

*На правах рукописи*

**Янкович Кристина Игоревна**

**ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ  
НОВООБРАЗОВАНИЙ ЖЕЛУДКА И ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА  
С ТКАНЕВОЙ ЭОЗИНОФИЛИЕЙ**

14.03.03 – патологическая физиология  
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Томск – 2018

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

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук

**Дмитриева  
Алла Ивановна**

доктор медицинских наук

**Колобовникова  
Юлия Владимировна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук

ведущий научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

**Кайгородова  
Евгения Викторовна**

доктор медицинских наук,

профессор, заведующий лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»

**Савченко  
Андрей Анатольевич**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года в \_\_\_:\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, адрес сайта <http://ssmu.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета

**Петрова  
Ирина Викторовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Злокачественные новообразования желудка и толстого кишечника занимают одно из первых мест в структуре онкологической заболеваемости населения России и характеризуются широкой распространенностью, тенденцией к раннему метастазированию, несвоевременностью диагностики, недостаточной эффективностью существующих методов лечения [Каприн А.Д. и соавт., 2018].

Рак желудка и рак толстого кишечника часто сопровождаются эозинофильной инфильтрацией опухолевой ткани, что в современной литературе обозначают как опухолеассоциированная тканевая эозинофилия (TATE – Tumor-Associated Tissue Eosinophilia) [Pearson E. J. et al., 2013; Takeda H. et al., 2014; Vaibhav S.L. et al., 2018; Jain S. et al., 2018]. На сегодняшний день отсутствуют однозначные представления о механизмах формирования этой реакции и ее роли в патогенезе злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта.

Ключевым фактором хемотаксиса эозинофильных гранулоцитов в ткани является эотаксин-1 (CCL11), реализующий свои эффекты посредством связывания со специфическим рецептором CCR3. Гиперсекреция CCL11 в тканях и высокая экспрессия комплементарного ему рецептора на мембране эозинофилов могут обуславливать развитие тканевой эозинофилии при заболеваниях различной природы [Uhm T.G. et al., 2012; Колобовникова Ю.В. и соавт., 2014]. По данным литературы, опухолевые клетки способны самостоятельно секретировать эозинофил-активирующие цитокины [Kiziltas S. et al., 2008; Jain M. et al., 2014].

Известно, что уровень секреции цитокинов и экспрессии рецепторов клетками организма генетически детерминирован и может определяться наличием полиморфных вариантов их генов. Показана связь аллельного полиморфизма генов эозинофил-активирующих факторов с предрасположенностью к развитию гемической и/или тканевой эозинофилии при многих заболеваниях [Attab K.A. et al., 2008; Wise E.L. et al., 2010]. Наиболее часто формирование эозинофилии при патологии ассоциировано с носительством аллелей и генотипов полиморфизма *C703T* гена интерлейкина (*IL*) 5, *G80A* гена *IL5RA*, *A384G* гена *CCL11* и *T51C* гена *CCR3* [Hoffjan S. et al., 2004; Lee J.-H. et al., 2007; Attab K.A. et al., 2008].

Присутствие эозинофильных гранулоцитов в составе микроокружения при злокачественных новообразованиях рассматривается неоднозначно. В большинстве научных работ превалирует мнение о цитотоксической активности эозинофильных гранулярных протеинов в отношении опухолевых клеток [Rothenberg, M.E. et al., 2006; Legrand F. et al., 2010; Jain S. et al., 2018; Peurala E. et al., 2018]. Наряду с этим, в литературе описаны различные рецепторные структуры и регуляторные белки, посредством которых эозинофилы могут участвовать в патогенезе злокачественных новообразований.

Эозинофильные гранулоциты секретируют медиаторы, регулирующие процессы клеточной пролиферации и неоангиогенеза опухоли [Said M. et al., 2005; Shamri R. et al., 2011; Zhang B. et al., 2017]. Среди ростовых факторов особое внимание уделяется сосудисто-эндотелиальному фактору (VEGF) и эпидермальному фактору роста (EGF). Последний, связываясь с рецептором EGFR, может инициировать синтез онкогенных белков и вызывать растворивание пролиферации опухолевых клеток

[Duffy M.J. et al., 2011; Sticz T. et al., 2018]. Взаимодействие VEGF со своим рецептором обеспечивает образование новых кровеносных и лимфатических сосудов, представляющих собой пути метастазирования опухоли [Chen X. et al., 2017].

Негативными регуляторами пролиферации опухолевых клеток являются белки-регуляторы клеточного цикла (p53 и p21) [Mello S.S. et al., 2018]. Белок p53, кодируемый антионкогеном *TP53*, препятствует безостановочному делению клетки и запускает механизм апоптоза при невозможности репарации повреждений ДНК [Ченцов Ю.С. и соавт. 2005; Белоусова А.И. и соавт., 2009; Mello S.S. et al., 2018]. В регуляции клеточного цикла белок 53 играет роль транскрипционного фактора гена *CDKN1A*, кодирующего ингибитор циклин-зависимых киназ – белок p21 [Желтухин А.О. и соавт., 2010]. В опухолевых клетках часто обнаруживаются мутации гена *TP53*, сопровождающиеся изменением структуры белка, вместе с тем, существует связь с аллельным полиморфизмом этого гена [Заридзе Д.Г., 2004; Golmohammadi R. et al., 2016]. Экзонный *G215C*-полиморфизм гена *TP53* связывают с неблагоприятным фенотипом опухолей [Колесник А.П., 2013; Golmohammadi R. et al., 2016]. Также имеются данные о связи полиморфизма *A1026G* гена *CDKN1A* с предрасположенностью к развитию злокачественных новообразований различной локализации [Rodriguez I. et al., 2007; Wang K. et al., 2014; Wang N. et al., 2012]. Нарушение экспрессии в опухолевой ткани белков-регуляторов клеточного цикла p53 и p21 может быть обусловлено также регуляторным влиянием клеток микроокружения, в том числе, эозинофильных гранулоцитов.

В связи с вышеизложенным, актуальным является изучение механизмов эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани желудка и толстого кишечника, а также исследование факторов позитивной и негативной регуляции пролиферации опухолевых клеток при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта с тканевой эозинофилией.

**Степень разработанности темы.** К настоящему времени в современной, преимущественно зарубежной, литературе накоплены знания биологии эозинофила: подробно описаны компоненты эозинофильных гранул, особенности рецепторного аппарата, обосновано участие эозинофилов в реализации защитных и повреждающих реакций организма [Rosenberg H.F. et al., 2013; Varuch-Morgenstern N.V. et al., 2014; Rakesh N. et al., 2016; Vaibhav S.L. et al., 2018; Peurala E. et al., 2018].

Существенный вклад в изучение роли эозинофильных гранулоцитов при заболеваниях различной природы внесли ученые Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск): Л.М. Огородова, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко, Г.Э. Черногорюк, Ю.В. Колобовникова и др. По результатам их исследований установлена роль эозинофилов в развитии аллергии и противогельминтного иммунитета [Черногорюк Г.Э., 2002; Sukhodolo I.V. et al., 2004; Огородова Л.М. и соавт., 2006; Геренг Е. А. и соавт., 2012]; показано значение гемической эозинофилии при инфекционных и онкогематологических заболеваниях [Новицкий В.В. и соавт., 2006; Литвинова Л.С. и соавт., 2008; Колобовникова Ю.В. и соавт., 2011; Уразова О.И. и соавт., 2015 и др.].

В современной отечественной литературе проблема опухолеассоциированной тканевой эозинофилии практически не рассматривается. По данным зарубежных авторов, ТАТЕ регистрируется при раке желудка и толстого кишечника, раке

полости рта, раке поджелудочной железы, раке мочевого пузыря, раке шейки матки и др. [Legrand F. et al., 2010; Jain M. et al., 2014; Vaibhav S.L. et al., 2018; Jain S. et al., 2018; Peurala E. et al., 2018]. В литературе представлены неоднозначные сведения о связи эозинофилии с прогнозом течения опухолевых заболеваний. Так, S. Kiziltas et al. (2008) констатировали увеличение злокачественного потенциала опухоли толстого кишечника при снижении выраженности тканевой эозинофилии [Kiziltas S. et al., 2008]. Другие исследователи, установили положительную связь между выраженной тканевой эозинофилией и пятилетней безрецидивной выживаемостью пациентов [Dorta R.G. et al., 2002; Rakesh N. et al., 2016; Peurala E. et al., 2018]. Наряду с этим, в литературе имеются сведения о негативном влиянии тканевой эозинофилии на прогноз течения болезни [Said M. et al., 2005; Jain M. et al., 2014]. По данным S.J. Alrawi et al. (2005), более высокое содержание эозинофильных гранулоцитов регистрируется в составе инвазивной плоскоклеточной карциномы головы и шеи по сравнению с неинвазивными опухолями соответствующих локализаций [Alrawi S.J. et al., 2005]. В своей работе авторы сделали вывод о наличии ассоциации TATE с низкой выживаемостью пациентов. По данным литературы, ассоциированная с опухолью тканевая эозинофилия является показательной для прогнозирования появления метастазов в лимфатических узлах при злокачественных новообразованиях различных локализаций [Caruso R.A. et al., 2004; Etit D. et al., 2014].

Таким образом, исследование особенностей патогенеза рака желудка и рака толстого кишечника во взаимосвязи с тканевой эозинофилией является своевременным ввиду перспективности использования TATE в качестве дополнительного критерия прогноза болезни.

**Цель исследования:** установить молекулярно-генетические факторы развития злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника, ассоциированных с тканевой эозинофилией.

**Задачи исследования:**

1. Оценить экспрессию *CCL11*/эотаксина опухолевыми клетками и его рецептора (*CCR3*) клетками микроокружения при раке желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией и без нее.
2. Провести анализ ассоциаций аллельного полиморфизма генов эотаксина *CCL11* (*A384G*) и *IL5* (*C703T*), их рецепторов *CCR3* (*T51C*), *IL5RA* (*G80A*) и генов белков-регуляторов клеточного цикла *TP53* (*G215C*), *CDKN1A* (*A1026G*) с наличием эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани при раке желудка и толстого кишечника.
3. Оценить экспрессию опухолевыми клетками белков-регуляторов клеточного цикла (p53 и p21) и рецепторов к эндотелиальному (VEGF) и эпидермальному (EGFR) факторам роста при раке желудка и толстого кишечника в зависимости от наличия тканевой эозинофилии.
4. Установить взаимосвязь тканевой эозинофилии с уровнем экспрессии факторов регуляции пролиферации опухолевых клеток, степенью дифференцировки опухоли, наличием очагов регионарного метастазирования и показателем одногодичной летальности пациентов с раком желудка и толстого кишечника.

**Научная новизна.** Впервые при злокачественных новообразованиях желудка и толстого кишечника исследованы молекулярно-генетические механизмы

формирования опухолеассоциированной тканевой эозинофилии. Установлено, что эозинофильная инфильтрация опухолевой ткани при раке желудка и раке толстого кишечника сопряжена с гиперэкспрессией CCL11/эотаксина опухолевыми клетками и высокой экспрессией рецептора к эотаксину CCR3 клетками микроокружения. Впервые у больных раком желудка и раком толстого кишечника выявлена ассоциация тканевой эозинофилии с носительством аллеля *C* и генотипа *CC* полиморфизма *T51C* гена *CCR3* и аллеля *C* и генотипа *CC* полиморфизма *C703T* гена *IL5*, что указывает на генетически детерминированный характер данной реакции. Распределение аллелей и генотипов полиморфных сайтов генов *CCL11 (A384G)* и *IL5RA (G80A)* было сопоставимым при раке желудка и толстого кишечника с эозинофилией и без нее.

Приоритетными являются данные, касающиеся оценки молекулярно-генетических факторов развития и прогрессии злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника во взаимосвязи с тканевой эозинофилией. Впервые показано, что при раке желудка и раке толстого кишечника с тканевой эозинофилией экспрессия опухолевыми клетками белка p21 сочетается с низкой экспрессией мутантной формы белка p53, не обладающего антионкогенными свойствами. Среди больных раком желудка и раком толстого кишечника с эозинофилией, достоверно чаще встречаются носители благоприятного аллеля *G* и генотипа *GG* полиморфизма *G215C* гена *TP53*. У всех пациентов с раком желудка и раком толстого кишечника преобладают гомозиготный генотип *AA* и аллель *A* полиморфизма *A1026G* гена *CDKN1A*.

При изучении факторов позитивной регуляции пролиферации опухолевых клеток у больных раком желудка и толстого кишечника, впервые зарегистрирована связь эозинофильной инфильтрации с гипоекспрессией EGFR опухолевыми клетками. Показано, что уровень экспрессии VEGFR опухолевыми клетками при раке желудка и раке толстого кишечника не зависит от присутствия эозинофильных гранулоцитов в ткани опухоли.

При исследовании клинико-морфологических характеристик злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника впервые установлена ассоциация тканевой эозинофилии с высокой и умеренной степенью дифференцировки опухоли (у больных раком толстого кишечника) и отсутствием очагов регионарного метастазирования (у больных раком желудка). Показано, что эозинофильная инфильтрация опухолевой ткани не связана с показателем одногодичной летальности больных раком желудка и раком толстого кишечника.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные фундаментальные данные существенно расширяют современные представления о патогенезе опухолевых заболеваний, сопряженных с тканевой эозинофилией. Эозинофильная инфильтрация опухолевой ткани при раке желудка и раке толстого кишечника развивается вследствие высокой экспрессии CCL11/эотаксина опухолевыми клетками и CCR3 клетками микроокружения. Ассоциация аллельного полиморфизма генов *CCR3* и *IL5* с формированием тканевой эозинофилии значима с позиции новых знаний о генетически детерминированном характере эозинофильной инфильтрации опухоли при раке желудка и раке толстого кишечника. Взаимосвязь эозинофильной инфильтрации с более высокой степенью дифференцировки опухоли при раке толстого кишечника и отсутствием метастатического поражения

регионарных лимфатических узлов при раке желудка в сочетании со снижением пролиферативного потенциала трансформированных клеток, обосновывает менее агрессивный характер течения злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией. Полученные новые данные о молекулярно-генетических и клинико-морфологических особенностях рака желудка и рака толстого кишечника, сопровождающихся эозинофильной инфильтрацией, представляются значимыми ввиду перспективности использования тканевой эозинофилии в качестве дополнительного прогностического критерия прогрессии опухолей желудочно-кишечного тракта.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России для студентов лечебного, педиатрического и медико-биологического факультетов.

**Методология и методы исследования.** В основу настоящей работы положены результаты комплексного клинико-лабораторного обследования 427 пациентов (234 мужчин и 193 женщин) со злокачественными новообразованиями желудка (код по МКБ С16) и толстого кишечника (код по МКБ С18-С20). Группы исследования были сформированы в зависимости от локализации новообразования и наличия или отсутствия эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани. Материалом исследования служили образцы тканей желудка и толстого кишечника, полученные при операционном вмешательстве у больных раком желудка и раком толстого кишечника.

Работа выполнена с применением современных методов исследования, позволяющих решить поставленные задачи: гистологический метод, иммуногистохимический метод, ПДРФ-анализ, методы клинического обследования, а также статистические методы исследования.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Развитие тканевой эозинофилии при злокачественных новообразованиях желудка и толстого кишечника до лечения обусловлено высоким уровнем экспрессии *SCL11/эотаксина* опухолевыми клетками и рецептора *CCR3* клетками микроокружения. Носительство генотипов *CC* полиморфизма *T51C* гена *CCR3* и *CC* полиморфизма *C703T* гена *IL5* детерминирует развитие тканевой эозинофилии у больных раком желудка и толстого кишечника.
2. При раке желудка и толстого кишечника тканевая эозинофилия сопряжена с низкой экспрессией опухолевыми клетками рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*) и мутантного белка *p53* (не проявляющего антионкогенных свойств), а также носительством аллеля *G* и генотипа *GG* полиморфизма гена *TP53 (G215C)*.
3. Особенности патогенеза рака желудка и толстого кишечника, ассоциированного с тканевой эозинофилией, являются дисбаланс экспрессии факторов регуляции пролиферации опухолевых клеток, высокая и умеренная степень дифференцировки опухоли (при раке толстого кишечника) и отсутствие очагов регионарного метастазирования (при раке желудка).

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом клинического материала, использованием методов исследования, адекватных поставленным задачам, и применением современных методов статистического анализа.

Основные положения научной работы докладывались и обсуждались на XXII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии – 2016», Санкт-Петербург, 7-8 апреля 2016 г.; III Конгрессе гематологов России, Москва, 14-16 апреля 2016 г.; II Петербургском онкологическом форуме «Белые ночи», Санкт-Петербург, 22-24 июня 2016 г.; I Калининградском научном иммунологическом форуме – 2016, Калининград, 27-30 июня 2016 г.; Российской научно-практической конференции с международным участием «Высокие технологии в онкологической практике», посвященной 70-летию онкологической службы Алтайского края, Барнаул, 30 июня – 1 июля 2016 г.; XI Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске», Челябинск, 20-27 августа 2016 г.; XX Российском онкологическом конгрессе, Москва, 15-17 ноября 2016 г.; II Всероссийской конференции «Молекулярная онкология: итоги и перспективы», Москва, 6-8 декабря 2016 г.; XXIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии - 2017», Санкт-Петербург, 13-14 апреля 2017 г.; XX Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье», Санкт-Петербург, 22 апреля 2017 г.; III Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи», Санкт-Петербург, 23-25 июня 2017 г.; XXI Российском онкологическом конгрессе, Москва, 14-16 ноября 2017 г.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МД-842.2017.7 «Роль галектинов в патогенезе рака желудка и толстой кишки с опухлеассоциированной эозинофилией», руководитель – д-р мед. наук Ю.В. Колобовникова).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 4 статьи – в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав (обзора литературы, материала и методов исследования, результатов исследований, обсуждения), заключения, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 36 рисунками и 14 таблицами. Библиографический указатель включает 167 источников, из них 25 отечественных и 142 иностранных.

**Личное участие автора.** Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна исследования и определении методологии исследования, анализе данных литературы по теме диссертации, выполнении заявленных методик, анализе и обобщении полученных данных, статистической обработке результатов исследования и написании всех глав диссертации.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Клиническая характеристика обследованных пациентов**

Исследование выполнено на базе 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) и патологоанатомического отделения ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (ОГАУЗ «ТООД») (заведующий – д-р мед. наук И.Л. Пурлик).

В настоящей работе представлены результаты комплексного клинико-лабораторного обследования 427 пациентов (234 мужчин и 193 женщин) в возрасте от 38 до 84 лет (средний возраст  $63,3 \pm 8,4$  лет) со злокачественными новообразованиями желудка (код по МКБ С16) и толстого кишечника (код по МКБ С18-С20). Все пациенты состояли на диспансерном учете и проходили лечение в ОГАУЗ «ТООД» (и.о. главного врача – Л.В. Пикалова) в период с 2014 по 2016 годы. Включение больных в исследование осуществлялось при непосредственном участии врачей-онкологов Д.А. Шкатова и В.Г. Круглова.

Диагноз рак желудка и рак толстого кишечника устанавливали на основании клинической картины заболевания, результатов морфологического, рентгенологического и эндоскопического методов исследования. Морфологическая верификация и отнесение новообразований к определенному гистологическому типу проводились на базе патологоанатомического отделения ОГАУЗ «ТООД» врачами-патологоанатомами д-р мед. наук И.Л. Пурликом и Г.Г. Шимончук.

Распространенность заболевания устанавливали в соответствии с международной классификацией по системе TNM (7 Edition AJCC, 2009 г.). У 149 (34,9%) пациентов распространенность первичной опухоли соответствовала символам T<sub>1-2</sub>, у 278 (65,1%) больных – символу T<sub>3</sub>. Очаги регионарного метастазирования (T<sub>1</sub>-3N<sub>1</sub>-3M<sub>0</sub>) были выявлены у 93 (21,8%) пациентов. Принадлежность опухоли к определенному гистологическому типу определяли согласно «Международной гистологической классификации» (ВОЗ, 2010). У 130 (61,0%) больных раком желудка была диагностирована тубулярная аденокарцинома высокой и умеренной степени дифференцировки, у 74 (34,8%) – низкодифференцированная аденокарцинома, у 9 (4,2%) выявлены другие формы (муцинозная (>50% объема опухоли представлено внеклеточной слизью) и перстневидноклеточная (>50% внутриклеточного объема представлено слизью) аденокарциномы, которые всегда расцениваются как низкодифференцированные опухоли). Среди пациентов с раком толстого кишечника 172 (80,4%) человека имели новообразования ободочной кишки, 4 (1,8%) – опухоли ректосигмоидного соединения и 38 (17,8%) – злокачественные новообразования прямой кишки. У 208 (97,2%) больных раком толстого кишечника диагностирована аденокарцинома (высокой, умеренной или низкой степени дифференцировки), у 6 (2,8%) – слизистая аденокарцинома (>50% объема опухоли представлено внеклеточной слизью; всегда расцениваются как низкодифференцированные опухоли).

Деление опухолей желудочно-кишечного тракта на высоко-, умеренно- и низкодифференцированные проводилось согласно «Клиническим рекомендациям по диагностике и лечению опухолей» (Ассоциация онкологов России, 2014). Опухоли желудка и толстого кишечника были отнесены к высокодифференцированным, если более чем 95% опухолевых клеток образовывали железистые структуры, к умереннодифференцированным – если 50-95% клеток участвовали в образовании железистых структур; к низкодифференцированным – если 5-49% клеток образовывали железистые структуры; в недифференцированных опухолях железистые структуры были образованы менее чем 5% клеток.

Все пациенты были обследованы и прооперированы до начала проведения специфической лучевой и лекарственной терапии.

Для решения поставленных задач были сформированы группы исследования в зависимости от локализации новообразования и наличия или отсутствия эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани.

В исследование были включены 213 пациентов с диагнозом рак желудка и 214 больных раком толстого кишечника.

Иммуногистохимическое исследование проводилось на выборке, в которую вошли 52 больных раком желудка и 55 больных раком толстого кишечника. Среди пациентов с диагнозом рак желудка и рак толстого кишечника были сформированы подгруппы в зависимости от наличия тканевой эозинофилии. Основную группу исследования среди больных раком желудка составили 25 человек (средний возраст  $65,3 \pm 4,7$  лет), в опухолевой ткани которых идентифицирована эозинофильная инфильтрация, в группу сравнения вошли 27 пациентов со злокачественными новообразованиями желудка без эозинофилии (средний возраст  $62,9 \pm 5,2$  лет). Среди пациентов с раком толстого кишечника основную группу исследования составили 23 человека (средний возраст  $63,0 \pm 7,3$  лет), в опухолевой ткани которых обнаруживалась эозинофилия, в группу сравнения были включены 32 пациента (средний возраст  $61,3 \pm 6,0$  лет) с раком толстого кишечника без тканевой эозинофилии.

Для изучения молекулярно-генетических факторов и оценки клинимоρφологических характеристик в группу больных раком желудка и толстого кишечника, сопровождающимся тканевой эозинофилией, вошли 204 человека, из них 100 пациентов с раком желудка (средний возраст  $64,2 \pm 7,2$  лет) и 104 пациента с раком толстого кишечника (средний возраст  $61,5 \pm 9,0$  лет). Группу пациентов без тканевой эозинофилии составили 113 человек с диагнозом рак желудка (средний возраст  $63,8 \pm 6,2$  лет) и 110 больных раком толстого кишечника (средний возраст  $62,9 \pm 6,0$  лет). В исследование были включены индивидуумы только европеоидного фенотипа (на основании антропологических особенностей пациентов и данных опроса), проживающие на территории г. Томска и Томской области, ввиду наличия значительных межрасовых различий в распределении генотипов и аллелей генов.

Критерием включения в исследование было наличие у пациентов злокачественных новообразований (рака) желудка и толстого кишечника.

Критериями исключения пациентов из исследования служили предоперационная лучевая и химиотерапия, обострение хронических или наличие сопутствующих заболеваний инфекционной, паразитарной и аллергической этиологии, наличие новообразований других локализаций, отказ от исследования.

### **Материал исследования**

Материалом исследования служили образцы тканей желудка и толстого кишечника, полученные при операционном вмешательстве у больных раком желудка и толстого кишечника соответственно. Для оценки эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани и проведения иммуногистохимического метода исследования была использована непосредственно опухолевая ткань; изучение аллельного полиморфизма генов *CCL11 (A384G)*, *CCR3 (T51C)*, *IL5 (C703T)*, *IL5RA (G80A)*, *TP53 (G215C)* и *CDKN1A (A1026G)* проводили с использованием образцов морфологически неизмененных тканей, полученных с границы резекции опухоли

при хирургическом лечении пациентов. Подготовка материала для исследования, а также гистологическая верификация опухолей проводились на базе патологоанатомического отделения ОГАУЗ «ГООД» (заведующий – д-р мед. наук И.Л. Пурлик).

### Методы исследования

- Полуколичественная оценка эозинофилии опухолевой ткани желудка и толстого кишечника. Подсчет тканевых эозинофилов осуществляли в «горячих точках» (т.е. в местах наибольшего скопления эозинофильных гранулоцитов), просматривали не менее 20 полей зрения ( $\times 400$ ). В случае если среднее количество эозинофильных гранулоцитов в просмотренных полях зрения превышало 10 клеток в одном поле зрения, это расценивали как эозинофильную инфильтрацию опухоли. При наличии единичных эозинофилов (среднее количество от 0 до 10 клеток в поле зрения) констатировали отсутствие опухолиассоциированной тканевой эозинофилии [Cho H. et al., 2016; Pehlivanoglu B. et al., 2016].

- Оценку экспрессии CCL11, p53, p21, VEGFR, EGFR опухолевыми клетками и CCR3 клетками микроокружения при раке желудка и толстого кишечника проводили на парафиновых срезах иммуногистохимическим методом по стандартной методике [Петрова С.В. и соавт., 2004] с использованием автоматического иммуногистостейнера Bond-maX (Leica Biosystems, Германия). В ходе исследования использовали моноклональные антитела фирмы «Abcam» (Великобритания) к CCL11 (клон EPR5825, рабочее разведение 1:100, кроличьи) и CCR3 (клон Y31, рабочее разведение 1:100, кроличьи), фирмы «Novocastra» (Leica Biosystems, Германия) к VEGFR (клон KLT9, рабочее разведение 1:100, мышинные), EGFR (клон EGFR.25, RTU, мышинные) и p21 (клон 4D10, рабочее разведение 1:40, мышинные); и моноклональные антитела марки «Bond» (Leica Biosystems, Германия) к p53 (клон DO-7, RTU, мышинные). Экспрессию исследуемых параметров определяли по количеству положительно окрашенных клеток (в %).

- Выделение ДНК из образцов тканей, полученных с границы резекции опухоли, согласно инструкции, прилагаемой к набору «FFPET DNA – Extraction Kit» (Биолинк, Новосибирск).

- Исследование полиморфных участков генов *CCL11 (A384G)*, *CCR3 (T51C)*, *IL5 (C703T)*, *IL5RA (G80A)*, *TP53 (G215C)* и *CDKN1A (A1026G)* с использованием рестрикционного анализа продуктов амплификации специфических участков генома (ПДРФ-анализ) [Fukunaga K. et al., 2001; Freidin M.B. et al., 2002; Ekinici S. et al., 2011; Кузнецова И.А. и соавт., 2012].

- Статистическая обработка результатов исследования.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с применением программы «SPSS Statistics» (2008, версия 17.0.1) фирмы «SPSS Inc.» и программы «Microsoft Excel» корпорации «Microsoft». Для проверки гипотезы и соответствия выборочных данных нормальному закону распределения использовали тест Шапиро-Уилка. Поскольку количественные параметры в группах исследования имели нормальное распределение, результаты представляли в виде среднего значения ( $M$ ) и стандартного квадратического отклонения ( $\sigma$ ). Проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (F-критерий). Использовали корреляционно-регрессионный анализ по Спирмену (коэффициент ранговой

корреляции  $r$ ). Для определения достоверности различий между группами сравнения по качественным признакам проводили анализ таблиц сопряженности с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона. В том случае, если хотя бы в одной ячейке ожидаемая частота принимала значение от 5 до 9, критерий Хи-квадрат рассчитывался с поправкой Йейтса. Для определения силы связи между переменными использовали критерий  $\phi$ , который отражает достоверность различий между процентными долями двух выборок. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Распределение генотипов по исследуемым полиморфным участкам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий Хи-квадрат Пирсона. Обработку результатов исследования осуществляли с применением критерия отношения шансов OR (OR – oddis ratio) с вычислением для него 95 % доверительного интервала [Сергиенко В.И. и соавт., 2006].

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Молекулярно-генетический механизм формирования тканевой эозинофилии при раке желудка и толстого кишечника**

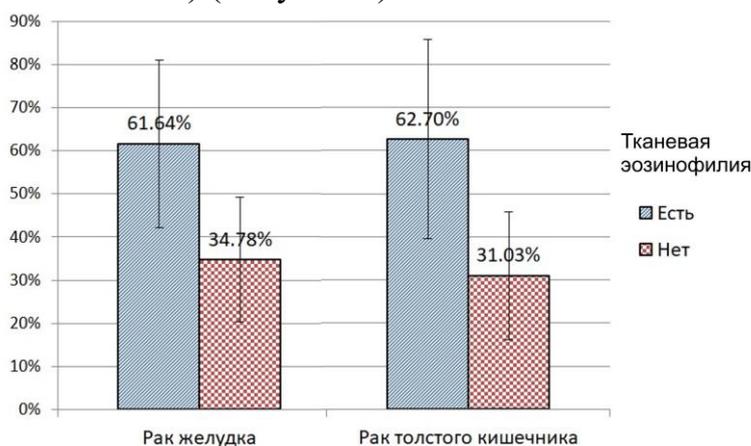
Тканевая эозинофилия регистрируется при злокачественных новообразованиях различной локализации, в том числе желудочно-кишечного тракта [Said M. et al., 2005; Legrand F. et al., 2010; Jain M. et al., 2014; Vaibhav S.L. et al., 2018; Jain S. et al., 2018]. В настоящем исследовании было проанализировано 650 гистологических препаратов опухолевой ткани желудка и толстого кишечника, среди которых эозинофильная инфильтрация опухоли была зарегистрирована у 34,0% больных раком желудка и 29,2% больных раком толстого кишечника до начала проведения специфической лучевой и лекарственной терапии.

Механизм тканевой эозинофилии при онкологических заболеваниях, исключая неопластическую трансформацию самих эозинофилов, может быть связан со способностью опухолевых клеток продуцировать хемотаксические факторы для эозинофилов [Зеленова О.В. и соавт., 2006; Kiziltas S. et al, 2008; Jain M. et al., 2014]. В то же время, эозинофильная инфильтрация может представлять собой своеобразный ответ макроорганизма на присутствие опухолевых клеток [Caruso R.A. et al., 2004].

Ключевым фактором хемотаксиса эозинофилов в желудочно-кишечный тракт и другие органы является эотаксин-1 (CCL11), действующий через специфический рецептор CCR3 [Колобовникова Ю.В. и соавт., 2014; Cho H. et al., 2016]. Считается, что CCL11 активирует G-белок-зависимые внутриклеточные сигнальные каскады эозинофильных гранулоцитов и, тем самым, опосредует миграцию клеток в ткани. Кроме этого, CCL11 может усиливать мобилизацию эозинофильных гранулоцитов из костного мозга, обуславливая увеличение их числа в периферической крови. По данным литературы, дисбаланс секреции CCL11 и экспрессии на клетках CCR3 может определять развитие тканевой эозинофилии при заболеваниях различной природы [Simson L. et al., 2007; Uhm T.G. et al., 2012; Колобовникова Ю.В. и соавт., 2014; Cho H. et al., 2016].

В нашей работе мы проанализировали взаимосвязь между экспрессией CCL11 и его рецептора CCR3 в опухолевой ткани и наличием тканевой эозинофилии у больных раком желудка и толстого кишечника.

По результатам исследования CCL11 визуализировался в цитоплазме опухолевых клеток во всех исследованных образцах. Однако при раке желудка и раке толстого кишечника с эозинофилией относительное содержание опухолевых клеток, экспрессирующих CCL11, в 1,7 и 2,0 раза соответственно превышало таковые у больных раком желудка и толстого кишечника без эозинофилии ( $F=32,20$ ;  $p<0,05$  и  $F=38,28$ ;  $p<0,05$  соответственно) (Рисунок 1).



**Рисунок 1** – Относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих CCL11 при раке желудка и толстого кишечника, % (среднее значение и стандартное квадратическое отклонение)

Установленный факт экспрессии CCL11 самими опухолевыми клетками желудка и толстого кишечника подтверждает способность трансформированных клеток набирать хемотаксические факторы, привлекающие в зону опухолевого поражения эозинофилы. Секретируемый опухолевыми клетками, CCL11 способен индуцировать не только хемотаксис эозинофилов, но и их дегрануляцию [Kim C.K. et al., 2010; Shamri R. et al., 2012].

Примечательно, что при изучении экспрессии CCL11 в опухолевой ткани положительное окрашивание было зарегистрировано в цитоплазме отдельных клеток микроокружения. Известно, что клетки околоопухолевого инфильтрата, а именно, тучные клетки, макрофаги и «здоровые» эпителиальные клетки способны секретировать CCL11 [Rothenberg M.E. et al., 1999], в тоже время, источником эотаксина-1 могут быть сами эозинофильные гранулоциты, способные к аутоактивации [Yellapurkar S. et al., 2016].

При исследовании в опухолевой ткани рецептора к эотаксину-1 его экспрессия была зарегистрирована на клетках микроокружения во всех исследованных образцах рака желудка и толстого кишечника. При этом у больных раком желудка с тканевой эозинофилией относительное количество клеток микроокружения, несущих CCR3, составляло  $15,84\% \pm 6,34\%$ , что достоверно превышало соответствующий параметр у пациентов с раком желудка без эозинофилии ( $8,70\% \pm 4,39\%$ ,  $F=22,56$ ;  $p<0,05$ ). Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей, которые рассматривают CCR3 в качестве основного патогенетического фактора развития тканевой эозинофилии [Колобовникова Ю.В. и соавт., 2014].

Анализируя возможные причины гиперэкспрессии рецептора к эотаксину-1 клетками микроокружения и, принимая во внимание другие факторы, обуславливающие возникновение тканевой эозинофилии, следует учитывать генетически детерминированный характер секреции цитокинов и их рецепторов [Fukunaga K. et al., 2001; Ekinici S. et al., 2011].

В нашем исследовании, мы провели анализ аллельных вариантов полиморфных сайтов генов *CCL11* (*A384G*) и *CCR3* (*T51C*) у больных раком желудка и толстого кишечника с наличием эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани.

При исследовании полиморфизма *A384G* гена *CCL11* у всех больных раком желудка и раком толстого кишечника наиболее часто регистрировался аллель *A* и генотип *AA*. Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма *A384G* гена *CCL11* среди обследованных пациентов, в зависимости от присутствия эозинофильных гранулоцитов в ткани опухоли, не выявил достоверных различий изученных параметров.

Анализируя распределения аллелей и генотипов полиморфизма *T51C* гена *CCR3* было показано, что у всех пациентов гомозиготный генотип по аллелю *T* преобладал над гомозиготным генотипом по аллелю *C* и гетерозиготным генотипом *TC*. При этом среди больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией гомозиготный генотип *CC* полиморфизма *T51C* гена *CCR3* встречался в 2,0 раза чаще (19,0% и 16,4% соответственно), чем у больных раком желудка и толстого кишечника без эозинофилии (8,0% и 7,3% соответственно). При раке желудка и толстого кишечника установлена положительная ассоциация гомозиготного генотипа *CC* (OR=2,71 (1,16-6,31) и OR=2,49 (1,03-6,05) соответственно) и аллеля *C* (OR=1,69 (1,13-2,53) и OR=1,87 (1,23-2,85) соответственно) с эозинофильной инфильтрацией опухолевой ткани.

Наряду с эотаксином-1 главным фактором активации эозинофильных гранулоцитов является интерлейкин (IL) 5, который избирательно стимулирует образование эозинофилов в костном мозге, модулирует экспрессию рецепторных структур на клетках и усиливает хемотаксис эозинофилов в ткани [Freidin M.V. et al., 2002; Колобовникова Ю.В. и соавт., 2014]. Свое действие IL-5 оказывает, связываясь с комплементарным рецептором IL-5R [Rosenberg H.F. et al., 2013].

Промоторная область генов *IL5* и *IL5RA* характеризуется полиморфностью структуры, что отражается на изменении сродства сайтов связывания к факторам транскрипции и, как следствие, на количестве синтезируемого белка [Hoffjan S. et al., 2004; Namkung J.-H. et al., 2007].

По результатам молекулярно-генетического исследования показаны статистически значимые различия в распределении генотипов и аллелей полиморфизма *C703T* гена *IL5* у больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией и без таковой (генотипы  $\chi^2=6,30$  и  $\chi^2=7,36$  соответственно,  $p_1<0,05$ ; аллели  $\chi^2=6,59$  и  $\chi^2=8,22$  соответственно,  $p_2<0,05$ ). Так, генотип *CC* полиморфизма *C703T* гена *IL5* у больных раком желудка и толстого кишечника с эозинофилией встречался в 61,0% и 60,6%, а у больных без эозинофилии лишь в 46,0% и 42,7% случаев соответственно. При раке желудка и толстого кишечника установлена положительная ассоциация эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани с носительством гомозиготного генотипа *CC* (OR=1,83 (1,06-3,17) и OR=2,06 (1,19-3,55) соответственно) и аллеля *C*

(OR=1,76 (1,14-2,72) и OR=1,84 (1,21-2,80) соответственно) полиморфизма *C703T* гена *IL5*.

При исследовании полиморфного сайта *G80A* гена *IL5RA* не было выявлено достоверных различий в распределении аллелей и генотипов у больных раком желудка и толстого кишечника в зависимости от наличия тканевой эозинофилии.

Таким образом, тканевая эозинофилия при злокачественных новообразованиях желудка и толстого кишечника обусловлена гиперэкспрессией опухолевыми клетками *CCL11*. Экспрессия клетками микроокружения *CCR3* определяет слаженное функционирование *CCL11/CCR3*-опосредованного механизма, необходимого для миграции в опухолевую ткань клеток и, прежде всего, эозинофильных гранулоцитов. Присутствие аллеля *C* и генотипа *CC* в промоторной области гена *CCR3 (T51C)* и аллеля *C* и генотипа *CC* в зоне промотора гена *IL5 (C703T)* увеличивает риск развития опухолеассоциированной тканевой эозинофилии, что указывает на генетически детерминированный характер эозинофильной инфильтрации при раке желудка и толстого кишечника.

Следует отметить, что в настоящее время не сформировано однозначное представление о значении опухолеассоциированной тканевой эозинофилии при злокачественных новообразованиях различной локализации. Согласно одним данным, наличие эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани связано с благоприятным прогнозом болезни, лучшей дифференцировкой опухоли и увеличением показателя пятилетней выживаемости пациентов [Jain M. et al., 2014; Narbaum L. et al., 2015]. В то же время, существуют данные о связи тканевой эозинофилии с неблагоприятным прогнозом, инвазией и ангиогенезом опухоли [Said M. et al., 2005; Jain M. et al., 2014].

В связи с этим, в настоящей работе мы изучили экспрессию в опухолевой ткани ключевых факторов, обеспечивающих баланс пролиферации клеток, а также проанализировали клинико-морфологические характеристики опухоли при раке желудка и толстого кишечника, ассоциированного с эозинофильной инфильтрацией.

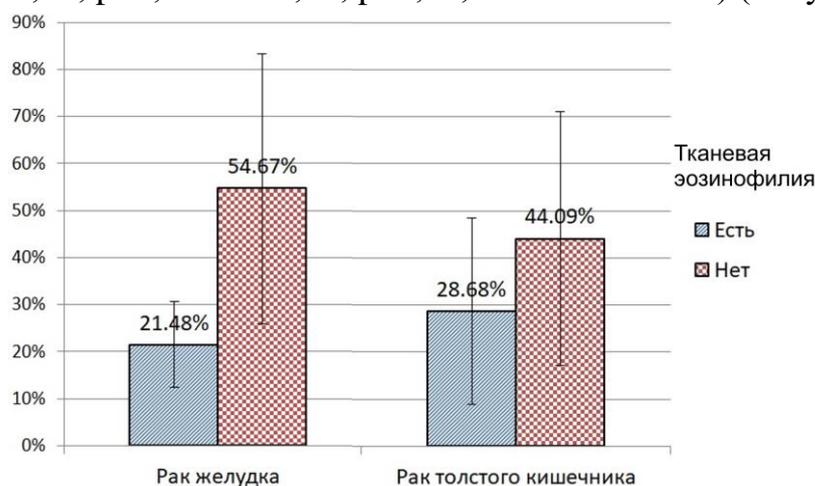
#### **Особенности экспрессии в опухолевой ткани белков p53 и p21 во взаимосвязи с полиморфизмом их генов при раке желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией**

Согласно данным литературы, активность опухолевого процесса и функциональное состояние опухолевых клеток характеризуется экспрессией белков-регуляторов клеточного цикла p53 и p21.

Известно, что белок p53 выполняет супрессорную функцию в отношении опухолевой трансформации путем подавления деления клеток и стимуляции апоптоза [Ченцов Ю.С. и соавт., 2005; Белоусова А.И. и соавт., 2009]. Белок p53 выступает в роли транскрипционного фактора для гена *CDKN1A*, кодирующего белок ингибитор циклин-зависимых киназ p21 [Желтухин А.О. и соавт., 2010]. Распространенным молекулярным изменением в опухолевых клетках является инактивация белка p53 [Заридзе Д.Г., 2004], вызванная появлением миссенс-мутаций гена *TP53*, приводящих к изменениям в аминокислотной последовательности белка. Мутантная форма белка p53 не проявляет функциональную активность, характерную для белка дикого типа, и может инактивировать продукт, синтезируемый с неповрежденного аллеля [Заридзе Д.Г., 2004].

В результате проведенного нами исследования показано, что в образцах тканей

рака желудка и толстого кишечника, сопровождающихся эозинофилией, уровень экспрессии мутантной формы белка p53 был достоверно ниже аналогичного параметра в образцах опухолевой ткани желудка и толстого кишечника без эозинофилии ( $F=30,51$ ;  $p<0,05$  и  $F=5,45$ ;  $p<0,05$ , соответственно) (Рисунок 2).



**Рисунок 2** – Относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих мутантный белок p53, при раке желудка и толстого кишечника, % (среднее значение и стандартное квадратическое отклонение)

При изучении в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника экспрессии белка-регулятора клеточного цикла p21, настоящее исследование не позволило выявить достоверных различий ее уровня в зависимости от наличия тканевой эозинофилии ( $F=2,53$ ;  $p>0,05$  и  $F=3,12$ ;  $p>0,05$  соответственно). В то же время во всех исследованных образцах опухолевой ткани этот показатель превышал значение 10%, рассматриваемое многими авторами в качестве достаточного для реализации функции белка p21 в ядре клетки [Prall F. et al., 2004; Cheng H. et al., 2015].

Поскольку экспрессия белка p21 находится под контролем белка p53, мы проанализировали связь между экспрессией этих белков в тканях злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника. Установлена обратная корреляционная зависимость между экспрессией опухолевыми клетками мутантного белка p53 и белка-регулятора клеточного цикла p21 ( $r=-0,63$ ;  $p<0,05$  и  $r=-0,59$ ;  $p<0,05$  соответственно) у больных раком желудка и толстого кишечника, сопровождающемся эозинофильной инфильтрацией опухоли.

В целом, при раке желудка и раке толстого кишечника с тканевой эозинофилией экспрессия опухолевыми клетками белка p21 сопряжена с низкой экспрессией в них мутантного белка p53. В связи с этим, можно предположить, что в опухолевых клетках желудка и толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией p53-зависимый путь активации белка-регулятора клеточного цикла p21 функционирует более эффективно.

Появление в клетках функционально различных форм белка p53 может быть следствием точечных мутаций, возникающих в экзонной области гена *TP53*. Полиморфизм *G215C* гена *TP53* приводит к наработке определенной изоформы p53, которая более эффективно индуцирует апоптоз [Rogler A. et al., 2011].

При исследовании распределения генотипов и аллелей полиморфизма *G215C* гена *TP53* среди обследованных лиц у больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией достоверно чаще регистрировались аллель G и генотип GG.

Установлена положительная ассоциация тканевой эозинофилии с носительством гомозиготного генотипа *GG* (OR=2,19 (1,24-3,88) и OR=2,09 (1,20-3,66) соответственно) и аллеля *G* (OR=1,91 (1,19-3,07) и OR=1,96 (1,24-3,08) соответственно) полиморфизма *G215C* гена *TP53* при раке желудка и толстого кишечника. По данным литературы, присутствие аллеля *G* обуславливает синтез белка p53 с выраженными проапоптотическими свойствами [Rogler A. Et al., 2011]. Наличие данной изоформы белка в нормальных клетках желудка и толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией опухоли, по-видимому, может обеспечивать более эффективный контроль пролиферации клеток и их элиминацию при повреждении. С этим фактом может быть косвенно связана выявленная нами гипоекспрессия мутантной формы белка p53 в ядрах опухолевых клеток при раке желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией.

Анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизма *A1026G* гена *CDKN1A*, проведенный в нашем исследовании, позволил установить, что у больных раком желудка и раком толстого кишечника независимо от наличия тканевой эозинофилии преобладали аллель *A* и гомозиготный генотип *AA*. Статистически значимых различий в распределении генотипов и аллелей полиморфизма *CDKN1A* (*A1026G*) между группами пациентов с тканевой эозинофилией и без нее выявлено не было.

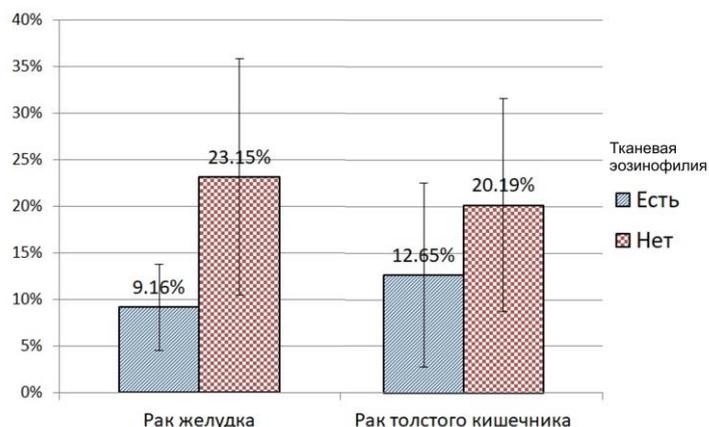
В целом, сохранение в опухолевых клетках желудка и толстого кишечника p53/p21-опосредованного механизма регуляции клеточной пролиферации может определять менее агрессивное течение опухолевого процесса, ассоциированного с тканевой эозинофилией.

### **Особенности экспрессии рецепторов ростовых факторов VEGF и EGF при раке желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией**

В регуляции клеточной пролиферации участвуют многие ростовые факторы, в частности, эпидермальный (EGF) и сосудисто-эндотелиальный (VEGF) факторы роста [Ciardiello F. et al., 2006; Колобовникова Ю.В. и соавт., 2011; Zhang B. et al., 2017; Chen X. et al., 2017; Sticz T. et al., 2018].

Эпидермальный фактор роста, связываясь со своим рецептором EGFR, может инициировать синтез онкогенных белков и обеспечивать растормаживание пролиферации опухолевых клеток [Duffy M.J., 2011; Sticz T. et al., 2018]. В большинстве эпителиальных опухолей человека регистрируется высокая экспрессия EGFR. Гиперэкспрессия этого рецептора опухолевыми клетками при раке молочной железы, раке яичников, раке желудка и др. является показателем плохого прогноза, ассоциируется с метастазированием опухоли и поздними стадиями болезни [Ciardiello F. al., 2006; Lieto E. et al., 2008; Niyaz M. et al., 2015; Sticz T. et al., 2018].

В нашем исследовании мы оценивали экспрессию EGFR опухолевыми клетками желудка и толстого кишечника в зависимости от наличия тканевой эозинофилии. Установлено, что при раке желудка и раке толстого кишечника с эозинофилией количество опухолевых клеток, экспрессирующих EGFR, оказалось значительно ниже такового при раке желудка и толстого кишечника без эозинофилии (Рисунок 3).



**Рисунок 3** – Относительное содержание опухолевых клеток, экспрессирующих EGFR, при раке желудка и толстого кишечника, % (среднее значение и стандартное квадратическое отклонение)

Несмотря на то, что эозинофильные гранулоциты и другие клетки опухолевого инфильтрата являются активными продуцентами EGF [Mendelsohn J. et al., 2003], низкий уровень экспрессии EGFR либо его отсутствие на опухолевых клетках существенно снижает вероятность их активной пролиферации в связи с нарушением механизмов рецепции и проведения сигнала внутрь клетки.

В качестве промотора пролиферации опухолевых клеток может выступать также VEGF - фактор, обеспечивающий рост и выживание опухоли через образование новых кровеносных сосудов [Shibuya M. et al., 2011; Chen X. et al., 2017;]. Основным источником VEGF в опухоли являются трансформированные клетки и в меньшей степени элементы микроокружения [Shibuya M. et al., 2011]. При этом VEGF, продуцируемый трансформированными клетками, может усиливать рост опухоли по аутокринному механизму. Рецепторы к VEGF представлены, главным образом, на мембране эндотелиоцитов, однако, их экспрессия регистрируется и на клетках злокачественных опухолей матки, предстательной железы, щитовидной железы и др. [Pallares J. et al., 2006; Rodriguez-Antona C. et al., 2010; Chen X. et al., 2017].

В результате проведенного нами исследования, во всех образцах рака желудка и толстого кишечника отмечалась положительная реакция опухолевых клеток на VEGFR. Относительное содержание опухолевых клеток, экспрессирующих VEGFR, у больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией и без нее было сопоставимым. Отсутствие взаимосвязи между тканевой эозинофилией и экспрессией данного рецептора при раке желудка и толстого кишечника указывает на то, что эозинофильные гранулоциты опухолевой ткани не влияют на экспрессию клетками опухолей VEGFR, несмотря на потенциальную возможность эозинофилов выделять в окружающую ткань сосудисто-эндотелиальный фактор роста.

### **Клинико-морфологическая характеристика опухолей у больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией**

Клинико-морфологическая характеристика опухолей включает оценку степени дифференцировки опухоли, наличие очагов метастазирования, показатели: одногодичной летальности, выживаемости, смертности и др. Метастазирование является маркерным признаком опухолевой прогрессии, а степень дифференцировки опухоли – критерием ее злокачественности. Очаги метастатического поражения в первую очередь регистрируются в регионарных лимфатических узлах. Состояние

регионарных лимфатических узлов у больных раком желудка и толстого кишечника является одним из наиболее значимых факторов, определяющих прогноз заболевания и выбор терапии.

В результате гистологического исследования образцов опухолевой ткани в 89,4% случаев рака толстого кишечника, сопровождающегося тканевой эозинофилией, была зарегистрирована высокая и умеренная степень дифференцировки опухоли, в то время как при раке толстого кишечника без эозинофилии лишь 65,5% опухолей были высоко- и умеренно дифференцированными ( $\chi^2=17,40$ ,  $p<0,05$ ). При раке толстого кишечника установлена связь средней силы между тканевой эозинофилией и высокой и умеренной степенью дифференцировки опухоли ( $\phi=0,285$ ). Анализ степени дифференцировки опухоли при раке желудка с эозинофильной инфильтрацией и без нее не позволил установить статистически значимых различий ( $\chi^2=1,95$ ,  $p>0,05$ ), у больных раком желудка как с эозинофилией так и без эозинофилии преобладали опухоли умеренной и высокой степени дифференцировки (66,0% и 56,6% соответственно).

В связи с тем, что высокодифференцированные опухоли не в полной мере утрачивают антигенные структуры, обладающие иммуногенностью [Заридзе Д.Г., 2004], реакция макроорганизма на такие новообразования более выражена и, по-видимому, сопряжена с вовлечением в процесс эозинофильных гранулоцитов. Полученные нами результаты не противоречат данным зарубежных авторов, согласно которым эозинофильная инфильтрация злокачественных новообразований сочетается с благоприятными морфологическими характеристиками и фенотипом опухоли [Namkung J.-H. et al., 2007].

В настоящем исследовании мы также оценивали наличие очагов метастазирования у больных раком желудка и толстого кишечника в зависимости от присутствия эозинофильных гранулоцитов в ткани опухоли. При оценке состояния регионарных лимфатических узлов только у 17% больных раком желудка, сопровождающимся эозинофильной инфильтрацией, были диагностированы лимфогенные метастазы. В свою очередь, лимфатические узлы были вовлечены в опухолевый процесс в 32,7% случаев ( $\chi^2=6,95$ ,  $p<0,05$ ) при раке желудка без эозинофилии. Установлена взаимосвязь тканевой эозинофилии с отсутствием очагов регионарного метастазирования при раке желудка ( $\phi=0,181$ ,  $p<0,05$ ). При анализе частоты встречаемости метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у больных раком толстого кишечника с эозинофилией наблюдалась схожая тенденция. Низкий метастатический потенциал опухолей желудка и толстого кишечника в сочетании с тканевой эозинофилией может быть связан с выявленной нами гипоэкспрессией опухолевыми клетками EGFR. Снижение экспрессии рецепторов к EGF определяет менее эффективное проведение сигнала внутрь клетки, что обуславливает снижение скорости пролиферации клеток и темпа роста опухоли.

В нашем исследовании был проведен анализ одногодичной летальности среди больных раком желудка и толстого кишечника с учетом эозинофильной инфильтрации ткани новообразования. Так, у больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией показатель одногодичной летальности составил 14% и 8,6% соответственно, что оказалось примерно на 4% ниже соответствующих показателей у пациентов без эозинофилии. Однако различия в данном показателе оказались статистически не значимыми, что может быть связано с низким уровнем

одногодичной летальности в группах пациентов, включенных в исследование. В настоящее исследование не вошли больные с запущенными формами злокачественных новообразований ЖКТ, которым не проводилось хирургическое лечение.

Резюмируя вышеизложенное, следует заключить, что тканевая эозинофилия чаще сопровождает высоко- и умеренно дифференцированные опухоли (при раке толстого кишечника) без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов (при раке желудка) с относительно сохраненными антимутационными механизмами противоопухолевой резистентности; и ассоциирована с нарушением баланса экспрессии факторов, регулирующих пролиферацию опухолевых клеток.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

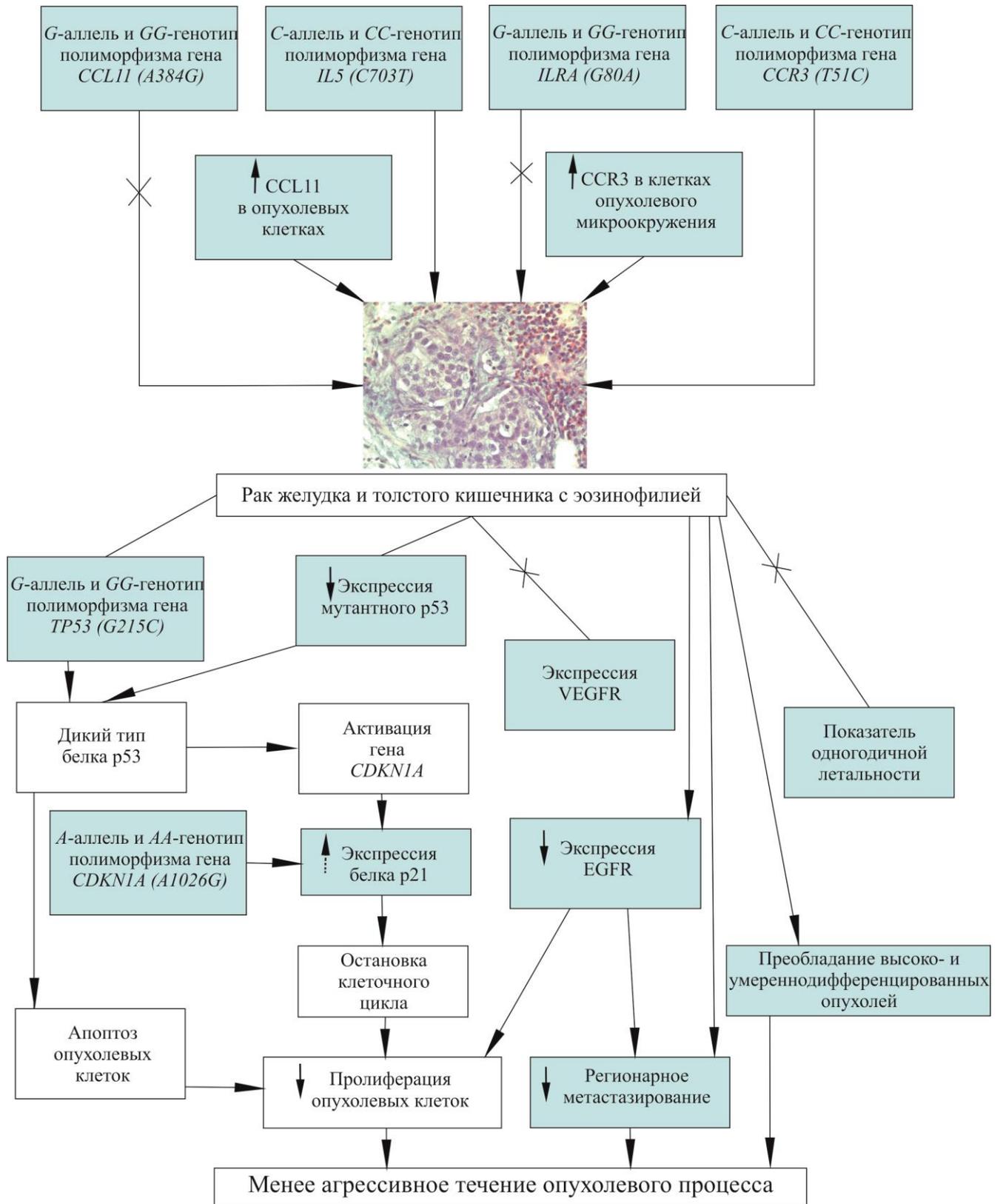
Опухолеассоциированная тканевая эозинофилия регистрируется более чем в 25% случаев рака желудка и рака толстого кишечника до начала проведения лучевой и химиотерапии. Опухолевые клетки желудка и толстого кишечника способны продуцировать *SCL11*, что опосредует привлечение в ткань новообразований *CCR3*-экспрессирующих эозинофилов. Носительство генотипов *CC* полиморфизма *T51C* гена *CCR3* и *CC* полиморфизма *C703T* гена *IL5* увеличивает риск развития тканевой эозинофилии при раке желудка и раке толстого кишечника, что указывает на генетически детерминированный характер этой реакции.

При изучении особенностей злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника в зависимости от наличия эозинофильной инфильтрации показаны существенные различия основных молекулярно-генетических и клинико-морфологических признаков заболевания.

Установлено, что при раке желудка и толстого кишечника, сопровождающемся тканевой эозинофилией, экспрессия белка-регулятора клеточного цикла *p21* в ткани опухоли сочетается с низкой экспрессией мутантной формы белка *p53* опухолевыми клетками; достоверно чаще регистрируется аллель *G* и генотип *GG* полиморфизма *G215C* гена *TP53*, детерминирующий синтез белка *p53* с выраженными проапоптотическими свойствами. Это указывает на сохранение механизмов регуляции клеточной пролиферации в значительной части опухолевых клеток желудка и толстого кишечника. Низкая экспрессия *EGFR* опухолевыми клетками при раке желудка и толстого кишечника с эозинофилией обуславливает возможное снижение пролиферативного потенциала клеток опухоли в связи с нарушением механизмов рецепции и проведения сигнала внутрь клетки.

Ассоциация тканевой эозинофилии с более высокой степенью дифференцировки опухоли при раке толстого кишечника и отсутствием метастатического поражения регионарных лимфатических узлов при раке желудка в сочетании с дисбалансом экспрессии факторов регуляции пролиферации опухолевых клеток, указывает на более благоприятное течение опухолевого процесса при раке желудка и толстого кишечника, ассоциированного с эозинофильной инфильтрацией.

В результате проведенного нами исследования получены новые фундаментальные данные, существенно расширяющие современные представления о злокачественных новообразованиях желудка и толстого кишечника, сопровождающихся тканевой эозинофилией (Рисунок 4). Дальнейшее изучение опухолеассоциированной эозинофилии перспективно ввиду возможности применения данной реакции в качестве дополнительного критерия прогноза течения и прогрессии онкологических заболеваний.



**Рисунок 4** — Патогенетические факторы развития и прогрессии рака желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией (по данным Cho H. et al. (2016), Pehlivanoglu B. et al. (2016), Zhou Y. et al. (2016), Peurala E. et al. (2018) и результатам собственных исследований (выделено цветом))

## ВЫВОДЫ

1. Тканевая эозинофилия при злокачественных новообразованиях желудка и толстого кишечника до проведения лучевой и лекарственной терапии ассоциирована с увеличением экспрессии *CCL11*/эотаксина опухолевыми клетками и рецептора *CCR3* клетками микроокружения.
2. К развитию тканевой эозинофилии при раке желудка и толстого кишечника предрасполагает носительство аллеля *C* и генотипа *CC* полиморфизма *T51C* гена *CCR3* и аллеля *C* и генотипа *CC* полиморфизма *C703T* гена *IL5*. Полиморфизм генов *CCL11 (A384G)* и *IL5RA (G80A)* не связан с эозинофильной инфильтрацией ткани опухолей желудка и толстого кишечника.
3. Низкая экспрессия мутантного белка p53 в ядрах опухолевых клеток и носительство генотипа *GG* и аллеля *G* полиморфизма *G215C* гена *TP53* сочетается с тканевой эозинофилией при раке желудка и толстого кишечника.
4. Уровень экспрессии белка p21 (негативного регулятора клеточного цикла) опухолевыми клетками и распределение полиморфных вариантов гена *CDKN1A (A1026G)* у больных раком желудка и толстого кишечника не связаны с опухолеассоциированной тканевой эозинофилией.
5. У больных раком желудка и толстого кишечника низкая экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) опухолевыми клетками определяется в сочетании с эозинофильной инфильтрацией; экспрессия рецепторов сосудисто-эндотелиального фактора (VEGF) не зависит от наличия эозинофильных гранулоцитов в ткани опухоли.
6. Эозинофильная инфильтрация опухолевой ткани желудка и толстого кишечника ассоциирована с более высокой степенью дифференцировки опухоли у больных раком толстого кишечника, отсутствием метастатического поражения лимфатических узлов у больных раком желудка и не связана с показателем одногодичной летальности пациентов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ассоциация полиморфизма гена *IL5 (C703T)* с развитием тканевой эозинофилии у больных раком толстой кишки / А.И. Дмитриева, О.И. Уразова, **К.И. Янкович** и др. // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10 (19), № 2. – С. 317-318.
2. Опухлеассоциированная эозинофилия / **К.И. Янкович**, А.И. Дмитриева, О.И. Уразова и др. // **Вопросы онкологии**. – 2016. – Т. 62, № 4. – С. 394-400.
3. Роль эотаксина и его рецептора в механизмах формирования опухолеассоциированной тканевой эозинофилии у больных раком толстой кишки / **К.И. Янкович**, А.И. Дмитриева, Ю.В. Колобовникова и др. // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10 (19), № 3. – С. 372-374.
4. Связь аллельного полиморфизма гена *IL5 C703T* с формированием тканевой эозинофилии при раке толстой кишки / **К.И. Янкович**, А.И. Дмитриева, Ю.В. Колобовникова и др. // Материалы Российской научно-практической конференции с международным участием «Высокие технологии в онкологической практике», посвященной 70-летию онкологической службы Алтайского края. – Барнаул, 2016. – С. 234-235.
5. Экспрессия рецепторов факторов ангиогенеза на клетках рака желудка, ассоциированного с тканевой эозинофилией / А.И. Дмитриева, **К.И. Янкович**, Ю.В. Колобовникова и др. // Злокачественные опухоли. Материалы XX Российского онкологического конгресса. – Москва, 2016. – № 1, Спецвыпуск. – С. 318-319.

6. Роль опухолеассоциированной эозинофилии в патогенезе рака желудка / **К.И. Янкович**, А.И. Дмитриева, Ю.В. Колобовникова и др. // Успехи молекулярной онкологии. Материалы II Всероссийской конференции по молекулярной онкологии. – Москва, 2016. – Т. 3, № 4. – С. 26-27.
7. Значение гемической и тканевой эозинофилии при раке толстой кишки / А.И. Дмитриева, **К.И. Янкович**, О.И. Уразова и др. // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Т. 61, Приложение 1. – С. 112.
8. Значение тканевой эозинофилии при раке толстой кишки / Ю.В. Колобовникова, **К.И. Янкович**, А.И. Дмитриева // Материалы XXII всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии-2016». – Санкт-Петербург, 2016. – С. 35-36.
9. Связь тканевой эозинофилии с морфологическими параметрами рака толстой кишки / **К.И. Янкович**, А.И. Дмитриева, Ю.В. Колобовникова и др. // Сборник тезисов II Петербургского онкологического форума «Белые ночи-2016». – Санкт-Петербург, 2016. – С. 326.
10. Роль опухолеассоциированной тканевой эозинофилии в патогенезе рака желудка / **К.И. Янкович**, А.И. Дмитриева, Ю.В. Колобовникова и др. // **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова**. – 2017. – Т. 103, № 5. – С. 582-590.
11. Молекулярно-генетические и морфологические особенности злокачественных новообразований желудка и толстой кишки с тканевой эозинофилией / А.И. Дмитриева, **К.И. Янкович**, Ю.В. Колобовникова и др. // **Казанский медицинский журнал**. – 2017. – Т. 98, № 4. – С. 496-503.
12. Механизмы формирования опухолеассоциированной тканевой эозинофилии при раке желудка и толстой кишки / В.В. Новицкий, **К.И. Янкович**, Ю.В. Колобовникова и др. // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. – 2017. – Т. 61, № 4. – С. 74-80.
13. Аллельный полиморфизм генов *p53 (G215C)* и *p21 (A1026G)* у больных раком желудка с опухолеассоциированной с тканевой эозинофилией / Е.А. Ермолаева, **К.И. Янкович** // Сборник тезисов XXIII всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии-2017». – Санкт-Петербург, 2017. – С. 79-80.
14. Эотаксин и его рецептор при раке желудка с тканевой эозинофилией / **К.И. Янкович**, Ю.В. Колобовникова, А.И. Дмитриева и др. // Сборник научных работ III Петербургского онкологического форума «Белые ночи-2017». – Санкт-Петербург, 2017. – С. 90.
15. Исследование ассоциации аллельных вариантов генов *CCL11 (A384G)* и *CCR3 (T51C)* с развитием тканевой эозинофилии при раке желудка и толстой кишки / **К.И. Янкович** // Материалы XX международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье». – Санкт-Петербург, 2017. – С. 638-639.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- CCL – (C-C motif Chemokine Ligand) – хемокиновый лиганд, содержащий два остатка цистеина подряд
- CCR – (C-C Chemokine Receptor) – хемокиновый рецептор
- CDKN1A* – (cyclin dependent kinase inhibitor 1A) – ген ингибитора циклин-зависимой киназы 1A
- EGFR – (epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста
- IL – (interleukin) – интерлейкин
- IL5RA* – (interleukin 5 Receptor Subunit Alpha) – ген, кодирующий  $\alpha$ -субъединицу рецептора интерлейкина 5
- TATE – (Tumor-Associated Tissue Eosinophilia) – опухолеассоциированная тканевая эозинофилия
- TP53* – (tumor protein p53) – ген опухолевого белка p53
- VEGFR – (vascular endothelial growth factor receptor) – рецептор фактора роста эндотелия сосудов