statistical analysis of qualitative features in biomedical research using the SPSS software package]. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik.* 2020; 1: 151–63. (in Russian).

REFERENCES

1. Klapholz M. Presence of Tim3 + and PD-1 + CD8 + T cells identifies microsatellite stable colorectal carcinomas with immune exhaustion and distinct clinicopathological features *The Journal of Pathology.* 2022. DOI: 10.1002/path.5877.



15. Mudrov V.A. Algoritmy korrelyatsionnogo analiza dannykh v biomeditsinskikh issledovaniyakh s pomoshch'yu paketa programm SPSS [Algorithms for correlation analysis of data in biomedical research using the SPSS software package]. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2020; 2: 169–76. (in Russian).
16. Peng Y., Zhang C., Rui Z. et al. A comprehensive profiling of soluble immune checkpoints from the sera of patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Lab Anal*. 2022; 36(2): e24224. DOI: 10.1002/jcla.24224.
17. Li N. Soluble LAG-3 acts as a potential prognostic marker of gastric cancer and its positive correlation with CD8⁺ cell frequency and secretion of IL-12 and INF- γ in peripheral blood. 2018; 341–51. DOI: 10.3233/CBM-181278.
18. Chen F. Immunohistochemistry analyses of LAG-3 expression across different tumor types and co-expression with PD-1. *J Clin Oncol*. 2020; 38(15): e15086–e15086. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e15086.
19. Baleeiro R.B., Bouwens C.J., Liu P. et al. MHC class II molecules on pancreatic cancer cells indicate a potential for neo-antigen-based immunotherapy. *Oncolmmunology*. 2022; 11(1): 2080329. DOI: 10.1080/2162402x2022.2080329.
20. Pyke R.M. Evolutionary pressure against MHC class II binding cancer mutations. *Cell*. 018; 175(2): 416–28. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.048.
21. Karlsson J. Molecular profiling of driver events in metastatic uveal melanoma *Nature communications*. 2020; 11(1): 1–13.
22. Gertel S., Polachek A., Elkayam O. Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) regulatory T cells: An evolving biomarker for treatment response in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2022; 21(6): 103085. DOI: 10.1016/j.autrev.2022.103085.
23. Tawbi H.A., Schadendorf D., Lipson E.J. et al. Relatlimab and nivolumab versus nivolumab in untreated advanced melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2021; 386(1): 24–34.
24. Edwards C.J., Sette A., Cox C. et al. The multi-specific VH-based Humabody CB213 co-targets PD1 and LAG3 on T cells to promote anti-tumour activity. *British journal of cancer*. 2022; 126(8): 1168–77. DOI: 10.1038/s41416-021-01684-4.