

На правах рукописи

Романова Елена Викторовна

**ФАКТОРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭОЗИНОФИЛОВ И ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА**

3.3.3. Патологическая физиология

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Колобовникова
Юлия Владимировна

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Уразова
Ольга Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
руководитель лаборатории клеточно-молекулярной
физиологии и патологии
НИИ медицинских проблем Севера –
обособленного подразделения
ФИЦ КНЦ СО РАН

Савченко
Андрей Анатольевич

доктор медицинских наук, ведущий
научный сотрудник отделения общей и молекулярной
патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ

Кайгородова
Евгения Викторовна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Защита состоится «__» _____ 2022 года в __. __ часов на заседании диссертационного совета 21.2.096.01 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России) по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Реципрокные динамические взаимодействия опухолевых клеток с элементами микроокружения в значительной степени определяют особенности патогенеза опухолевого заболевания, его клиническое течение и эффективность проводимой противоопухолевой терапии.

В состав опухолевого микроокружения при раке толстого кишечника входят эозинофилы – основные тканевые лейкоциты желудочно-кишечного тракта, наделенные широким арсеналом рецепторных структур и компонентов гранул [Yellapurkar S. et al., 2016; Xing Y. et al., 2016; Hu G. et al., 2020; Choudhary N. et al., 2021]. В современной литературе роль эозинофила, как элемента опухолевого микроокружения, рассматривается неоднозначно. Опухолевые клетки, выделяя хемоаттрактанты, способны привлекать эозинофилы и использовать их для собственного выживания [Jain M. et al., 2014; Peurala E. et al., 2018].

Ключевым фактором рекрутирования эозинофилов в ткани является эотаксин-1 – CCL (C-C motif chemokine ligand) 11, проявляющий высокую селективность в отношении своего рецептора CCR (C-C Chemokine Receptor type) 3, при участии которого происходят хемотаксис, активация и дегрануляция эозинофилов [Uhm T. G. et al., 2012; Wang T. et al., 2016; Grozdanovic M. et al., 2018].

Эффективность эотаксин-зависимой миграции эозинофилов в ткани может зависеть от действия других медиаторов, выделяемых опухолевыми клетками. К таким факторам относят галектины – β -галактозид-связывающие белки, которые опосредуют перекрестное взаимодействие гликан-содержащих структур в составе цитокиновых и хемокиновых рецепторов, и, тем самым, модулируют ответ клеток на действие соответствующих лигандов [Fortuna-Costa A. et al., 2014]. По данным X. N. Ge et al. (2013), высокая экспрессия галектина-3 усиливает эотаксин-1-опосредованный хемотаксис эозинофилов [Ge X. N. et al., 2013]. В отношении галектина-1 сведения литературы малочисленные и противоречивые, одни авторы указывают на способность данного лектина к привлечению и активации эозинофилов [Ge X. N. et al., 2016], другие – приводят данные о негативной регуляции галектин-1-опосредованного рекрутирования эозинофилов в ткани [Rao S. P. et al., 2017]. Эозинофилы способны экспрессировать галектин-3, связывающийся с молекулами VCAM (vascular cell adhesion molecule) 1 и галектином-3 на поверхности эндотелиоцитов, что обеспечивает их адгезию и миграцию в ткани с последующей реализацией функций [Ge X. N. et al., 2013].

В составе опухолевого микроокружения эозинофилы могут проявлять цитотоксическое повреждающее действие в отношении злокачественно трансформированных клеток. В *in vitro* сокультивировании эозинофилов с клеточной линией колоректального рака COLO 205 показана гиперсекреция гранулоцитами эозинофильной пероксидазы (EPX – eosinophil peroxidase), эозинофильного нейротоксина, гранзима А и фактора некроза опухоли (TNF – tumor necrosis factor) α [Legrand F. et al., 2010]. Последний вызывает деструкцию опухолевых клеток и эндотелиоцитов, а также модулирует фагоцитарную активность клеток опухолевого микроокружения [Shamri R. et al., 2011].

Наряду с этим, эозинофилы (полифункциональные лейкоциты) являются источником цитокинов и ростовых факторов, что позволяет им влиять на пролиферацию опухолевых клеток и образование в опухоли новых кровеносных и лимфатических сосудов (неоангиогенез) [Duffy M. J. et al., 2011; Hirohito K. et al., 2011]. Эозинофилы секретируют трансформирующий фактор роста (TGF – transforming growth factor) β , проявляющий в процессе канцерогенеза дуализм свойств: действует как супрессор или промотор опухолевого роста в зависимости от типа опухоли и ее стадии [Шевченко В. Е. и соавт., 2017; Lin S. Y., Elledge S. J., 2003]. Вместе с тем, TGF β индуцирует секрецию клетками сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF – vascular endothelial growth factor) и эпидермального ростового фактора (EGF – epidermal growth factor) [Lee S. H. et al., 2015]. Доказана роль VEGF и EGF в механизмах озлокачествления и прогрессии опухоли [Miller S. S. et al., 2016]. Взаимодействие EGF со своим рецептором активирует непосредственно пролиферацию опухолевых клеток [Tiash S., Chowdhury E. H., 2015]. Под влиянием VEGF происходит образование новых сосудов (кровеносных и лимфатических), участвующих в формировании метастазов опухоли [Rapisarda A., Melillo G., 2012]. Новообразования различных гистологических типов характеризуются высокой экспрессией в опухолевой ткани рецепторов VEGFR и EGFR, что может быть негативным фактором прогноза их клинического течения [Niyaz M. et al., 2015].

Вышеизложенное обосновывает актуальность изучения факторов кооперации эозинофильных гранулоцитов и опухолевых клеток в механизмах формирования опухолиассоциированной тканевой эозинофилии и прогрессии рака толстого кишечника.

Степень разработанности темы. Интерес к исследованию эозинофилов в механизмах канцерогенеза обусловлен накопленным к настоящему моменту значительным объемом новых знаний о структуре и функциях этих клеток [Xenakis J. J. et al., 2018; Nguyen W. N. T. et al., 2020; Zheng X. et al., 2020; Rodrigo-Muñoz J. M., et al., 2021]. В литературе описаны ранее неизвестные компоненты гранул эозинофилов, цитокины и ростовые факторы, а также рецепторные структуры, свидетельствующие о возможном взаимном влиянии эозинофилов и злокачественно трансформированных клеток.

Инфильтрация опухолевой ткани эозинофилами – опухолиассоциированная тканевая эозинофилия (TATE – Tumor-Associated Tissue Eosinophilia) регистрируется при раке кожи, раке носоглотки, раке мочевого пузыря, раке шейки матки, колоректальном раке и др. [Saraiva A. L., Carneiro F., 2018; Hu G. et al., 2020; Choudhary N. et al., 2021]. В России проблемой TATE практически не занимаются, при том, что эозинофильная инфильтрация опухоли (доступный легко верифицируемый гистологический параметр) может быть значимой в контексте прогноза опухолевых заболеваний.

Зарубежные авторы демонстрируют весьма противоречивые сведения о связи тканевой эозинофилии с особенностями клинического течения злокачественных опухолей [Jain M. et al., 2014; Yellapurkar S. et al., 2016; Peurala E. et al., 2018]. Одни исследователи описывают связь TATE с благоприятным прогнозом заболевания,

высокой дифференцированностью опухолевых клеток и отсутствием метастазов [Harbaum L. et al., 2015; Peurala E. et al., 2018], другие, – напротив, отмечают ассоциацию TATE с отрицательной динамикой клинического течения болезни и низкой пятилетней выживаемостью пациентов [Jain M. et al., 2014]. Исследователи пытаются выявить прогностическое значение TATE, анализируя ключевые функции гемических и интратуморальных эозинофилов [Dorta R. G. et al., 2002; Jain M. et al., 2014; Peurala E. et al., 2018]. Так, Y. Xing et al. (2016) на модели клеточной линии остеосаркомы мышей LM8 зарегистрировали цитотоксическую активность эозинофилов в отношении опухолевых клеток [Xing Y. et al., 2016]. По мнению F. Legrand et al. (2009), активация рецепторов $\gamma\delta$ TCR/CD3 на эозинофилах опосредует *in vitro* секрецию эозинофильных катионных белков, запускающих апоптоз злокачественно трансформированных клеток [Legrand F. et al., 2009]. Однако целый ряд экспериментальных работ опровергает защитные противоопухолевые свойства эозинофилов [Hirohito K. et al., 2011; Shamri R. et al., 2011; Rosenberg H. F. et al., 2013; Lee S. H. et al., 2015].

Таким образом, роль эозинофила – компонента опухолевого микроокружения на сегодняшний день окончательно не определена. Механизмы кооперации эозинофилов и опухолевых клеток в патогенезе рака толстого кишечника требуют детального рассмотрения, учитывая перспективность использования TATE в качестве фактора прогноза клинического течения болезни.

Цель исследования – определить патогенетические факторы взаимодействия эозинофилов и опухолевых клеток при раке толстого кишечника с тканевой эозинофилией.

Задачи исследования:

1. Выделить факторы, модулирующие рекрутирование эозинофилов в опухоль, на основе анализа экспрессии галектинов 1 и 3, эотаксина-1 (CCL11) и его рецептора (CCR3) в опухолевой ткани, и экспрессии галектина-3 в эозинофилах крови у больных раком толстого кишечника.
2. Проанализировать связь тканевой эозинофилии с изменением экспрессии в опухолевой ткани эозинофильной пероксидазы – маркерного фермента эозинофилов и *in vitro* секреции эозинофилами крови цитокинов TNF α , TGF β 1, VEGF и EGF у больных раком толстого кишечника.
3. Сопоставить изменения *in vitro* секреции эозинофилами крови эндотелиального (VEGF) и эпидермального (EGF) факторов роста с экспрессией комплементарных рецепторов (VEGFR, EGFR) в опухолевой ткани при раке толстого кишечника, сопровождающемся тканевой эозинофилией.
4. Установить взаимосвязь опухолеассоциированной тканевой эозинофилии с особенностями функциональной активности эозинофилов и клинко-морфологическими характеристиками опухоли (степенью дифференцированности и инвазии первичной опухоли, наличием метастазов) у пациентов с раком толстого кишечника.

Научная новизна. Впервые определены факторы взаимодействия эозинофилов и опухолевых клеток в патогенезе опухолеассоциированной тканевой эозинофилии и механизмах прогрессии опухоли при раке толстого кишечника.

Установлена отрицательная связь между экспрессией опухолевыми клетками CCL11 и галектина-1, что обосновывает способность галектина-1 препятствовать миграции эозинофилов в ткань новообразования у больных раком толстого кишечника. При этом показано, что галектин-3, экспрессируемый опухолевыми клетками и эозинофилами крови, не влияет на хемотаксис эозинофильных гранулоцитов в опухолевую ткань при раке толстого кишечника. Впервые показана высокая экспрессия м-РНК гена *LGALS3* в эозинофилах крови у больных раком толстого кишечника независимо от присутствия TATE.

Обнаружено, что при раке толстого кишечника с тканевой эозинофилией высокая экспрессия эозинофильной пероксидазы в опухоли (ассоциированная с повышением числа опухолевых CCL11⁺-клеток) сочетается с *in vitro* гиперсекрецией эозинофилами крови TNF α (цитокина с противоопухолевыми свойствами) и TGF β 1, проявляющего антагонистическое действие в отношении роста опухоли. Отсутствие взаимосвязи секреции эозинофилами крови ростовых факторов VEGF и EGF с экспрессией опухолевыми клетками комплементарных им рецепторов VEGFR и EGFR отражает разобщение EGF/VEGF-опосредованного взаимодействия эозинофилов и опухолевых клеток в патогенезе рака толстого кишечника.

Приоритетными являются данные, доказывающие взаимосвязь высокой экспрессии эозинофильной пероксидазы в опухоли с *in vitro* гиперсекрецией TNF α и TGF β 1 эозинофилами крови, и TATE-ассоциированными показателями прогрессии колоректального рака, а именно с низкой степенью инвазии опухоли и отсутствием очагов регионарного метастазирования, что свидетельствует о противоопухолевой роли эозинофилов в патогенезе рака толстого кишечника.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные фундаментальные данные об особенностях кооперации эозинофилов и опухолевых клеток при раке толстого кишечника существенно расширяют современные представления о роли опухолеассоциированной тканевой эозинофилии (TATE) в механизмах канцерогенеза. Установлено, что злокачественно трансформированные клетки толстого кишечника за счет галектина-1 способны модулировать эотаксин-1-зависимый механизм рекрутирования эозинофилов в опухолевую ткань. Сочетанное повышение экспрессии эозинофильной пероксидазы EPX в опухолевой ткани и *in vitro* секреции TNF α и TGF β 1 эозинофилами крови при раке толстого кишечника с TATE свидетельствует об агрессии эозинофилов в отношении клеток опухоли. Взаимосвязь тканевой эозинофилии с цитотоксической активностью эозинофилов и низкой инвазивностью роста опухоли (степенью распространения T1, T2 и отсутствием лимфогенных метастазов) при разобщении EGF/VEGF-опосредованного взаимодействия эозинофилов и опухолевых клеток доказывает противоопухолевую роль эозинофильных гранулоцитов в патогенезе рака толстого кишечника. Полученные новые данные о механизмах взаимного влияния эозинофилов и опухолевых клеток с учетом клинико-морфологических характеристик рака толстого кишечника, сопровождающегося тканевой эозинофилией, представляются значимыми с позиции перспективности

применения TATE в качестве критерия прогноза болезни.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России для студентов, обучающихся по дисциплинам «Патофизиология, клиническая патофизиология» (специальности 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия) и «Гематология», «Лабораторная гематология» (специальности 30.05.01 Медицинская биохимия, 30.05.02 Медицинская биофизика и 30.05.03 Медицинская кибернетика).

Методология и методы исследования. Исследование выполнено в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий кафедрой – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН О. И. Уразова), патологоанатомическом отделении (заведующий – Л. Э. Ерендеева) ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» («ТООД») (главный врач – канд. мед. наук М. Ю. Грищенко) и лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий инновационного парка Балтийского федерального университета им. И. Канта (г. Калининград) (заведующий – д-р мед. наук Л. С. Литвинова).

Для реализации поставленных задач были обследованы пациенты с диагнозом рака толстого кишечника (код по МКБ С18-С20) до проведения лечения. Группы исследования были сформированы в зависимости от присутствия/отсутствия эозинофилов в составе опухолевой ткани (Tumor-Associated Tissue Eosinophilia – TATE).

Материалом исследования были образцы тканей толстого кишечника, полученные при операционном вмешательстве у больных раком толстого кишечника, и эозинофилы, выделенные из периферической крови у больных раком толстого кишечника и здоровых доноров, а также супернатанты культуральной суспензии эозинофильных гранулоцитов крови.

Работа выполнена с использованием современных методов исследования, позволяющих решить поставленные задачи:

1. Оценка тканевой эозинофилии гистологическим методом.
2. Подсчет содержания (относительного и абсолютного) эозинофилов в периферической крови с помощью гематологического анализатора.
3. Оценка экспрессии галектинов (типов 1 и 3), CCL11, CCR3, EPX, VEGFR и EGFR в опухолевой ткани методом иммуногистохимии.
4. Выделение эозинофилов (градиентное центрифугирование с иммуномагнитной сепарацией CD2, CD14, CD16, C19, CD56, CD123 и CD235a-негативных клеток) из цельной крови.
5. Культивирование эозинофилов крови *in vitro* без добавления и с добавлением рекомбинантного (r) интерлейкина-5.
6. Анализ экспрессии м-РНК гена *LGALS3* в эозинофилах крови методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.
7. Измерение концентрации цитокинов TNF α , TGF β 1, VEGF и EGF в супернатантах культуры эозинофилов периферической крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).
8. Методы статистического анализа результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. При раке толстого кишечника галектин-1, экспрессируемый опухолевыми клетками, модулирует SCL11-опосредованное рекрутирование эозинофильных гранулоцитов в опухолевую ткань. Экспрессия галектина-3 опухолевыми клетками и эозинофилами крови не влияет на миграцию (зависимую от эотаксина-1) эозинофилов в ткань новообразования.
2. Тканевая эозинофилия (ТАТЕ) при раке толстого кишечника ассоциирована с высокой экспрессией эозинофильными гранулоцитами пероксидазы (ЕРХ) и *in vitro* гиперсекрецией цитокинов с противоопухолевыми свойствами – TNF α и TGF β 1.
3. Разобщение EGF/VEGF-опосредованной кооперации эозинофилов и опухолевых клеток в патогенезе рака толстого кишечника с ТАТЕ подтверждается отсутствием взаимосвязи *in vitro* секреции ростовых факторов EGF и VEGF эозинофилами крови с экспрессией EGFR и VEGFR в опухолевой ткани.
4. Связь тканевой эозинофилии с высокой цитотоксической (ЕРХ) и цитокинсекреторной (TNF α и TGF β 1) активностью эозинофилов, а также с низкой степенью инвазии опухоли и отсутствием лимфогенных метастазов свидетельствует о противоопухолевой роли эозинофильных гранулоцитов и ТАТЕ в механизме прогрессии рака толстого кишечника.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом клинико-лабораторного материала, использованием актуальных методов исследования и статистического анализа, адекватных поставленным цели и задачам. Формирование групп исследования проводили с соблюдением критериев включения/исключения больных раком толстого кишечника и здоровых доноров. Основные положения научной работы докладывались и обсуждались на Объединенном иммунологическом форуме-2019 (Новосибирск, 24-29 июня 2019 г.), Всероссийской научной конференции «Патофизиология и фармакология системы крови», посвященной 35-летию НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (Томск, 10-11 октября 2019 г.), V Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, 16-18 декабря 2019 г.), VI Петербургском международном форуме «Белые ночи 2020» (Санкт-Петербург, 25-28 июня 2020 г.), научно-практической конференции с международным участием, посвященной 110-летию кафедры патологической физиологии им. академика А. А. Богомольца и памяти профессора Н. П. Чесноковой (Саратов, 25 ноября 2021 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 7 – в журналах, включенных в перечень рекомендованных ВАК при Минобрнауки России рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МД-842.2017.7) и ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 124 страницах

машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 12 рисунками и 16 таблицами. Библиографический указатель включает 159 источников (12 отечественных и 147 иностранных).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования, подготовке публикаций по теме диссертационной работы. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично. Оформление диссертации, ее иллюстративного материала и автореферата выполнены соискателем самостоятельно.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, определены цель, основные задачи исследования, научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ современной научной литературы по теме диссертационного исследования, отражены особенности эпидемиологии, этиологии и патогенеза рака толстого кишечника. Описаны современные представления об опухолиассоциированной эозинофилии крови и тканей. Рассмотрены классические хемокин-опосредованные и альтернативные хемокин-независимые варианты привлечения эозинофилов в ткани макроорганизма. Охарактеризованы рецепторные структуры и компоненты гранул, посредством которых эозинофилы могут участвовать в патогенезе опухолевых заболеваний, и возможность использования опухолиассоциированной эозинофилии в качестве критерия прогноза клинического течения онкологических заболеваний.

Во второй главе диссертации описаны объект, материал и методы исследования. В исследование вошли 98 пациентов с диагнозом рака толстого кишечника (код по МКБ С18-С20) – 55 женщин и 43 мужчины (средний возраст $65,4 \pm 4,6$ лет). Включение пациентов в диссертационное исследование осуществляли при непосредственном участии врачей В. Г. Круглова и Д. А. Шкатова. Контрольная группа была сформирована на базе клинко-диагностической лаборатории ОГАУЗ «ТООД» (заведующий – д-р мед. наук А. И. Дмитриева). В контрольную группу вошли 17 условно здоровых доноров (9 женщин и 8 мужчин, средний возраст $63,0 \pm 5,9$ лет, II-IIIa группа здоровья).

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (Протокол № 7671 от 24.06.2019). У всех пациентов и здоровых доноров было получено информированное согласие об участии в исследовании.

Диагноз рака толстого кишечника устанавливали на основании клинических проявлений болезни и результатов рентгенологического, эндоскопического и морфологического методов исследования. Среди больных раком толстого кишечника у 79 (80,6 %) человек новообразование локализовалось в ободочной кишке, у 2 (2,0 %) – в области ректосигмоидного соединения и 17 (17,4 %) – в прямой кишке. Согласно международной TNM-классификации (8 Edition AJCC,

2009 г.) среди больных колоректальным раком у 42 человек была установлена I стадия заболевания (T1N0M0, T2N0M0 T3N0M0), у 19 больных – II стадия (T4N0M0), у 28 – III стадия (T4N1M0) и у 9 – IV стадия болезни (T3N1M1, T4N1M1). Оценка морфологических характеристик опухоли и отнесение ее к соответствующему гистологическому типу проводили при участии врачей-патологоанатомов – д-ра мед. наук И. Л. Пурлика и Г. Г. Шимончук.

Взятие биологического материала и выполнение методов исследования у всех обследованных больных осуществляли до проведения им лучевого воздействия и химиотерапии.

Для решения поставленных задач были сформированы группы исследования в зависимости от присутствия/отсутствия эозинофилов в составе опухолевой ткани (Tumor-Associated Tissue Eosinophilia – TATE). Основную группу исследования составили больные раком толстого кишечника с TATE, группу сравнения – больные колоректальным раком без TATE, контрольную группу – условно здоровые доноры.

В исследование не вошли пациенты, которым проводили предоперационную лучевую и лекарственную терапию, больные с опухолями иных локализаций, лица с обострением хронических инфекционных, паразитарных, аллергических и аутоиммунных заболеваний, а также отказавшиеся от участия в исследовании.

Материалом исследования служили образцы тканей толстого кишечника, полученные при операционном вмешательстве, у больных раком толстого кишечника. Фиксацию образцов опухолевой ткани проводили в 12-процентном растворе формалина (pH=7,0), далее материал подготавливали по стандартной методике и заливали в парафин [Меркулов Г. А., 1996]. Парафиновые блоки тканей толстого кишечника использовали для приготовления серийных срезов (толщина 4-5 мкм), которые окрашивали раствором гематоксилина.

Подготовку материала для иммуногистохимического исследования, а также гистологическую верификацию опухолей проводили в патологоанатомическом отделении ОГАУЗ «ТООД» (заведующий – Л. Э. Ерендеева).

Дополнительно исследовали эозинофилы, выделенные из периферической крови больных раком толстого кишечника и здоровых доноров, а также супернатанты культуральной суспензии эозинофильных гранулоцитов крови. Взятие крови проводили утром натощак из локтевой вены в количестве 20 мл, кровь стабилизировали ЭДТА.

Оценку тканевой эозинофилии проводили на гистологических препаратах рака толстого кишечника, предварительно окрашенных гематоксилином и эозином, полуколичественным способом с использованием светового микроскопа Leica DM2000 («Leica Microsystems», Германия). Тканевые эозинофилы подсчитывали в участках максимального скопления данных клеток, т.е. в «горячих точках», оценивали не менее 20 полей зрения ($\times 400$). Если среднее содержание тканевых эозинофилов превышало 10 клеток в одном поле зрения, то констатировали опухолеассоциированную тканевую эозинофилию (TATE). Наличие единичных эозинофилов (среднее число 0 – 10 клеток в поле зрения) рассматривали как отсутствие TATE [Cho H. et al., 2016; Pehlivanoglu B. et al.,

2016].

Исследование экспрессии эотаксина-1 (CCL11) и его рецептора CCR3, галектинов 1 и 3, эозинофильной пероксидазы (EPX), рецепторов ростовых факторов (EGFR и VEGFR) в опухолевой ткани выполняли на парафиновых срезах методом иммуногистохимии согласно стандартной методике [Петров С. В., Райхлин Н. Т., 2004] с применением автоматического иммуногистостейнера «Bond-maX» («Leica Biosystems», Германия). В процессе исследования применяли антитела фирмы «Abcam» (Великобритания) к CCL11 (клон EPR5825, рабочее разведение 1:100, кроличьи) и CCR3 (клон Y31, рабочее разведение 1:100, кроличьи); фирмы «GeneTex» (Канада) к галектину-1 (поликлональные, рабочее разведение 1:500, кроличьи) и фирмы «Cell Marque» (США) к галектину-3 (клон 9C4, RTU, мышинные); фирмы «eBiosciences» (США) к EPX (клон АНЕ-1, рабочее разведение 1:200, мышинные); фирмы «Novocastra» (Германия) к VEGFR (клон KLT9, рабочее разведение 1:100, мышинные) и EGFR (клон EGFR.25, RTU, мышинные). Экспрессию исследуемых параметров определяли по количеству положительно окрашенных клеток (выражали в %).

Выделение эозинофилов из цельной крови выполняли методом иммуномагнитной сепарации CD2, CD14, CD16, C19, CD56, CD123 и CD235a-негативных клеток согласно инструкции к коммерческому набору «Eosinophil isolation kit» фирмы «Miltenyi Biotec GmbH» (Германия). Культивирование эозинофильных гранулоцитов проводили в полной питательной среде RPMI-1640 в CO₂-инкубаторе в газовой смеси, содержащей 5 % углекислого газа при температуре 37 °С в течение 48 ч без добавления и с добавлением рекомбинантного (r) интерлейкина-5 (r-IL-5) («Biosource», Бельгия) в дозе 10⁻⁸ г/мл.

Анализ экспрессии м-РНК гена галектина-3 в эозинофилах крови проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Для выделения РНК из эозинофилов крови использовали коммерческий набор «RNeasyPlusMiniKit» фирмы «QIAGEN» (Германия). Амплификацию фрагментов кДНК гена галектина-3 выполняли с применением SYBR Green I фирмы «MolecularProbe» (США) на амплификаторе «CFX96 Touch» («Bio-Rad», США).

Для исследования уровня *in vitro* секреции цитокинов TNFα, TGFβ1, VEGF и EGF эозинофилами крови применяли метод твердофазного иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа. Процедуру иммуноферментного анализа проводили в соответствии с протоколом фирм-производителей коммерческих тест-систем: «Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия), «DRG® TGFβ1 ELISA» («DRG International, Inc.», США), «RayBio® Human VEGF ELISA Kit» и «RayBio® Human EGF ELISA Kit» («RayBiotech», США). Оптическую плотность содержимого ячеек планшета измеряли при длине волны 450 нм с применением фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия).

Статистический анализ полученных результатов исследования осуществляли с использованием программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences, США) и программы «Microsoft Excel» компании «Microsoft». Для выявления соответствия выборочных данных нормальному закону распределения

применяли тест Шапиро-Уилка. В качестве средневыборочных характеристик использовали среднее значение (M) и стандартное квадратическое отклонение (Standard Deviation - S.D.), а также медиану (Me), 25-ый и 75-ый процентиля (1-ый и 3-ий квартили: Q1 и Q3). При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (F-критерий). Для оценки статистической достоверности различий количественных показателей, не подчиняющихся критерию нормального распределения, между исследуемыми выборками использовали непараметрический критерий Манна-Уитни с введением поправки Бенджамини-Хохберга. Для выявления взаимосвязей между двумя количественными показателями рассчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Для определения достоверности различий между группами сравнения по качественным признакам проводили анализ таблиц сопряженности с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона. Если хотя бы в одной ячейке ожидаемая частота принимала значение от 5 до 9, критерий Хи-квадрат рассчитывался с поправкой Йейтса. Силу связи между переменными оценивали по величине критерия ϕ . Для оценки взаимосвязи качественных признаков использовали бисериальный коэффициент корреляции и коэффициент ассоциации [Сергиенко В. И., Бондарева И. Б., 2006; Гржибовский А. М., 2008]. Результаты статистической обработки считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

В третьей главе диссертации представлены результаты исследования роли галектинов 1 и 3, экспрессируемых опухолевыми клетками, и галектина-3 эозинофилов крови в механизмах эотаксин-1-опосредованного рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в ткань новообразования с учетом способности опухолевых клеток экспрессировать факторы, модулирующие хемотаксис эозинофильных гранулоцитов. Проанализированы основные параметры, характеризующие про- и противоопухолевые свойства эозинофилов во взаимосвязи с экспрессией в опухолевой ткани рецепторов ростовых факторов (VEGFR и EGFR) и клинико-морфологическими характеристиками рака толстого кишечника, сопровождающегося TATE. Глава иллюстрирована таблицами и рисунками.

В четвертой главе проведен анализ и обсуждение полученных оригинальных данных с привлечением сведений по изучаемой теме, представленных в современной научной литературе.

Значительный прирост пула тканевых эозинофилов отмечается при воспалительных и опухолевых заболеваниях ЖКТ [Richards C. H. et al., 2012; Harbaum L. et al., 2015; Saraiva A. L., Carneiro F., 2018]. Главным фактором рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в ткань считается эотаксин-1 (CCL11), реализующий свои эффекты через специфический рецептор CCR3 [Pope S. M. et al., 2005; Shamri R. et al., 2011]. При взаимодействии с рецептором CCL11 активирует G-белок-опосредованные механизмы сигнальной трансдукции внутри эозинофилов, усиливая хемотаксис этих клеток.

В результате проведенного исследования экспрессия CCL11 была

зарегистрирована в цитоплазме опухолевых клеток во всех образцах колоректального рака. При этом у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ относительное содержание опухолевых CCL11⁺-клеток, равное 69 (36; 80) %, в 3,2 раза превышало аналогичный показатель у пациентов без эозинофилии (21,5 (18; 28), $p = 0,021$). Вместе с тем у пациентов с раком толстого кишечника была установлена достоверная взаимосвязь между содержанием CCL11⁺опухолевых клеток и ТАТЕ ($r = 0,9$).

Свои функции CCL11 реализует при взаимодействии с рецептором CCR3, представленном преимущественно на мембране эозинофилов [Pope S. M. et al., 2005; Shamri R. et al., 2011]. CCR3 является значимым фактором миграции эозинофильных гранулоцитов в слизистую оболочку толстого кишечника и особенно важен на ее финальном этапе.

По результатам диссертационного исследования, во всех образцах рака толстого кишечника CCR3 обнаруживался на мембране клеток опухолевого инфильтрата. У больных колоректальным раком с ТАТЕ относительное содержание CCR3⁺-клеток опухолевого микроокружения составляло 11 (9; 13) % и не отличалось от такового у больных раком толстого кишечника без эозинофилии (9 (6; 11) %). Присутствие CCR3⁺-клеток опухолевого микроокружения при раке толстого кишечника с ТАТЕ обуславливает сохранность CCL11/CCR3-опосредованного механизма, необходимого для привлечения эозинофилов в опухолевую ткань.

Известно, что существенное влияние на хемотаксис эозинофильных гранулоцитов могут оказывать галектины 1 и 3 [Rao S. P. et al., 2017]. На модели лабораторных животных с делецией гена галектина-1 исследователи определили дефицит миграции эозинофильных гранулоцитов в очаг воспаления [Savita P. et al., 2017]. Другие ученые получили противоположные результаты, указывающие на усиление рекрутирования эозинофилов в слизистую оболочку бронхиального эпителия у мышей в случае делеции гена галектина-1 [Ge X. N. et al., 2016].

При количественной оценке процентного содержания опухолевых галектин-1⁺-клеток в образцах рака толстого кишечника с ТАТЕ мы зарегистрировали значительное снижение данного показателя в сравнении с таковым в образцах колоректального рака без эозинофилии (Рисунок 1).

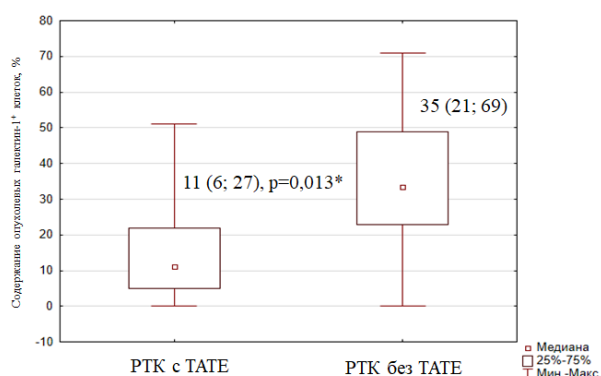


Рисунок 1 – Относительное содержание опухолевых галектин-1⁺-клеток (%) у больных раком толстого кишечника.

Показана взаимосвязь экспрессии галектина-1 опухолевыми клетками с присутствием эозинофилов в составе новообразования у больных раком толстого кишечника ($r=0,6$). Примечательно, что в общей группе больных колоректальным раком (с TATE и без нее) была установлена отрицательная корреляционная связь между экспрессией внутриопухолевого галектина-1 и количеством опухолевых CCL11⁺-клеток ($r = -0,76$, $p=0,035$).

По сведениям С. Delbrouck et al. (2002), галектин-1 при низкой концентрации способствует реализации CCL11-зависимого механизма хемотаксиса эозинофилов путем усиления экспрессии эотаксинов, адгезивных структур на мембране эозинофилов и эндотелиальных клеток [Delbrouck С. et al., 2002]. В свою очередь, высокий уровень галектина-1 может, напротив, угнетать презентацию на эозинофилах интегрина CD49d и рецептора к CCL11, а также усиливать апоптоз эозинофилов [Delbrouck С. et al., 2002]. Данный тезис обосновывает результаты нашего исследования, констатирующие более высокую экспрессию внутриопухолевого галектина-1 у больных раком толстого кишечника без TATE.

Еще одним модулятором CCL11-опосредованной миграции эозинофилов в опухоль считается галектин-3 [Ge X. N. et al., 2013].

По результатам настоящего исследования, у больных раком толстого кишечника вне зависимости от наличия в ткани эозинофилов относительное содержание опухолевых галектин-3⁺-клеток было сопоставимым (12 (7; 31) % при раке толстого кишечника с TATE и 18 (13; 37) % – при раке без TATE). Нами не было установлено корреляционных связей между экспрессией в опухоли галектина-3, CCL11 и его рецептора, что, по-видимому, указывает на отсутствие значимого влияния данного галектина-3 на хемокин-зависимую миграцию эозинофилов в опухолевую ткань. Однако не исключается роль этого лектина в кооперативном взаимодействии эозинофилов с эндотелиальными клетками.

Известно, что на поверхности эндотелиоцитов присутствует галектин-3, который взаимодействует с $\alpha 4\beta 1$ -интегринами эозинофилов и тем самым обеспечивает их адгезию [Ge X. N. et al., 2013]. Сами эозинофилы также экспрессируют галектин-3, связывающийся с VCAM-1 и галектином-3 клеток сосудистого эндотелия.

Оценка экспрессии м-РНК гена галектина-3 (*LGALS3*) в эозинофилах крови при раке толстого кишечника показала, что у всех пациентов (с TATE и без нее) значения данного параметра составляли (1,373 (0,373; 2,706) отн.ед., $p = 0,045$ и 0,482 (0,413; 0,668) отн.ед., $p = 0,002$, соответственно), что существенно превышало таковой у здоровых доноров (0,015 (0,013; 0,023) отн.ед.). Отсутствие взаимосвязи экспрессии м-РНК *LGALS3* в эозинофилах крови с наличием эозинофильных гранулоцитов в составе опухолевой ткани при раке толстого кишечника, вероятно, объясняется способностью галектина-3 влиять преимущественно на гемические эозинофилы.

Таким образом, привлечение эозинофилов в опухолевую ткань при раке толстого кишечника обусловлено способностью злокачественно трансформированных клеток продуцировать CCL11 при условии низкой экспрессии в опухоли галектина-1. В свою очередь, избыток внутриопухолевого

галектина-1 при раке толстого кишечника без ТАТЕ, по-видимому, может служить механизмом «ускользания» опухолевых клеток от агрессивного влияния эозинофилов.

Действие эозинофильных гранулоцитов на злокачественно трансформированные клетки до сих пор однозначно не определено. Превалирующим является мнение о противоопухолевом цитотоксическом влиянии эозинофилов [Legrand F. et al., 2010; Shamri R. et al., 2011; Xing Y. et al., 2016]. При дегрануляции эозинофилов выделяется эозинофильная пероксидаза (ЕРХ – eosinophil peroxidase) – маркерный фермент эозинофилов, опосредующий окислительные процессы с образованием активных форм кислорода, повреждающих клетки новообразования [Slattery M. L. et al., 2012; Yousefi S. et al., 2012; Al-Muhsen S. et al., 2013; Esnault S. et al., 2013].

В данном исследовании мы оценивали экспрессию ЕРХ в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника в зависимости от наличия ТАТЕ. Установлено статистически значимое увеличение процентного содержания ЕРХ-позитивных «неопухолевых» клеток в образцах рака толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией новообразования. У больных колоректальным раком с ТАТЕ показатель экспрессии ЕРХ в 7,2 раза превышал аналогичный параметр у пациентов с раком толстого кишечника без эозинофилии (Рисунок 2).

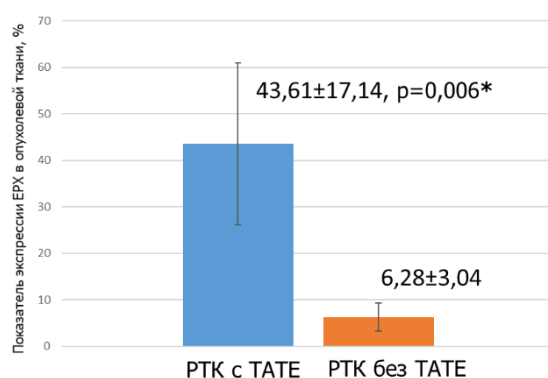


Рисунок 2 – Показатель экспрессии эозинофильной пероксидазы (ЕРХ) (%) в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника.

Гиперэкспрессия ЕРХ, обнаруженная в образцах рака толстого кишечника с ТАТЕ, определяется не только присутствием большего числа эозинофилов, выделяющих пероксидазу, но и повышенной активностью этого фермента в специфических эозинофильных гранулах. Вместе с тем, у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ установлена положительная корреляционная зависимость между показателем экспрессии ЕРХ и количеством опухолевых ССL11⁺-клеток в ткани новообразования ($r=0,89$; $p=0,025$). Последнее обуславливает способность эотаксина-1 (ССL11) влиять не только на хемотаксис эозинофилов, но и активировать цитотоксические свойства этих клеток.

Противоопухолевая активность эозинофилов может быть опосредована также секрецией фактора некроза опухоли (TNF – tumor necrosis factor) α , способного инициировать деструкцию опухолевых клеток [Шевченко В. Е. и соавт., 2017].

В данном исследовании у больных раком толстого кишечника мы оценивали секрецию TNF α эозинофильными периферической крови в *in vitro* интактной культуре клеток и при добавлении в культуральную среду рекомбинантного (r) IL-5. Установлено достоверное повышение базальной и индуцированной r-IL-5 секреции TNF α эозинофилами крови *in vitro* только у пациентов с раком толстого кишечника, сопровождающемся TATE (Рисунок 3).

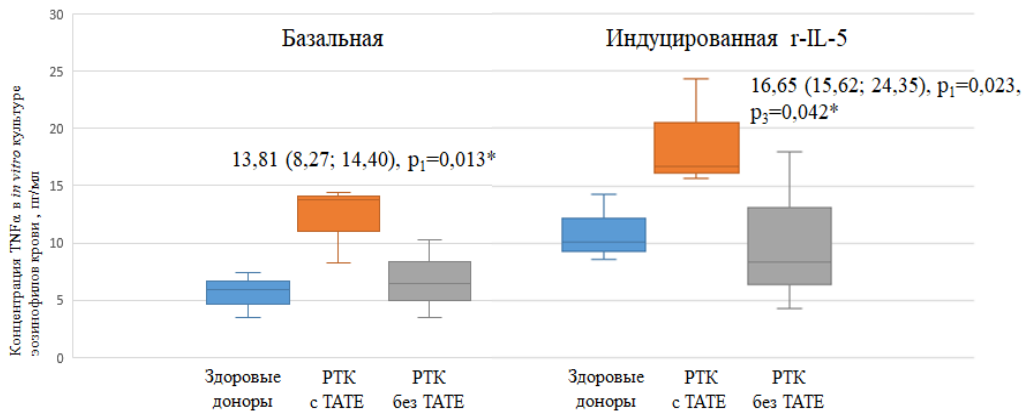


Рисунок 3 – Секреция TNF α эозинофилами крови *in vitro* у больных раком толстого кишечника.

У пациентов данной группы добавление r-IL-5 в культуру эозинофилов сопровождалось повышением *in vitro* секреции TNF α по сравнению с базальным ее уровнем, что может свидетельствовать о высокой реактивности изучаемых клеток. По сведениям литературы, TNF α -опосредованная цитотоксичность осуществляется путем индукции ERK, повреждающей как опухолевые, так и клетки микроокружения [Legrand F. et al., 2010; Shamri R. et al., 2011].

Следует отметить, что внутриопухолевые резидентные и рекрутированные гемические эозинофилы являются источником многих цитокинов и факторов роста, в частности, трансформирующего фактора роста (TGF) β , способного выступать как в роли промотора, так и ингибитора опухолевого роста [Шевченко В. Е. и соавт., 2016, 2017].

По результатам исследования *in vitro* секреции TGF β 1 эозинофилами периферической крови, у больных колоректальным раком с TATE ее базальный уровень (44,85 (39,73; 46,71) пг/мл) оказался в 1,6 и 1,7 раза соответственно выше аналогичных показателей у здоровых доноров (28,42 (24,21; 32,13) пг/мл, $p_1 = 0,041$) и пациентов с раком толстого кишечника без эозинофилии (26,67 (19,44; 28,36) пг/мл, $p_2 = 0,019$). При этом повышения r-IL-5-индуцированной секреции TGF β 1 (48,00 (39,85; 53,14) пг/мл) по сравнению с соответствующим показателем их базальной секреции (отражающей реактивность клеток) зарегистрировано не было. Установленный нами высокий уровень секреции TGF β 1, с одной стороны, отражает способность эозинофилов проявлять антипролиферативные свойства, а с другой, – опосредовать инфильтративный рост и формирование метастазов.

Известно, что TGF β 1 может регулировать опухолевый ангиогенез за счет стимуляции выработки сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF –

Vascular Endothelial Growth Factor) [Lee S. H. et al., 2015]. Последний считается ключевым проангиогенным фактором и специфическим митогеном для эндотелиальных и эпителиальных клеток [Puxeddu I. et al., 2006; Melo R. C. et al., 2008].

В нашем исследовании у больных раком толстого кишечника проанализирована способность эозинофилов периферической крови секретировать VEGF в *in vitro* интактной культуре клеток и при стимуляции r-IL-5. У пациентов с раком толстого кишечника независимо от наличия ТАТЕ среднее значение базальной *in vitro* секреции VEGF эозинофилами крови было сопоставимо с нормой (1,83 (0,40; 2,35) пг/мл). Добавление в культуральную суспензию клеток r-IL-5 характеризовалось статистически значимым снижением *in vitro* секреции VEGF эозинофилами крови у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ до 0,98 (0,34; 1,00) пг/мл, $p_1=0,032$ и без ТАТЕ до 0,68 (0,58; 1,21) пг/мл, $p_1=0,023$ относительно контрольной группы – 3,76 (1,81; 5,10) пг/мл. При этом процентное содержание опухолевых VEGFR⁺-клеток у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ, равное $15,22 \pm 9,34$ %, достоверно не отличалось от такового у пациентов без эозинофилии ($14,87 \pm 12,37$ %). Также нам не удалось выявить взаимосвязи экспрессии внутриопухолевого VEGFR с *in vitro* секрецией VEGF эозинофилами периферической крови и наличием ТАТЕ при раке толстого кишечника.

У больных раком толстого кишечника мы проанализировали также *in vitro* секрецию эозинофилами периферической крови другого фактора, способствующего пролиферации эпителиальных и опухолевых клеток – эпидермального ростового фактора (EGF), и экспрессию в опухолевой ткани комплементарного ему рецептора. У всех пациентов независимо от присутствия эозинофилов в составе опухолевого микроокружения базальная *in vitro* секреция EGF эозинофилами крови (при раке толстого кишечника с ТАТЕ – 0,98 (0,34; 1,00) пг/мл, при раке без ТАТЕ – 0,68 (0,58; 1,21) пг/мл) не отличалась от таковой у здоровых доноров (0,52 (0,20; 0,93) пг/мл). При добавлении в *in vitro* культуру клеток r-IL-5 у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ содержание EGF в супернатантах культуральной суспензии эозинофилов оказалось равным 0,88 (0,65; 1,33) пг/мл ($p_1=0,039$), что достоверно превышало аналогичный контрольный параметр (0,19 (0,08; 0,21) пг/мл, $p_3=0,020$), однако при этом соответствовало его базальному уровню. Последнее обосновывает дефицит функционального резерва эозинофильных гранулоцитов в отношении выработки EGF.

Анализ экспрессии EGFR в образцах рака толстого кишечника позволил выявить статистически значимое снижение относительного содержания опухолевых EGFR⁺-клеток у больных колоректальным раком с ТАТЕ ($12,65 \pm 9,92$ %, $F=6,49$; $p=0,018$) в сравнении с таковым у пациентов без эозинофилии ($20,19 \pm 11,42$ %). Дефицит экспрессии EGFR в опухолевой ткани существенно снижает вероятность пролиферации опухолевых клеток под влиянием EGF ввиду дисрегуляции механизмов рецепции и сигнальной трансдукции.

В целом, эозинофилы не вносят существенного вклада в механизм EGF- и VEGF-опосредованной дисрегуляции пролиферации злокачественно трансформированных клеток при колоректальном раке.

Клеточный состав и функциональная поляризация опухолевого микроокружения могут служить фактором прогноза клинического течения онкологических заболеваний.

Мы проанализировали взаимосвязь TATE с ключевыми показателями прогрессии опухоли, а именно, степенью дифференцированности опухолевых клеток, их способностью к инвазивному росту и метастатическому распространению.

Так, у больных колоректальным раком с TATE распространение первичной опухоли соответствовало T1, T2 в 35,3 % случаев, тогда как при раке толстого кишечника без TATE низкая степень инвазии опухоли (T1, T2) выявлялась лишь у 10,6 % пациентов ($\chi^2=16,10$; $p=0,029$). Установлена связь средней силы между низкой степенью инвазии опухоли и наличием TATE у пациентов с раком толстого кишечника ($\phi=0,438$). Примечательно, что у больных колоректальным раком с TATE и T1-, T2-степенью распространения опухоли показатель экспрессии эозинофильной пероксидазы в опухолевой ткани оказался равным $35,11 \pm 10,03$ %, что в 1,9 раза превышало соответствующий параметр в группе больных с TATE и инвазией опухоли T3, T4 ($19,01 \pm 5,34$ %, $F=22,8$; $p=0,031$). Выявленные изменения указывают на вовлечение эозинофилов с высокой цитотоксической активностью в формирование менее инвазивного роста опухоли при раке толстого кишечника.

Это не противоречит результатам, полученным при сравнительной оценке степени дифференцированности опухоли у больных раком толстого кишечника с TATE. По результатам исследования гистологических образцов опухолевой ткани, в 84,3 % случаях колоректального рака с TATE опухоли характеризовались высокой и умеренной степенью дифференцированности. При этом у 76,6 % пациентов без тканевой эозинофилии преобладали высоко- и умереннодифференцированные опухоли ($\chi^2=0,63$; $p>0,05$).

Маркерным критерием прогрессии опухоли также является метастазирование. Очаги вторичного опухолевого роста обнаруживаются прежде всего в регионарных лимфатических узлах.

У больных раком толстого кишечника с TATE лимфогенные метастазы регистрировались лишь в 9,8 % случаев, что оказалось существенно ниже, чем у больных колоректальным раком без TATE (регионарные метастазы обнаруживались в 48,9 % случаев, $\chi^2=7,11$; $p=0,031$). При этом очаги отдаленного метастазирования отсутствовали у большинства больных колоректальным раком как с TATE (у 94,1 % пациентов), так и без нее (у 87,2 % пациентов). У больных раком толстого кишечника установлена связь средней силы ($\phi=0,314$) между наличием тканевой эозинофилии и отсутствием лимфогенных метастазов. Последнее может быть обусловлено прямым влиянием на опухолевые клетки эозинофильных катионных белков, а также связано с гипоэкспрессией EGFR на опухолевых клетках. Дефицит экспрессии EGFR обуславливает неэффективное проведение сигнала внутрь клетки и, как следствие, уменьшает пролиферативную активность опухолевых клеток, темпы развития и прогрессии опухоли.

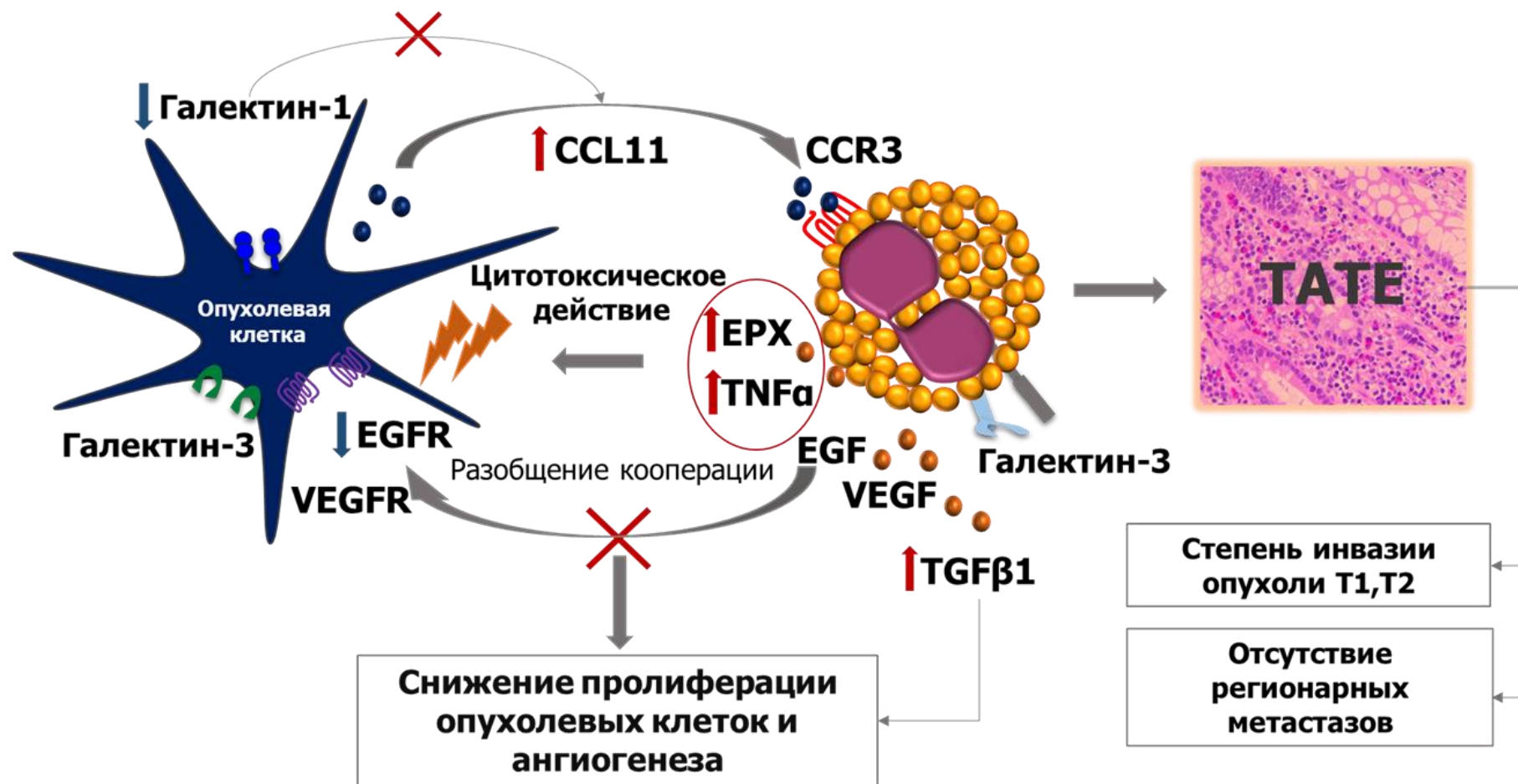


Рисунок 4 – Особенности кооперации эозинофилов и опухолевых клеток при раке толстого кишечника с TATE.
 Примечание: CCL11 – эотаксин-1, CCR3 – рецептор к эотаксину, EPX – эозинофильная пероксидаза, TNF – фактор некроза опухоли, TGF – трансформирующий фактор роста, EGF – эпидермальный фактор роста, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста, VEGFR – рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста, TATE – опухолеассоциированная тканевая эозинофилия. По результатам собственных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевым фактором рекрутирования эозинофилов в опухолевую ткань при раке толстого кишечника является гиперэкспрессия опухолевыми клетками CCL11/эотаксина, действующего через комплементарный рецептор CCR3. Продемонстрирована способность опухолевых клеток модулировать эотаксин-зависимый механизм миграции эозинофилов в ткань новообразования. У больных раком толстого кишечника с TATE установлена внутриопухолевая гипоекспрессия галектина-1, ассоциированная с высоким содержанием опухолевых CCL11⁺-клеток, привлекающих эозинофилы в ткань новообразования. При этом у больных колоректальным раком без TATE экспрессия галектина-1 опухолевыми клетками сопровождается, напротив, снижением (относительно такового у больных с эозинофилией) CCL11/эотаксина в опухоли. Опухолевый галектин-1, по-видимому, является фактором негативной регуляции хемотаксиса эозинофилов в ткань новообразования и может опосредовать «ускользание» опухолевых клеток от агрессивного влияния эозинофилов.

Процентное содержание опухолевых галектин-3⁺-клеток и экспрессия м-РНК гена *LGALS3* в эозинофилах крови у всех больных раком толстого кишечника (с TATE и без) были сопоставимыми. Высокая экспрессия галектина-3 в эозинофилах крови при раке толстого кишечника независимо от присутствия TATE определяет скорее адгезивные свойства данного лектина, реализующиеся на этапе фиксации эозинофилов к сосудистому эндотелию и их роллинга, тогда как дальнейшая миграция клеток в опухоль обеспечивается CCL11. Последний может влиять не только на рекрутирование эозинофилов в опухоль, но и индуцировать их цитотоксическую функцию.

У больных раком толстого кишечника с TATE установлены высокая экспрессия в опухолевой ткани EPX (ассоциированная с гиперэкспрессией CCL11) и *in vitro* гиперсекреция TNF α эозинофильными гранулоцитами периферической крови. Избыточная экспрессия EPX в образцах рака толстого кишечника с тканевой эозинофилией обусловлена не только большим числом клеток, содержащих EPX, но и более высокой активностью фермента в составе эозинофильных гранул. Однонаправленные изменения показателя экспрессии EPX в опухоли и *in vitro* секреции TNF α гемическими эозинофилами при раке толстого кишечника с TATE отражают синергизм действия данных факторов, способных повреждать клетки опухоли.

Высокий уровень *in vitro* секреции эозинофилами крови TGF β 1 (цитокина, проявляющего разнонаправленное действие в отношении опухоли) характеризует способность эозинофилов выступать в роли как ингибиторов, так и промоторов опухолевого роста. Однако «нормальная секреция» EGF (фактора пролиферации опухолевых клеток) и VEGF (проангиогенного фактора) эозинофилами крови (в интактной культуре клеток) свидетельствует о доминировании противоопухолевого потенциала эозинофильных гранулоцитов у больных раком толстого кишечника с TATE. Сниженная экспрессия опухолевыми клетками EGFR и экспрессия VEGFR, сопоставимая с таковой без эозинофилии, препятствует полноценной реализации регуляторных эффектов их лигандов в механизмах кооперативного взаимодействия клеток опухоли и эозинофилов, и не позволяет

последним использовать секретируемые факторы в механизмах контроля пролиферации опухолевых клеток.

Вышеизложенное согласуется с результатами оценки клинимоρφологических характеристик опухолевого процесса при раке толстого кишечника, сопровождающемся ТАТЕ. Эозинофильная инфильтрация опухолевой ткани выявляется у больных раком толстого кишечника с меньшей степенью инвазии новообразования, отсутствием метастазов в регионарных лимфатических узлах и не связана со степенью дифференцированности клеток опухоли. Менее инвазивный характер роста опухоли при раке толстого кишечника с ТАТЕ сопряжен с высокой пероксидазной активностью интратуморальных эозинофилов.

Таким образом, опухолевые клетки и клетки микроокружения – эозинофилы способны оказывать взаимное регуляторное влияние: клетки опухоли модулируют рекрутирование эозинофилов в ткань новообразования, в свою очередь, эозинофилы реализуют свою цитотоксическую и цитокинсекреторную активность против опухоли, что обосновывает противоопухолевую роль ТАТЕ в патогенезе рака толстого кишечника.

ВЫВОДЫ

1. Развитие тканевой эозинофилии при раке толстого кишечника связано с повышением содержания опухолевых ССL11⁺-клеток и, напротив, снижением экспрессии галектина-1 клетками опухоли. Относительное содержание ССR3⁺-клеток опухолевого микроокружения, а также экспрессия галектина-3 опухолевыми клетками и эозинофилами крови у больных раком толстого кишечника не зависят от наличия опухолеассоциированной тканевой эозинофилии (ТАТЕ).

2. Галектин-1 препятствует рекрутированию эозинофилов в опухоль, что подтверждается отрицательной корреляцией между экспрессией галектина-1 и ССL11 опухолевыми клетками у больных раком толстого кишечника. Галектин-3 (на клетках опухоли и эозинофилах крови) не оказывает влияния на эотаксин-опосредованную миграцию эозинофилов в ткань новообразования при раке толстого кишечника.

3. Тканевая эозинофилия при раке толстого кишечника ассоциирована с высокой экспрессией эозинофильной пероксидазы в опухоли (в сочетании с повышением числа опухолевых ССL11⁺-клеток) и *in vitro* гиперсекрецией эозинофилами крови TNF α (базальной и γ -IL-5-индуцированной) и TGF β 1 (базальной). *In vitro* секреция проангиогенных факторов роста EGF и VEGF эозинофилами крови у больных с ТАТЕ и без эозинофилии не различается.

4. При раке толстого кишечника с ТАТЕ экспрессия опухолевыми клетками EGFR (ниже, чем у больных без эозинофилии) и VEGFR (сопоставимая с таковой у больных без эозинофилии) не коррелирует с секрецией эозинофилами крови комплементарных цитокинов EGF и VEGF, что свидетельствует о разобщении механизма EGF/VEGF-опосредованной кооперации эозинофилов и опухолевых клеток в патогенезе опухолевой прогрессии при раке толстого кишечника.

5. Опухولةассоциированная тканевая эозинофилия у больных раком толстого кишечника сочетается с менее выраженной степенью распространения опухоли (T1, T2 в сочетании с высокой активностью эозинофильной пероксидазы в опухолевой ткани) и отсутствием очагов регионарного метастазирования, но не влияет на степень дифференцированности клеток опухоли и формирование гематогенных метастазов.

6. Высокая экспрессия эозинофильной пероксидазы в опухоли, *in vitro* гиперсекреция цитокинов TNF α и TGF β 1 эозинофилами крови и благоприятный фенотип новообразования (низкая степень инвазии при отсутствии регионарных метастазов) у больных раком толстого кишечника с TATE свидетельствуют о противоопухолевой роли эозинофилов в патогенезе прогрессии колоректального рака.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Особенности экспрессии CCL11/эотаксина, рецептора CCR3 и эозинофильной пероксидазы в опухолевой ткани при раке желудка и толстого кишечника / Колобовникова Ю.В., Янкович К.И., Романова Е.В., Дмитриева А.И., Новицкий В.В., Уразова О.И. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2018. – Т. 17, № 3. – С. 80-87. Импакт-фактор РИНЦ 0,643

2. Особенности секреции ростовых факторов эозинофильными гранулоцитами крови при раке желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией / Уразова О.И., Колобовникова Ю.В., Янкович К.И., Романова Е.В., Дмитриева А.И., Полетика В.С., Новицкий В.В., Рябова Л.М. // **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова**. – 2019. – Т. 105, № 4. – С. 465-472. Импакт-фактор РИНЦ 0,444

3. VEGF- и EGF-опосредованная кооперация эозинофильных гранулоцитов и опухолевых клеток при раке желудка и толстого кишечника / Колобовникова Ю.В., Янкович К.И., Романова Е.В., Дмитриева А.И., Уразова О.И., Новицкий В.В., Полетика В.С. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2019. – Т. 18, №1. – С. 211-219. Импакт-фактор РИНЦ 0,643

4. Галектины-1,3 в механизмах рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в опухолевую ткань при раке желудка и толстого кишечника / Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Васильева О.А., Романова Е.В., Комар А.А., Литвинова Л.С., Полетика В.С., Чумакова С.П., Новицкий В.В. // **Вестник РАМН**. – 2019. – Т. 74, № 5. – С. 317-322. **Импакт-фактор РИНЦ 1,070.**

5. Секреция фактора некроза опухоли альфа эозинофилами крови при раке толстого кишечника с тканевой эозинофилией / Романова Е.В., Колобовникова Ю.В., Новицкий В.В., Уразова О.И. // **Российский иммунологический журнал**. – 2019. – Т. 13(22), № 2. – С. 496-498. Импакт-фактор РИНЦ 0,684.

6. Галектин-1 и -3 в механизмах опухолеассоциированной тканевой эозинофилии при раке желудка и толстого кишечника / Романова Е.В., Колобовникова Ю.В., Васильева О.А., Уразова О.И., Новицкий В.В. // **Успехи молекулярной онкологии**. – 2019. – №6 (4). С. 65.

7. Секреция ростовых факторов эозинофилами крови при раке желудка и толстого кишечника / Полетика В.С., Романова Е.В., Колобовникова, Ю.В., Уразова О.И., Новицкий В.В // Сб. тезисов «Всероссийская научная конференция

Патофизиология и фармакология системы крови, посвященная 35-летию НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга», г. Томск, 10-11 октября 2019 г.

8. Особенности экспрессии эозинофильных катионных протеинов в опухолевой ткани при раке толстого кишечника / Романова Е.В., Колобовникова, Ю.В., Уразова О.И., Новицкий В.В // Сб. тезисов «Научная конференция с международным участием, посвященная 170-летию кафедры патологической анатомии им. академика А.И. Струкова», г. Москва, 20 марта 2019 г.

9. Особенности функциональной активности эозинофильных гранулоцитов при раке желудка и толстого кишечника / Колобовникова Ю.В., Романова Е.В., Уразова О.И., Янкович К.И., Дмитриева А.И., Полетика В.С., Новицкий В.В. // Сб. «Материалы VI Петербургского международного онкологического форума «Белый ночи-2020», г. Санкт-Петербург, 25-28 июня 2020. – СПб., 2020. – С. 140.

10. Связь цитотоксических свойств эозинофильных гранулоцитов с клинкоморфологическими характеристиками рака желудка и толстого кишечника / Романова Е.В., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Новицкий В.В. // Сб. «Типовые патологические процессы: современные тренды в науке: Сборник трудов, посвященный 130-летию кафедры патофизиологии Императорского (государственного) Томского университета – Томского медицинского института – Сибирского государственного медицинского университета / под ред. члена-корреспондента РАН О.И. Уразовой. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2020». – С. 105-106.

11. Связь опухолеассоциированной тканевой эозинофилии с клинкоморфологическими параметрами рака толстого кишечника / Романова Е.В., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Дмитриева А.И., Янкович К.И. // Клиническая патофизиология. – 2021. – Т. 27, № 3. – С. 58-62.

12. Особенности экспрессии галектинов 1 и 3 при раке толстого кишечника во взаимосвязи с клинкоморфологическими параметрами опухоли / Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Полетика В.С., Рейнгардт Г.В., Романова Е.В., Курносенко А.В., Дмитриева А.И., Янкович К.И., Грищенко М.Ю. // **Фундаментальная и клиническая медицина.** – 2021. – Т. 6, № 4. – С. 45-52. Импакт-фактор РИНЦ 0,305.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CCL (chemokine ligand) – хемокиновый лиганд, содержащий два остатка цистеина подряд

CCR (C-C chemokine receptor) – хемокиновый рецептор

COLO – клеточная линия колоректального рака

EPX (eosinophil peroxidase) – эозинофильная пероксидаза

EGF (Epidermal Growth Factor) – эпидермальный фактор роста

TATE – (Tumor-Associated Tissue Eosinophilia) – опухолеассоциированная тканевая эозинофилия

TGF (transforming growth factor) – трансформирующий фактор роста

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

VCAM (vascular cell adhesion molecule) – молекулы адгезии сосудистого эндотелия

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) – сосудистый эндотелиальный фактор роста

VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) – рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста