

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук
А.И. Дмитриева
доктор медицинских наук
Ю.В. Колобовникова

Томск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....		4
...		
Глава 1.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1	Эпидемиология злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта.....	15
1.2	Этиология и патогенез рака желудка.....	17
1.3	Этиология и патогенез рака толстого кишечника.....	21
1.4	Молекулярно-генетические основы канцерогенеза.....	23
1.4.1	Роль белков-регуляторов клеточного цикла в механизме развития опухолей.....	23
1.4.2	Связь полиморфизма генов белков p53 и p21 с развитием опухолевых заболеваний.....	28
1.4.3	Роль факторов роста и их рецепторов в механизме развития опухолей.....	30
1.5	Современные представления об опухолеассоциированной тканевой эозинофилии.....	34
1.5.1	Механизмы тканевой эозинофилии и ее роль в патогенезе опухолевого процесса.....	38
Глава 2.	МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45

2.1	Клиническая характеристика обследованных пациентов.....	45
2.2	Материал исследования.....	48
2.3	Методы исследования.....	49
2.3.1	Оценка эозинофилии опухолевой ткани желудка и толстого кишечника.....	49
2.3.2	Оценка экспрессии CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника.....	51
2.3.3	Оценка экспрессии VEGFR и EGFR в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника.....	52
2.3.4	Оценка экспрессии белков-регуляторов клеточного цикла p53 и p21 в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника.....	53
2.3.5	Выделение ДНК.....	54
2.3.6	Исследование аллельного полиморфизма генов <i>CCL11 (A384G)</i> , <i>CCR3 (T51C)</i> , <i>IL5 (C703T)</i> , <i>IL5RA (G80A)</i> , <i>TP53 (G215C)</i> и <i>CDKN1A (A1026G)</i>	54
2.3.7	Статистическая обработка результатов исследования.....	57
Глава 3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	60
3.1	Экспрессия CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани у больных раком желудка и толстого кишечника.....	60
3.2	Распределение генотипов и аллелей генов эозинофил-активирующих цитокинов и их рецепторов у больных раком	

	желудка и толстого кишечника.....	66
3.3	Экспрессия белков p53 и p21 в опухолевой ткани у больных раком желудка и толстого кишечника.....	72
3.4	Распределение генотипов и аллелей генов <i>TP53 (G215C)</i> и <i>CDKN1A (A1026G)</i> у больных раком желудка и толстого кишечника.....	78
3.5	Экспрессия рецепторов к VEGF и EGF в опухолевой ткани у больных раком желудка и толстого кишечника.....	81
3.6	Клинико-морфологическая характеристика злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией.....	87
Глава 4.	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		117
...		
ВЫВОДЫ.....		119
...		
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....		120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования желудка и толстого кишечника занимают одно из первых мест в структуре онкологической заболеваемости населения России [7] и характеризуются широкой распространенностью, тенденцией к раннему метастазированию, несвоевременностью диагностики, недостаточной эффективностью существующих методов лечения [22].

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) [102, 111, 118, 155]. 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 [10, 50]. По данным литературы, опухолевые клетки способны самостоятельно секретировать эозинофил-активирующие цитокины [34, 54, 155].

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 [37, 82, 166]. 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* [37, 83, 100].

Присутствие эозинофильных гранулоцитов в составе опухолевого микроокружения рассматривается неоднозначно. В большинстве научных работ преобладает мнение о цитотоксической активности эозинофильных гранулярных протеинов в отношении опухолевых клеток [89, 128]. Наряду с этим, в литературе

описаны различные рецепторные структуры и регуляторные белки, посредством которых эозинофилы могут участвовать в патогенезе опухолевого роста.

Эозинофильные гранулоциты секретируют медиаторы, регулирующие процессы клеточной пролиферации и неоангиогенеза опухоли [134, 151]. 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 растормаживание пролиферации опухолевых клеток [55]. Взаимодействие VEGF со своим рецептором обеспечивает образование новых кровеносных и лимфатических сосудов, представляющих собой пути метастазирования опухоли.

Негативными регуляторами пролиферации опухолевых клеток являются белки-регуляторы клеточного цикла (p53 и p21). Белок p53, кодируемый антионкогеном *TP53*, препятствует безостановочному делению клетки и запускает механизм апоптоза при невозможности репарации повреждений ДНК [15, 24]. В регуляции клеточного цикла белок 53 играет роль транскрипционного фактора гена *CDKN1A*, кодирующего ингибитор циклин-зависимых киназ – белок p21 [4]. В опухолевых клетках часто обнаруживаются мутации гена *TP53*, сопровождающиеся изменением структуры белка, вместе с тем, существует связь с аллельным полиморфизмом этого гена [5]. Экзонный *G215C*-полиморфизм гена *TP53* связывают с неблагоприятным фенотипом опухолей [9]. Также имеются данные о связи полиморфизма *A1026G* гена *CDKN1A* с предрасположенностью к развитию злокачественных новообразований различной локализации [35, 36, 124]. Нарушение экспрессии в опухолевой ткани белков-регуляторов клеточного цикла p53 и p21 может быть обусловлено также регуляторным влиянием клеток опухолевого 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 [110, 125]. 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. и соавт., 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. [34, 89, 145, 151]. 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 [54]. Другие исследователи, установили положительную связь между выраженной тканевой эозинофилией и пятилетней безрецидивной выживаемостью пациентов [155]. Наряду с этим, в литературе имеются сведения о негативном влиянии тканевой эозинофилии на прогноз течения болезни [34, 151]. 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 [152]. В своей работе авторы сделали вывод о наличии ассоциации ТАТЕ с низкой выживаемостью пациентов. По данным литературы, ассоциированная с опухолью тканевая эозинофилия является показательной для прогнозирования появления метастазов в лимфатических узлах при злокачественных новообразованиях ротовой полости [61].

Таким образом, исследование особенностей патогенеза злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника во взаимосвязи с тканевой эозинофилией является своевременным ввиду перспективности использования ТАТЕ 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 на мембране клеток опухолевого микроокружения. Впервые у больных раком желудка и раком толстого кишечника выявлена ассоциация тканевой эозинофилии с носительством аллеля *C* и генотипа *CC* полиморфизма *T-51C* гена *CCR3* и аллеля *C* и генотипа *CC* полиморфизма *C-703T* 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 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 роли факторов роста в опухолевой ткани при раке желудка и толстого кишечника впервые зарегистрирована связь эозинофильной инфильтрации с гипоэкспрессией 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 оказывает существенного влияния на показатель одногодичной летальности больных раком желудка и раком толстого кишечника.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные фундаментальные данные существенно расширяют современные представления о патогенезе опухолевого процесса, сопряженного с тканевой эозинофилией. Эозинофильная инфильтрация опухолевой ткани при раке желудка и раке толстого кишечника развивается вследствие гиперэкспрессии опухолевыми клетками *CCL11/эотаксина* и высокой экспрессии *CCR3* на мембране клеток микроокружения опухоли. 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 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 менее выраженным пролиферативным потенциалом трансформированных клеток обосновывает участие эозинофильных гранулоцитов в патогенезе рака желудка и толстого кишечника. Полученные новые данные о молекулярно-генетических и клинικο-морфологических особенностях злокачественных новообразований желудка и 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 клинικο-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 *CCL11*/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, 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 опухолеассоциированной 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиология злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта

Рак желудка и толстого кишечника привлекает к себе пристальное внимание ввиду его широкой распространенности, трудностей своевременной диагностики и неблагоприятного прогноза [7, 22].

По сводным эпидемиологическим данным, рак желудка является пятым по распространенности и третьим по смертности среди злокачественных новообразований в мире: ежегодно возникает более 950 тысяч новых случаев рака желудка (6,8% от общего числа впервые выявленных злокачественных новообразований), а количество смертельных исходов превышает 700 тысяч (8,8% от общего числа умерших от злокачественных новообразований) [84]. Самый высокий уровень заболеваемости раком желудка отмечен в Республике Корея, Монголии и Японии, высокий – в Азии и Латинской Америке, самый низкий – в Западной Африке [84].

В России среди всех онкологических заболеваний рак желудка занимает пятое место не зависимо от половой принадлежности [1, 7]. Несмотря на совершенствование методов диагностики и ежегодное снижение уровня заболеваемости, рак желудка по-прежнему удерживает одну из лидирующих позиций по показателю несвоевременной диагностики. В 2017 г. в России диагноз рак желудка впервые был установлен у 23,6% больных на III стадии заболевания и 40,3% – на IV. Летальность на первом году с момента постановки диагноза составила 48,5%. В структуре постадийного распределения первично выявленных больных в Томской области рак желудка на I-II стадии был диагностирован в 43,8% случаев, на III и IV стадии – 14,7% и 38,4% соответственно, для 3,1% случаев стадия была не установлена [22]. В 2017 году в структуре онкологической смертности

населения в Томской области рак желудка занимал третье место после злокачественных опухолей трахеи, бронхов и легкого и новообразований толстого кишечника. Несмотря на снижение показателей заболеваемости и смертности населения России от рака желудка, проблема злокачественных новообразований желудка не теряет своего первостепенного значения. Актуальность определяется высоким удельным весом рака желудка в структуре смертности от онкологических заболеваний и неблагоприятным прогнозом [7, 22].

В свою очередь, рак толстого кишечника по показателю заболеваемости среди злокачественных новообразований в мире является третьим у мужчин и вторым у женщин, что составляет 746 и 614 тысяч новых случаев в год соответственно (согласно статистике GLOBOCAN). Общая смертность от злокачественных новообразований толстого кишечника составляет 694 тысяч случаев в год, что указывает на неблагоприятный прогноз этого заболевания [84]. Чаще всего рак толстого кишечника регистрируется в Северной Америке, Австралии и Европе, вследствие этого он рассматривается как болезнь западного образа жизни. Наибольший уровень заболеваемости зафиксирован среди экономически обеспеченных групп населения. Соотношение рака ободочной и прямой кишки составляет примерно 2:1, однако в странах с низким уровнем заболеваемости рак ободочной кишки и рак прямой кишки выявляются приблизительно с одинаковой частотой. Рак ободочной кишки одинаково часто встречается как у мужчин, так и у женщин, рак прямой кишки достоверно чаще – у мужчин [130].

В структуре онкологической заболеваемости населения России рак ободочной кишки занимает пятое место среди мужчин и четвертое место среди женщин, в Томской области – четвертое и третье места соответственно [7]. По показателю смертности данная онкопатология находится на втором месте в России, уступая лишь злокачественным новообразованиям трахеи, бронхов и легкого. В структуре онкологической смертности населения Томской области новообразования толстого кишечника занимают третье место [7].

1.2 Этиология и патогенез рака желудка

Известно, что возникновение рака желудка является результатом сложных взаимодействий факторов окружающей среды и генетической предрасположенности организма человека. Существуют географические различия, временные тенденции и миграционные влияния на заболеваемость раком желудка. Предполагается, что экологические факторы и образ жизни являются одними из основных причин этого заболевания.

Повышенному риску развития рака желудка подвергаются пациенты с наличием таких заболеваний, как хронический гастрит, аденома желудка, язва желудка, метаплазия кишечника, семейный аденоматозный полипоз [131] и пернициозная анемия [5]. Кроме этого, факторами риска для рака желудка считаются профессиональные вредности, связанные с работой в резиновой и угольной промышленности [51]. Генетические факторы включают «семейную историю» рака желудка, синдром Ли-Фраумени и II группу крови [51]. Образ жизни и экологические факторы риска включают особенности питания, злоупотребление алкоголем [5], курение [51, 138] и действие ионизирующего излучения [51]. Существуют доказательства того, что в возникновении рака желудка играет роль инфекционный фактор [51, 71, 162].

Эпидемиологические исследования регионов с высокой и низкой заболеваемостью раком желудка выявили взаимосвязь между особенностями питания и развитием этой болезни. Превалирование в пище сложных углеводов, таких как картофель, хлеб, мучные продукты (характерных для России) и риса (распространенного в азиатских странах и Японии) сопряжено со сниженным потреблением витамина С, который является важным нейтрализатором нитрозосоединений и свободных радикалов. Чрезмерное потребление маринованных, копченых продуктов, соленой и острой пищи также увеличивает риск возникновения рака желудка [5]. Нитрозосоединения (образуются в желудке человека из пищевых нитритов) являются канцерогенами, что показано на моделях

лабораторных животных. Полифенолы зеленого чая обладают противоопухолевым, противовоспалительным и антиоксидантным действием и способностью ингибировать нитрозирование [51]. Употребление аскорбиновой кислоты, содержащейся в овощах, фруктах и других продуктах растительного происхождения, а также диеты с высоким содержанием цельного зерна злаков, каротиноидов и зеленого чая связаны с уменьшением риска рака желудка [5, 51]. Злоупотребление алкоголем увеличивает риск развития рака желудка, особенно рака кардии у мужчин и рака других локализаций у женщин [5]. В тоже время, некоторые исследователи считают, что данных о существенном влиянии потребления алкоголя на риск рака желудка по-прежнему не достаточно [79]. Изменение пищевого поведения может приводить к существенному снижению заболеваемости раком желудка. Например, у японцев, иммигрировавших в США и изменивших свой образ жизни, и питание, в том числе, отмечено снижение заболеваемости раком желудка, преимущественно во втором поколении [5].

Установлен повышенный (в 3-4 раза) риск развития рака желудка у лиц, которые находились на грудном вскармливании менее года, по сравнению с теми, кого кормили грудным молоком более года. Некоторые исследователи связывают это с ослаблением защитной функции слизистой оболочки желудка ввиду дефицита поступления иммуноглобулина А и более ранним инфицированием *Helicobacter pylori* [5].

Еще одним фактором риска развития рака желудка недавно было признано курение. Перспективные исследования показали значительные дозозависимые отношения между курением и риском возникновения злокачественных новообразований желудка. Относительный риск развития данной патологии зависит от интенсивности и продолжительности курения. Значительное снижение риска отмечено после десяти лет отказа от курения [139].

Ожирение также является одним из основных факторов риска для аденокарциномы кардии желудка [139]. Ожирение может способствовать гастроэзофагальному рефлюксу, который предрасполагает к развитию пищевода Барретта, являющегося предшествующим состоянием для аденокарциномы

пищевода и гастроэзофагального перехода [139]. Шведскими исследователями показано, что в популяции, страдающей ожирением, риск аденокарциномы кардии желудка был в 2,3 раза выше, чем в контрольной группе. Повышенный индекс массы тела связан с более высокими показателями смертности от рака желудка среди мужчин США. В целом, факторы риска, связанные с аденокарциномой пищевода и кардиального отдела желудка, включают ожирение, гастроэзофагальный рефлюкс и наличие пищевода Барретта [101].

При определении причины возникновения рака желудка огромное внимание исследователей уделяется роли *Helicobacter pylori*. Известно, что в 1983 г. В.Д. Маршалл, при изучении биоптатов слизистой оболочки желудка у больных язвенной болезнью, идентифицировал и дал подробную характеристику микроорганизму, классифицированному как *Helicobacter pylori*. Впоследствии этот микроорганизм был признан главным этиологическим фактором хронического неиммунного антрального гастрита, возникли предположения о связи *Helicobacter pylori* с риском развития рака желудка [12].

Связь между развитием рака желудка и хеликобактерной инфекцией была установлена в эпидемиологических и экспериментальных исследованиях на животных [98]. По классификации ВОЗ *Helicobacter pylori* относится к группе явных канцерогенов [12]. Инфекция, вызванная *Helicobacter pylori*, является наиболее важным фактором риска для аденокарциномы желудка, вызывает прогрессивное повреждение слизистой оболочки желудка, что в конечном итоге может привести к атрофическому гастриту и последующей кишечной метаплазии [98]. Страны с высоким уровнем заболеваемости раком желудка, как правило, имеют высокую распространенность инфекции, вызванной *Helicobacter pylori*. В последнее время использование терапии, направленной на эрадикацию этой бактерии, распространилось по всему миру [56, 98], а в 2013 году система медицинского страхования Японии утвердила эрадикационную терапию для больных хроническим гастритом [98]. В литературе приводятся данные о снижении риска возникновения рака желудка после успешной эрадикационной терапии [98, 104]. Ожидалось, что терапия поможет предотвратить развитие рака желудка,

однако случаи данной онкопатологии были обнаружены и после эрадикации [98]. Wong B.C. et al. [86] сообщили, что искоренение *Helicobacter pylori* значительно снизило риск развития рака желудка лишь в подгруппе носителей инфекции без предраковых поражений. Заболеваемость раком желудка в общей популяции была схожа между участниками, получившими лечение по эрадикации *Helicobacter pylori*, и теми, кто получал плацебо в течение 7,5 лет [86]. Вышеизложенное позволяет предположить, что искоренение хеликобактерной инфекции является подходящей стратегией первичной химиопрофилактики. Эрадикация *Helicobacter pylori* может быть эффективной в предотвращении рака желудка среди молодых людей, до развития атрофического гастрита и кишечной метаплазии [98].

Основные механизмы патогенного действия *Helicobacter pylori* включают в себя хроническое воспаление в слизистой оболочке желудка, генетические и эпигенетические изменения генов-супрессоров опухолей, стимуляцию некоторых онкогенных путей. *Helicobacter pylori* может вызвать двухцепочечные разрывы ДНК непосредственно, а также привести к повреждению ДНК косвенно, стимулируя генерацию активных форм кислорода и азота [161]. Гиперметилирование и последующее подавление генов-супрессоров опухолей является важным эпигенетическим механизмом в канцерогенезе рака желудка, связанного с инфекцией *Helicobacter pylori* [165].

Другим инфекционным агентом, играющим роль в развитии рака желудка, является вирус Эпштейна-Барр (*EBV – Epstein-Barr virus*), который относится к семейству герпесвирусов [5]. Этот вирус, как известно, вызывает доброкачественные и злокачественные новообразования лимфоидного и эпителиального происхождения, в том числе, около 10% аденокарцином желудка считаются ассоциированными с *EBV* [157]. Связь между инфицированием *EBV* и раком желудка основывается на выявленной равномерной экспрессии генов вируса во всех опухолевых клетках. Гены *EBV* не определялись в клетках опухолевого микроокружения и нормальной слизистой оболочки желудка [57]. Однако точные механизмы, посредством которых *EBV* способствует развитию рака желудка, еще предстоит установить. В некоторых исследованиях показано, что в *EBV*-несущих

карциномах желудка присутствуют различные хромосомные aberrации по сравнению с *EBV*-негативными карциномами. Клиническими особенностями *EBV*-ассоциированного рака желудка является преобладание пациентов мужского пола и относительно молодой возраст по сравнению с *EBV*-негативным типом [157].

1.3 Этиология и патогенез рака толстого кишечника

Злокачественные новообразования толстого кишечника, в большинстве случаев, являются спорадическими, без выраженной семейной истории. Причинами спорадических мутаций могут служить особенности диеты, образа жизни, нарушения стула, курение, алкоголь, экологический фактор и вирусы. В результате проведения эпидемиологических исследований было установлено, что употребление красного мяса повышает риск развития полипов толстого кишечника и злокачественных опухолей данной локализации. По мнению ученых, это может быть сопряжено с секрецией инсулина, обладающего митогенным свойством. Связь между употреблением различных сортов красного мяса и развитием рака толстого кишечника может быть обусловлена особенностями приготовления мяса в условиях высокой температуры, при которой синтезируются полициклические ароматические углеводороды, гетероциклические амины и нитрозамины. Если в рационе преобладают мясные, жирные, мучные блюда и недостаточно содержание продуктов растительного происхождения, в кишечнике образуются канцерогенные соединения. При запорах время воздействия этих веществ на стенки толстого кишечника значительно увеличивается, что может привести к злокачественной трансформации клеток. Высокое содержание клетчатки в пище, напротив, снижает риск развития рака кишечника, ввиду того, что пищевые волокна сокращают время транзита каловых масс по кишечнику, адсорбируют фекальные канцерогены, снижают рН кишечного содержимого и изменяют метаболизм жирных кислот [164]. Дефицит в рационе фолиевой кислоты может обуславливать нарушение

репарации ДНК в клетках кишечного эпителия и ослабление систем антиоксидантной защиты организма. Опухоли также могут возникать на фоне продолжительных воспалительных заболеваний кишечника [105]. Показан более высокий риск развития рака толстого кишечника среди лиц, употребляющих алкоголь, причем ассоциация наиболее выражена при раке прямой кишки у мужчин. [31].

Примерно у 80-85% пациентов с ненаследственным раком толстого кишечника обнаруживаются соматические мутации гена *APC* (*Adenomatous polyposis coli*). Мутация гена *APC* считается первым шагом в развитии рака данной локализации. Накопление дефектного конечного продукта гена *APC* способствует активации сигнального пути Wnt/ β -катенин и последующей транскрипции протоонкогенов *C-Myc* и циклин *D*. После первоначальных генетических изменений в процесс канцерогенеза вовлекается серия генетических мутаций, ведущих к потере гена-супрессора опухолевого роста белка p53 [119, 129].

Однако 8-15% всех случаев рака толстого кишечника связано с наследственной предрасположенностью. Наследственный неполипозный рак толстого кишечника (синдром Линча) является наиболее распространенной формой и обусловлен мутациями нескольких генов (в частности *MSH2* и *MLH1*), что приводит к нарушению репарации неспаренных нуклеотидов, ошибкам в репликации ДНК и нестабильности генома [129]. При этом синдроме заболевание начинает развиваться в молодом возрасте (до 50 лет) и прогрессирует в инвазивный рак менее, чем через три года [119]. Семейный аденоматозный полипоз является вторым наиболее распространенным наследственным раком толстого кишечника, в патогенезе которого лежит мутация в гене *APC*. Клиническая картина характеризуется развитием множественных полипов в толстом кишечнике, малигнизация которых приводит к раку в молодом возрасте [43].

1.4 Молекулярно-генетические основы канцерогенеза

1.4.1 Роль белков-регуляторов клеточного цикла в механизме развития опухолей

Злокачественные опухоли характеризуются разнообразием и гетерогенностью, несмотря на то, что в основе трансформации клеток лежит относительно малое число критических событий, одновременное проявление которых в генетическом аппарате клетки требуется для малигнизации. Появление любых новообразований обусловлено нарушением баланса между пролиферацией и запрограммированной гибелью клеток. Мутации, лежащие в основе патогенеза рака, непосредственно или через различные сигнальные пути приводят к выключению антионкогенного белка p53, а также белка-регулятора клеточного цикла p21 [5].

В норме назначение регуляторных механизмов клеточного цикла состоит в обеспечении безошибочного распределения наследственного материала в процессе деления клеток. В основе регуляции размножения клеток лежит смена состояний активной пролиферации и пролиферативного покоя. Прохождение клетки по всем периодам клеточного цикла строго контролируется специальными регуляторными молекулами. Одними из эндогенных участников регуляторной системы клеточного цикла являются циклинзависимые киназы (Cdk – Cyclin-dependent kinases). Каждая Cdk представляет собой каталитическую субъединицу холоферментного комплекса, для активности которой требуется присутствие активаторной субъединицы – циклина [11]. Регуляция активности Cdk осуществляется за счет направленного изменения концентрации определенных циклинов в определенные фазы клеточного цикла. Кроме того, активность Cdk регулируется изменениями фосфорилирования их аминокислотных остатков. В активной форме комплексы циклин-Cdk фосфорилируют регуляторные белки, контролирующие прохождение соответствующей фазы клеточного цикла [11].

Действие многих протоонкогенов и генов-супрессоров направлено на регуляцию активности тех или иных комплексов циклин-Cdk [11]. Продукты многих протоонкогенов являются компонентами сигнальных путей, ответственных за

активацию комплексов циклин D-Cdk4(6) и циклин E-Cdk2, что происходит в ответ на действие ростовых факторов и/или адгезию клеток к белкам внеклеточного матрикса [8]. Но этот процесс контролируется еще и многими супрессорными белками. Некоторые из них являются ингибиторными субъединицами Cdk (CKIs – Cdk Inhibitors), опосредующими остановку клеточного цикла в ответ на различные внеклеточные и внутриклеточные сигналы. Известно два семейства CKIs: Ink4 (p15, p16 и p18) и Cip/Kip [11, 124].

В клетках млекопитающих G1-период клеточного цикла является самым важным этапом для регуляции прогрессии клеточного цикла. Циклины D и E являются важными компонентами в процессе прохождения клеткой G1-периода [132]. Семейство ингибиторов циклинзависимых киназ Cip/Kip состоит из трех членов: p21, p27 и p57 [124]. Эти белки связывают и ингибируют уже полностью сформированные комплексы циклин E-Cdk2 (в результате клетка останавливается в фазе пролиферативного покоя G0 и не входит в G1 и синтетическую фазу) и циклин A-Cdk2 [11]. Кроме того, белок p21 – продукт гена *CDKN1A* (*Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*), способен блокировать и комплекс циклин B-Cdk1, ответственный за продвижение по постсинтетической G2-фазе и вход в митоз. Таким образом, p21 блокирует прогрессирование клеточного цикла и рост клеток, являясь супрессорным белком (Рисунок 1).

Негативным регулятором клеточного цикла является белок p53, который выступает в роли транскрипционного фактора для ряда генов. Ген *CDKN1A* является одной из основных мишеней трансактивационного действия белка p53, который может координировать процесс репарации либо индуцировать апоптоз клеток [15, 24].

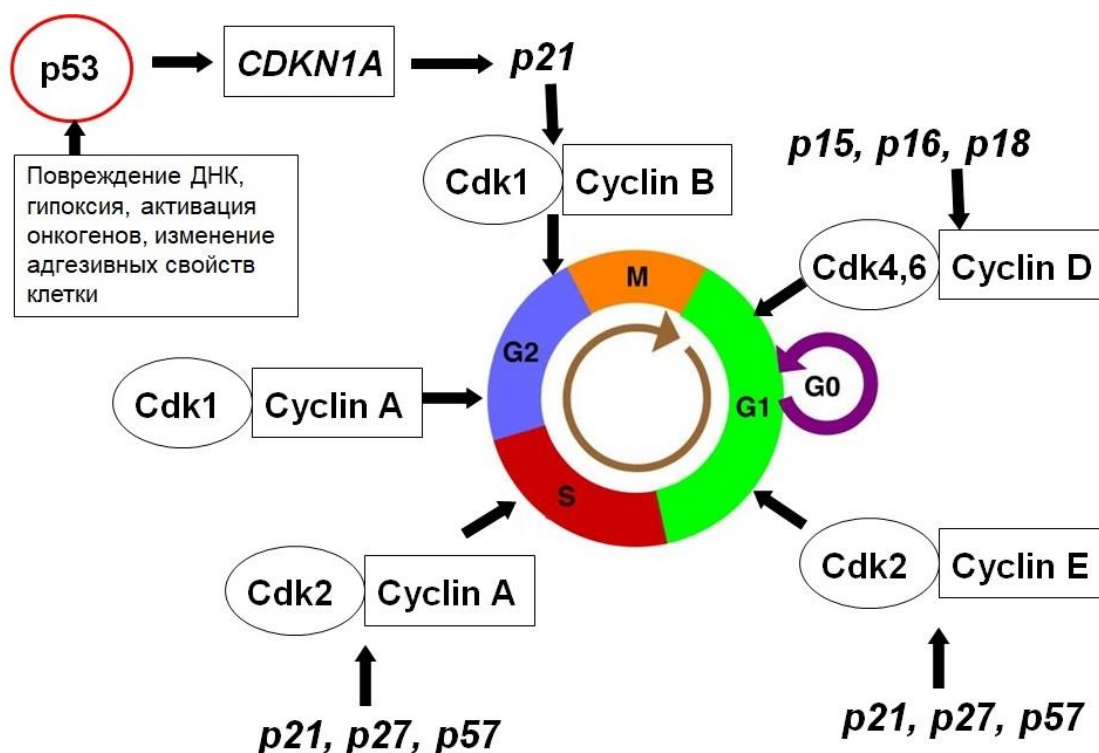


Рисунок 1. Регуляция клеточного цикла [11].

В настоящее время широко обсуждается роль других регуляторных молекул, которые участвуют в механизмах контроля продвижения клеточного цикла. По данным литературы, галектин-1-опосредованное накопление ингибиторов клеточного цикла p21 и p27 вызывает остановку пролиферации клеток. Причем, галектины экспрессируются многими клетками, в том числе элементами опухолевого микроокружения, которые таким образом взаимодействуют с опухолевыми клетками [80].

Известно, что в подавляющем числе новообразований наблюдается ингибирование регуляторных механизмов клеточного цикла. Нарушение регуляции клеточного цикла может индуцировать опухолевую трансформацию посредством неконтролируемой пролиферации клеток и неспособности восстанавливать повреждения ДНК [45].

Как упоминалось ранее, ключевым фактором, контролирующим работу клеточного цикла, является белок p53. Способность гена *TP53* (*Tumor protein p53*) останавливать пролиферацию клеток известна давно, и именно поэтому он причислен к генам-супрессорам злокачественного роста. При различных

внутриклеточных повреждениях и воздействии внешних ДНК-повреждающих агентов происходят модификация и активация белка p53. Последний приобретает способность связываться с ДНК и регулировать транскрипцию генов, которые содержат в промоторной области соответствующую нуклеотидную последовательность (p53-response element). Следствием этого взаимодействия в аномальных клетках является либо остановка клеточного цикла, либо индукция апоптоза. Белок p53 вовлечен в большинство клеточных процессов, направленных на поддержание стабильности генетической информации. В митохондриях он напрямую участвует в механизмах апоптоза, взаимодействуя с белками Bax/Bcl-2 и Bak, что приводит к выбросу цитохрома C [5]. Также p53 способен подавлять транскрипцию многих протоонкогенов (BCL2, JUN и FOS). Связываясь с белками, вовлеченными в репликацию или репарацию ДНК, белок p53 модулирует эти процессы: подавляет деление клеток и стимулирует восстановление целостности ДНК (Рисунок 2) [5].



Рисунок 2. Функции белка p53 [5].

Инактивация белка p53 является самым распространенным молекулярным изменением в новообразованиях человека [5]. Мутации гена *TP53* наиболее часто обнаруживаются в клетках опухолей человека, при этом подавляющее их

большинство представляет собой миссенс-мутации, приводящие к изменениям в аминокислотной последовательности белка [5]. Мутантный белок p53 не обладает функциональной активностью белка дикого типа и может инактивировать продукт, синтезируемый с неповрежденного аллеля путем образования тетрамерных комплексов. Клетки, в которых синтезируется измененный белок p53, характеризуются генетической нестабильностью, пониженной чувствительностью к сигналам, супрессирующим пролиферацию, активацией неоангиогенеза, приобретают устойчивость к неблагоприятным условиям [5]. Распространенным методом в онкологической практике является определение ядерной экспрессии белка p53 в клетках новообразования [159]. Высокая ядерная экспрессия белка p53 при онкопатологии обусловлена накоплением его мутантной формы, не обладающей антионкогенными свойствами. По данным литературы уровень экспрессии белка p53 может быть использован для оценки злокачественности опухолевого процесса [159]. Гиперэкспрессия мутантного белка p53 ассоциирована с поздними стадиями болезни, метастазированием опухоли и плохим прогнозом заболевания [5, 75].

Наряду с вышеизложенным, в литературе представлены данные о потере экспрессии белка p21 в недифференцированных формах рака, в то время как для умеренно-дифференцированных опухолей продемонстрированы более высокие уровни экспрессии белка p21. Также, выявлена корреляция между экспрессией белка p21 и глубиной инвазии опухолевых клеток, метастазированием опухоли в регионарные лимфатические узлы и клинической стадией болезни при раке пищевода [73]. Роль белка p21 в регуляции апоптоза до сих пор остается спорной, однако есть исследования, указывающие на то, что данный белок обладает проапоптотическими функциями. Снижение экспрессии белка-регулятора клеточного цикла p21 может быть вовлечено в канцерогенез, особенно в случаях изменения экспрессии белка p53 [33, 150]. Высокая экспрессия мутантной формы белка p53 и снижение экспрессии белка p21 в опухолевых клетках ассоциированы с плохим клиническим течением заболевания [75, 150]. Напротив, высокая

экспрессия белка p21 в опухолевой ткани подавляет рост культивируемых клеток рака толстого кишечника, мозга и легкого [75].

Таким образом, основным механизмом, предотвращающим неконтролируемую пролиферацию клеток, является p53/p21-зависимый путь. Функционирование белка p53 и регулятора клеточного цикла p21 обеспечивает генетическую стабильность, однородность соматических клеток, а нарушения в работе антионкогенов могут способствовать их злокачественному перерождению [144].

1.4.2 Связь полиморфизма генов белков p53 и p21 с развитием опухолевых заболеваний

Частой причиной существования нескольких различающихся по структурно-функциональной организации форм гена являются точечные мутации – замены единичных нуклеотидов или так называемый полиморфизм единичных нуклеотидов (SNP – single-nucleotide polymorphism). Эти генетические различия определяют индивидуальные особенности развития защитно-приспособительных реакций макроорганизма и его наследственную предрасположенность или резистентность к заболеваниям [10, 21].

Большинство выявляемых SNP-замен затрагивают область промотора, или располагаются в некодирующих областях (интронах), что в свою очередь не отражается на аминокислотной последовательности транслируемого белка. Однако такие модификации могут влиять на скорость синтеза и стабильность мРНК и, тем самым, приводить к изменению количества и уровня биологической активности транслируемого белка. Это явление получило название «функционального аллельного полиморфизма гена» [21]. Влияние полиморфизма на транскрипцию гена реализуется путем изменения структуры сайтов связывания для факторов транскрипции внутри промотора или изменения участков присоединения транскрипционных факторов в ядре, обуславливающего изменение структуры

промоторов [10, 19]. Однако встречаются полиморфизмы в экзонах, изменяющие аминокислотную последовательность белка p53, что может влиять на экспрессию генов-мишеней белка p53 [109].

Полиморфизм и мутации гена *TP53*, снижающие его функциональную активность, наблюдаются более чем в 50 % всех новообразований. Известно, что изменения структуры белка p53 могут приводить к усилению пролиферации и клеточного роста, а также неполной репарации повреждений ДНК, что, в конечном итоге, приводит к развитию злокачественных новообразований [109]. Среди известных полиморфизмов гена *TP53* функциональное значение имеют экзонный *G215C*-полиморфизм (rs1042522), приводящий к замене аргинина (Arg) на пролин (Pro) в положении 72 структуры белка p53, и два интронных: *dup16in3* – дупликация 16 пар нуклеотидов в 3 интроне и замена *G>A* в 61 паре нуклеотидов в 6 интроне. Полиморфизмы в интронных последовательностях приводят к снижению эффективности экспрессии гена и, как следствие, к снижению апоптотического индекса и эффективности репарации ДНК [58].

Экзонный полиморфизм *TP53 (G215C)* приводит к появлению в популяции двух форм белка, имеющих различия в аминокислотной последовательности. Обе формы пептида обладают способностью связывать ДНК, но характеризуются разным потенциалом для связывания с компонентами транскрипционного механизма, отличаются способностью активировать транскрипцию, индуцировать апоптоз и подавлять злокачественную трансформацию клеток. Белок p53, содержащий Arg, индуцирует апоптоз значительно лучше благодаря усиленному митохондриальному переносу этой изоформы [109]. Связь между полиморфизмом *TP53 (G215C)* и формированием опухоли показана при различных злокачественных новообразованиях. В литературе встречается достаточно много работ, посвященных поиску ассоциации данного полиморфизма с различными онкологическими заболеваниями и изучению влияния полиморфизма на эффективность проводимой терапии. С-аллель *G215C*-полиморфизма ассоциирован с риском развития рака яичника и со сниженной выживаемостью пациентов [58]. Вариантный генотип связывают также с повышенным риском

возникновения рака молочной железы [72]. Показана ассоциация гетерозиготного генотипа с ранней прогрессией рака легкого у индийского населения [91].

Белок p53 является главным регулятором апоптоза в клетке, выступая как транскрипционный фактор для ряда генов. Полиморфизмы *TP53*, которые снижают способность белкового продукта гена связываться с ДНК, могут приводить к нарушению индукции апоптоза.

Белок p21 синтезируется с гена *CDKN1A*, транскрипция которого регулируется белком p53, который, в свою очередь, связывается с промоторным регионом этого гена и индуцирует его экспрессию. Таким образом, полиморфизмы в области промотора *CDKN1A* могут привести к нарушению взаимодействия с транскрипционным фактором. [36]. Известно о наличии полиморфизма *A1026G* в 5'-промоторе гена *CDKN1A* (rs2395655), который может приводить к снижению скорости и частоты актов инициации синтеза РНК на данном участке, и, как следствие, к снижению экспрессии гена [124]. Снижение уровня белка p21 в клетке может приводить к нарушению регуляции клеточного цикла, повышению пролиферации клеток и, как следствие, их злокачественному перерождению. В литературе приводятся данные о связи полиморфизма *CDKN1A* (*A1026G*) с риском развития злокачественных новообразований, причем *G*-аллель играет предрасполагающую роль [35].

1.4.3 Роль факторов роста и их рецепторов в механизме развития опухолей

Известно, что многочисленные ростовые факторы регулируют клеточную пролиферацию и дифференцировку, а также непосредственно участвуют в неопластической трансформации клеток. Сигнальные пути эпидермального фактора роста (EGF – Epidermal growth factor) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF – Vascular endothelial growth factor) играют ключевую роль в развитии и прогрессировании эпителиальных опухолей человека [93] (Рисунок 3).

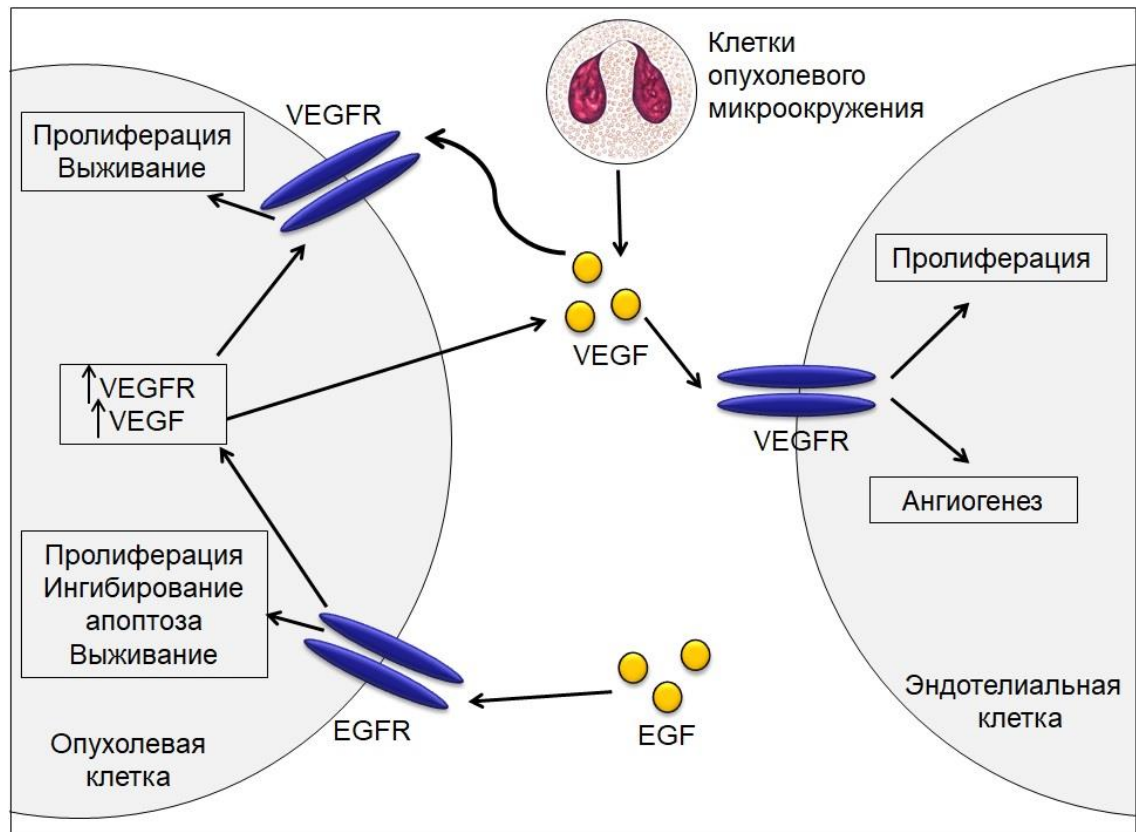


Рисунок 3. Эффекты ростовых факторов [93].

Взаимодействие EGF с рецептором EGFR (Epidermal growth factor receptor) приводит к усилению синтеза ДНК и наработке целого ряда онкогенных белков [55]. EGFR экспрессируется на мембране макрофагов, гладкомышечных и эндотелиальных клеток сосудов, эпителиальных клеток, кардиомиоцитов. Вместе с тем, вышеперечисленные клетки способны синтезировать и секретировать лиганды для EGFR [93]. Последний принадлежит к семейству рецепторов ErbB (Receptor tyrosine kinases). Это семейство состоит из четырех родственных рецепторов: самого EGFR (ErbB1/EGFR/HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4). Рецептор EGFR может быть активирован при помощи нескольких механизмов. В физиологических условиях его взаимодействие с EGF приводит к образованию гомо- или гетеродимерных комплексов с другими членами семейства рецепторов ErbB, что обеспечивает усиление проводимого сигнала [103]. В опухолевых клетках этот рецептор может быть активирован дополнительными механизмами. Например, сверхэкспрессия EGFR в опухоли может привести к

лиганд-независимой димеризации этого рецептора и проведению сигнала внутрь клетки [103].

Следует отметить, что высокая экспрессия EGFR выявляется в большинстве эпителиальных опухолей человека. Высокий уровень экспрессии EGF и EGFR регистрируется в ткани злокачественных опухолей молочной железы, яичников, желудка и других локализаций [48, 74]. Гиперэкспрессия EGFR опухолевыми клетками является показателем плохого прогноза, часто ассоциируется с метастазированием опухоли и поздними стадиями заболевания [74, 90, 93]. По данным литературы, экспрессия EGFR является независимым прогностическим показателем возникновения рецидива и низкой выживаемости у больных раком толстого кишечника, перенесших хирургическое лечение [117].

Известно, что рост опухоли зависит от образования новых кровеносных сосудов. Ангиогенез играет основополагающую роль в неопластических процессах, он необходим для выживания, прогрессирования и метастатического распространения опухоли [93]. Формирование новых кровеносных сосудов имеет большое значение для обеспечения достаточного количества кислорода и питательных веществ растущей опухоли. Активный рост сосудов в опухолях коррелирует с неблагоприятным исходом [46, 93]. В многочисленных исследованиях показано, что плотность микрососудов значительно выше в ткани многих аденокарцином, чем в доброкачественных новообразованиях соответствующей локализации. Увеличение микрососудистого русла коррелирует с поздними стадиями заболевания и наличием метастазов [142].

Ключевую роль в развитии ангиогенеза играет фактор роста эндотелия сосудов, действующий через рецептор VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor) [5, 78]. VEGF является самым мощным ангиогенным фактором и специфическим митогеном для эндотелиальных клеток, усиливающим их пролиферацию [93]. Фактор роста эндотелия сосудов высоко специфичен для эндотелиальных клеток *in vivo* и *in vitro* [142]. Взаимодействие VEGF со своим рецептором повышает также проницаемость сосудов, что способствует проникновению опухолевых клеток в сосудистое русло [76, 93]. В исследованиях, проведенных на мышах, установлено,

что более медленный рост опухолей и более низкий уровень метастазирования свойственен мутантной линии мышей с недостатком лиганд-связывающего домена VEGFR [135]. Опухолевые клетки вызывают гипоксические состояния в результате увеличенного потребления кислорода, что также способствует активации ангиогенеза [41]. Неопластические сосуды отличаются от нормальных сосудов, характеризуются высокой проницаемостью и отсутствием организации сосудистой сети, что приводит к неравномерному поступлению кислорода в ткани и возникновению локальных очагов гипоксии [46].

В статьях зарубежных авторов приводятся данные о том, что VEGFR экспрессируется не только на мембране эндотелиоцитов, но эпителиальных клеток при раке простаты, раке поджелудочной железы, раке щитовидной железы и раке матки [142, 108], что указывает на потенциальную двойную роль ангиогенных факторов, в том числе связанную с регуляцией пролиферации опухолевых клеток. Таким образом, экспрессия рецепторов VEGFR не является специфичной для эндотелиальных клеток, а VEGF может выступать в качестве промотора деления опухолевой клетки. Выдвигаются предположения, что VEGF, образующийся в опухолевых клетках, действует как фактор паракринной и аутокринной регуляции, активирующий рост эндотелия сосудов и опухолевых клеток через VEGFR [142]. Кроме этого, в условиях гипоксии, создаваемой опухолевыми клетками, VEGF может вырабатываться клетками опухолевого микроокружения (эозинофилами, макрофагами, фибробластами, эндотелиальными клетками и др.) [135].

Таким образом, состав опухолевого микроокружения может вносить значительный вклад в регуляцию пролиферативной активности клеток опухоли и ангиогенез.

1.5 Современные представления об опухолеассоциированной тканевой эозинофилии

Несмотря на разнообразную этиологию онкологических заболеваний, в клеточном инфильтрате многих опухолей эпителиального происхождения обнаруживают эозинофильные гранулоциты. Примером таких опухолей служат новообразования желудочно-кишечного тракта, шейки матки, молочной железы, мочевого пузыря, поджелудочной железы и полости рта. Несмотря на распространенность тканевой эозинофилии при онкопатологии, причины и последствия накопления эозинофилов в опухоли однозначно не определены [148].

По мнению ряда исследователей, опухолеассоциированная тканевая эозинофилия определяется как эозинофильная инфильтрация опухоли, не связанная с некрозом опухоли или ее изъязвлением. Еще в 1981 году D. Lowe et al. представили концепцию опухолеассоциированной тканевой эозинофилии, которая характеризуется наличием эозинофилов в качестве компонента околоопухолевого и внутриопухолевого воспалительного инфильтрата [47]. Исследователи провели оценку клеточной инфильтрации опухолевых тканей в 460 образцах рака шейки матки. Они отметили, что в некоторых областях опухоль потеряла сцепление со своими отдельными клетками, окруженными эозинофилами [47].

Исследование эозинофилов в связи с онкологическими заболеваниями является одним из новых и перспективных направлений. В настоящее время эозинофилы считаются полифункциональными лейкоцитами, которые участвуют в гомеостазе тканей, модуляции врожденного и приобретенного иммунитета. Эти клетки могут вовлекаться в более сложные процессы, чем предполагали ранее. Об этом свидетельствуют данные литературы об особенностях ответа эозинофилов на различные раздражители, а также о сложных взаимодействиях с другими клетками иммунной системы и патогенами [70, 97, 125].

Уникальной особенностью эозинофилов является то, что они реализуют свои функции преимущественно в тканях [167]. Под влиянием хематтрактантов

эозинофилы эмигрируют в ткани организма, главным образом, в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Эозинофилы желудочно-кишечного тракта являются преобладающей популяцией тканевых лейкоцитов и являются неотъемлемой частью иммунной системы слизистой оболочки ЖКТ. В физиологических условиях небольшое количество эозинофилов обнаруживаются на протяжении всего ЖКТ за исключением пищевода [167]. Также эозинофилы заселяются в легкие, тимус, кожу, молочные железы, матку [10, 163].

Тканевая эозинофилия регистрируется при злокачественных опухолях различной локализации [34, 54, 64, 96, 141, 155]. Несмотря на то, что большинство ученых в своих работах акцентирует внимание на важности CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов и Th1-цитокинов в противоопухолевом иммунитете, тканевая эозинофилия, ассоциированная с опухолью, представляет большой научный и практический интерес.

Известно, что индукция иммунного ответа по Th1-зависимому пути связана с повышенным контролем иммунной системы над опухолью и лучшим прогнозом заболевания, в то время как избыточная цитокинсекреторная активность Th2-лимфоцитов может усиливать рост опухоли [158]. Однако для тканевой эозинофилии, основными индукторами которой являются Th2-цитокины, показаны неоднозначные результаты.

Возможное прогностическое значение опухолиассоциированной тканевой эозинофилии у онкологических больных привлекает внимание многих исследователей [34, 64, 141, 155]. До настоящего времени нет единого мнения о роли эозинофильной инфильтрации тканей и возможности использования этого показателя в качестве положительного или отрицательного признака болезни [95].

Некоторые авторы связывают наличие тканевой эозинофилии с благоприятным прогнозом, лучшей дифференцировкой опухоли, отсутствием сосудистой инвазии [64, 112, 155] и увеличением пятилетней выживаемости пациентов [116]. Данные изменения авторы объясняют прямым действием эозинофильных цитотоксических белков на клетки опухоли. Так, J. Moezzi et al. пришли к выводу, что у пациентов с новообразованиями ободочной кишки тканевая эозинофилия наиболее выражена

при аденоме, в свою очередь, уменьшение количества эозинофилов в опухоли было сопряжено с ее прогрессированием через последовательность «аденома → рак» [141]. S. Kiziltas et al. установили снижение выраженности тканевой эозинофилии при увеличении злокачественного потенциала опухоли толстого кишечника [54]. Показано также, что тканевая эозинофилия связана с благоприятным исходом опухолей головы и шеи, при этом количество эозинофилов оказалось наиболее значимым параметром среди различных гистологических факторов, влияющих на клинический исход заболевания [34]. R.G. Dorta et al. обнаружили, что выраженная тканевая эозинофилия ассоциировалась с 5-летней безрецидивной выживаемостью в 72% случаев, в то время как отсутствие эозинофилов или умеренная тканевая эозинофилия были связаны с 5-летней выживаемостью только у 32% и 44% больных соответственно [155]. Другими авторами показано, что плоскоклеточный рак полости рта, ассоциированный с выраженной эозинофильной инфильтрацией и метастатическим поражением лимфатических узлов, имеет менее агрессивное течение [65].

Наряду с вышеизложенным, в литературе представлены сведения о связи тканевой эозинофилии с неблагоприятным прогнозом, инвазией и ангиогенезом опухоли [34, 151]. Исследователями было установлено, что эозинофильная инфильтрация имела более выраженный характер при раке полости рта, чем при ее дисплазии. Предположительно эозинофильные лейкоциты играют роль в инвазивном процессе [34]. Подобные выводы сделали S.J. Alrawi et al. [152], которые обнаружили более высокое содержание эозинофилов в составе инвазивной плоскоклеточной карциномы по сравнению с неинвазивными опухолями головы и шеи. Авторы показали также, что у пациентов с высокими показателями опухолиассоциированной тканевой эозинофилии регистрировалась статистически более низкая выживаемость. K. Iwasaki et al. обнаружили значительную связь между низкой степенью дифференцировки опухоли при раке желудка и выраженной эозинофильной инфильтрацией, предполагая, что некоторые гистологические типы рака могут сопровождаться миграцией эозинофилов в очаг

новообразования [96]. Однако пациенты с тканевой эозинофилией имели хорошие показатели выживаемости.

Другими исследователями была предпринята попытка установить, насколько ассоциированная с опухолью тканевая эозинофилия является показательной для прогнозирования появления метастазов в лимфатических узлах при плоскоклеточном раке полости рта [69]. В результате статистического анализа было показано присутствие большого количества эозинофилов в ткани опухоли при наличии метастазов этой локализации. В данном исследовании все регионарные рецидивы произошли у пациентов, имеющих интенсивную эозинофильную инфильтрацию опухоли. Полученные данные свидетельствуют о том, что опухолеассоциированная тканевая эозинофилия может быть использована в качестве дополнительного прогностического гистологического маркера на скрытые метастазы в лимфатические узлы при плоскоклеточном раке полости рта [69]. Наряду с этим, L. Simson et al. в исследованиях акцентировали свое внимание на способности эозинофилов участвовать в противоопухолевом иммунном надзоре макроорганизма [121]. Авторы оценивали заболеваемость мышей фибросаркомой, индуцированной метилхолантреном. Для эксперимента были выбраны несколько линий генетически модифицированных мышей: IL-5-трансгенные мыши (с высоким количеством эозинофилов в крови); CCL11-дефицитные мыши (с отсутствием ключевого фактора рекрутирования эозинофилов в ткани), а также мыши с дефицитом эозинофилов (IL5/CCL11/- и Δ dblGATA). В результате исследования было установлено существенное снижение туморогенности и опухолевой прогрессии у IL-5-трансгенных мышей. По мнению ученых, защитное действие IL-5 было связано с выраженной эозинофилией опухоли и окружающих ее тканей. Высокая вероятность возникновения опухоли регистрировалась у CCL11-дефицитных мышей, что объясняется снижением миграции эозинофилов в очаг новообразования. Эта корреляция подтверждалась на линиях мышей с дефицитом эозинофилов (IL5/CCL11/- и Δ dblGATA), у которых показатель заболеваемости был значительно выше. Кроме того было обнаружено, что эозинофильные гранулоциты способны непосредственно уничтожать клетки

метилхолантрен-индуцированной саркомы *in vitro* [121]. Противоположные результаты были получены в эксперименте на мышах при исследовании индуцированного плоскоклеточного рака полости рта. В группе мышей с дефицитом эозинофилов наблюдали, напротив, высокий уровень заболеваемости и более выраженную цитологическую атипию по сравнению с аналогичными показателями в группе мышей дикого типа. В связи с этим авторы сделали вывод о том, что эозинофилы опосредуют неблагоприятный исход заболевания, а их элиминация защищает мышей от возникновения и прогрессии опухоли данной локализации [60].

В литературе рассматривается также вопрос о связи IgE-опосредованной аллергии, сопровождающейся эозинофилией, и заболеваемостью злокачественными новообразованиями [115]. Показана зависимость между наличием аллергии и тенденцией к снижению риска развития злокачественных опухолей легких, поджелудочной железы, толстого кишечника, простаты, молочной железы и др. По-видимому, люди с IgE-опосредованной аллергией в анамнезе могут обладать эффективным иммунным контролем над опухолевыми клетками [95].

1.5.1 Механизмы тканевой эозинофилии и ее роль в патогенезе опухолевого процесса

Одним из основных направлений исследования роли эозинофильных гранулоцитов в норме и при патологии является изучение процесса рекрутирования этих клеток в ткани [106, 127].

Миграцию эозинофилов в ткани организма регулируют хемотаксические цитокины, главным среди которых является эотаксин-1 (CCL11). Известны и другие белки, оказывающие сходные эффекты, такие как CCL24 и CCL26, однако их действие менее выражено. CCL11 считается эозинофил-селективным

хематтрактантом [127]. В свою очередь, эозинофилы экспрессируют на своей мембране рецепторы к эотаксинам - CCR (C-C Chemokine Receptor type) 1 и CCR3 [106]. Клетками продуцентами эотаксина-1 являются Т-лимфоциты, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, моноциты, фибробласты и сами эозинофилы. В тканях CCL11/эотаксин индуцирует дегрануляцию эозинофилов и продукцию активных форм кислорода, выступая в роли провоспалительного агента [127]. В желудочно-кишечном тракте (основном месте локализации тканевых эозинофилов) в норме регистрируется более выраженная экспрессия CCL11, чем в других тканях организма [68]. Для определения биологической роли CCL11 *in vivo* использовались различные подходы. В исследованиях на мышах, дефицитных по гену *CCL11*, было продемонстрировано, что отсутствие эотаксина-1 приводит к селективному снижению числа тканевых эозинофилов в тимусе и желудочно-кишечном тракте [127].

Сигналы, регулирующие экспрессию эотаксина-1, различаются в разных типах клеток. В макрофагальных клеточных линиях *in vitro* мощными индукторами синтеза эотаксина-1 являются провоспалительные цитокины. Для тучных клеток важнейшим индуктором выступает фактор стволовых клеток. IL-3 селективно индуцирует экспрессию эотаксина-1 эозинофильными гранулоцитами. Также эозинофилы способны секретировать эотаксин-1 в ответ на действие фактора некроза опухолей (TNF – tumor necrosis factor) α и C5a-компонента комплемента. Очевидно, существует сложная сеть сигналов, направленная на регуляцию продукции эотаксина-1 эозинофилами. Предполагается, что экспрессия эотаксина-1 может быть маркером активации эозинофилов при патологии и играет роль в ауторегуляции процесса миграции этих клеток в ткани [127].

Все основные эффекты CCL11 реализует при связывании со специфическим рецептором CCR3 [127, 148]. Хемокиновые рецепторы принадлежат к семейству трансмембранных рецепторов, сопряженных с G-белками. Основным хемокиновым рецептором эозинофилов выступает CCR3. Основная функция этого рецептора заключается в активации хемотаксиса эозинофилов в ткани, а также их дегрануляции в очаге воспаления [106]. Роль CCR3 продемонстрирована в

экспериментальных исследованиях на CCR3-дефицитных мышах, у которых угнетено рекрутирование эозинофильных гранулоцитов в ткань легкого при сенсibilизации овальбумином [147].

Необходимо учитывать, что продукция цитокинов и экспрессия рецепторных структур генетически детерминированы. Известно, что функциональная активность белковых молекул определяется полиморфными вариантами соответствующих генов. В литературе описаны ассоциации аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов с характером экспрессии соответствующих белков и предрасположенностью к определенным заболеваниям [82, 99, 114, 166]. Наличие полиморфных сайтов характерно для промоторных регионов генов цитокинов и их рецепторов, что проявляется в изменении количества синтезируемого белкового продукта, но не в его структуре. Изменение структуры промотора влияет на транскрипцию гена посредством изменения структуры сайтов связывания для факторов транскрипции [99, 114, 166].

Ген *CCL11* расположен на хромосоме 17q12 [49]. Полиморфизмы гена *эотаксина-1* анализируются в ассоциации с различными заболеваниями, связанными с увеличением числа эозинофилов в периферической крови или тканях [99, 149]. Показано, что точечная замена аденина на гуанин в положении 384 промотора гена *CCL11* ассоциирована с развитием бронхиальной астмы в различных популяциях и высокой концентрацией CCL11 [37, 149]. Предполагается, что полиморфизм *A384G* расположен в области промотора гена *CCL11*, принадлежащей к сайту связывания для фактора, являющегося негативным регулятором экспрессии эотаксина-1. Присутствие *G*-аллеля возможно уменьшает сродство к этому ДНК-связывающему фактору и повышает экспрессию CCL11 [37].

В гене *CCR3* идентифицированы несколько полиморфных сайтов в различных положениях. Наиболее распространенным полиморфизмом является *T51C* (rs4987053), расположенный в промоторной области гена *CCR3* [100]. Установлена связь *C*-аллеля полиморфизма *T51C* с развитием бронхиальной астмы [82, 166].

Другим цитокином, оказывающим действие практически на все этапы жизнедеятельности эозинофилов, является интерлейкин-5. IL-5 выступает специфичным и важным медиатором для эозинофилов, который играет центральную роль в пролиферации, дифференцировке, миграции и выживании эозинофилов. Этот цитокин избирательно стимулирует образование эозинофилов из клеток-предшественниц костного мозга, является ключевым медиатором, обеспечивающим финальные стадии созревания эозинофильных гранулоцитов и их последующий выход в кровеносное русло [97]. Стимуляция эозинофилов IL-5 *in vitro* приводит к увеличению выживаемости культивируемых клеток. Также показано, что IL-5 способствует дегрануляции эозинофилов с высвобождением цитотоксических белков. Многие заболевания (бронхиальная астма, атопический дерматит, описторхоз, аскаридоз и др.), характеризующиеся эозинофилией, ассоциированы с повышенным уровнем IL-5 в крови [29, 122]. Этот цитокин продуцируется активированными Th2-лимфоцитами, и в меньшей степени тучными клетками, NK-клетками и эозинофилами [148].

Роль IL-5 в биологии эозинофильных гранулоцитов продемонстрирована на линиях лабораторных животных. У IL5-трансгенных мышей, характеризующихся гиперпродукцией IL-5, наблюдалась выраженная эозинофилия крови [40]. У IL5-дефицитных животных было показано значительное снижение уровня эозинофилов в крови и тканях при введении аллергена [126].

На уровень экспрессии IL5 влияет функциональный полиморфизм *C703T*, расположенный в промоторной области гена *IL5*. Носительство *C*-аллеля данного полиморфизма ассоциировано с выраженной эозинофилией крови у пациентов с атопическим дерматитом [87], бронхиальной астмой [114] и туберкулезом легких [17]. Однако, некоторые исследователи указывают на предрасполагающую роль аллеля *T* и генотипа *TT* в развитии атопического дерматита [2].

Известно, что IL-5 воздействует на клетки-мишени, связываясь со специфическим рецептором IL-5R. Последний представляет собой гетеродимерный рецепторный комплекс, состоящий из уникальной α -субъединицы (IL-5Ra) и β -цепи, общей с рецепторами для IL-3 и GM-CSF. Так, α -субъединица

представляет собой внеклеточный домен и необходима для лиганд-специфического связывания с IL-5. β -цепь предназначена для внутриклеточного проведения сигнала. Среди разнообразных рецепторных структур, представленных на мембране эозинофилов, рецептор IL-5R занимает особое место. Изменение уровня экспрессии IL-5R на поверхности эозинофилов может лежать в основе удлинения жизненного цикла этих клеток [125, 143].

Одной из причин гиперэкспрессии рецепторных структур является повышенная активность промотора соответствующего гена. Обнаружено несколько единичных нуклеотидных замен в промоторном регионе гена *IL5RA*, которые оказывают влияние на уровень экспрессии рецептора [17, 83, 100, 107]. Наиболее известным из них является полиморфизм *G80A* (rs2290608), который ассоциирован с гиперэкспрессией рецептора IL-5R на эозинофилах. Описана связь *A*-аллеля данного полиморфного варианта гена с развитием эозинофилии при бронхиальной астме, атопическом дерматите и туберкулезе легких [17, 100, 107]. Однако в некоторых исследованиях приводятся данные об отсутствии ассоциации полиморфного сайта *G80A* гена *IL5RA* с развитием патологии и эозинофилии [83].

Эозинофильные гранулоциты, эмигрировавшие в ткани, осуществляют свои эффекты за счет многих веществ, содержащихся в секреторных гранулах этих клеток. В литературе описана цитотоксическая активность некоторых протеинов гранул эозинофилов в отношении опухолевых клеток *in vitro* [89].

В своих исследованиях F. Legrand et al. обнаружили, что совместное культивирование эозинофилов с клеточной линией рака толстого кишечника Colo-205 приводило к высвобождению из гранулоцитов эозинофильного катионного белка, нейротоксина, TNF α и гранзима А [89]. Эозинофилы, являясь короткоживущими клетками, погибали вследствие активации и дегрануляции, тогда как классические CD8⁺ цитотоксические лимфоциты проявляли способность регенерировать после реакций цитотоксичности. По мнению авторов, противоопухолевый эффект эозинофилов зависел от CD11a/CD18-опосредованных контактов с клеткой-мишенью. Показано, что LFA-1 (CD11a/CD18) необходим для первоначальной адгезии эозинофилов к Colo-205 и последующей их активации.

Это подтверждалось добавлением в культуру клеток ингибирующих анти-CD11a- и анти-CD18-антител, которые существенно блокировали прикрепление эозинофилов к клеткам линии Colo-205 и снижали цитотоксическую активность эозинофилов [89].

В других исследованиях были изучены мембранные рецепторы $\gamma\delta$ TCR/CD3, также принимающие участие в реализации цитотоксичности эозинофилов. Установлено, что эозинофилы человека экспрессируют рецепторы $\gamma\delta$ TCR/CD3 с характеристиками, сходными с таковыми у $\gamma\delta$ T-клеток [28]. Последние принимают участие в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета, локализуются преимущественно в слизистых оболочках и могут выступать в роли профессиональных антигенпрезентирующих клеток [42]. Считается, что $\gamma\delta$ TCR опосредует врожденные реакции эозинофилов против микобактерий туберкулеза и опухолевых клеток. Так $\gamma\delta$ T-клетки [85] и эозинофилы [26] оказывают выраженное цитотоксическое действие в отношении многих опухолей. При изучении $\gamma\delta$ TCR-опосредованной цитотоксичности эозинофилов против клеток линии Colo-205, авторы наблюдали индукцию апоптоза опухолевых клеток *in vitro*. После добавления в культуру клеток анти- $\gamma\delta$ TCR-антител данного эффекта не отмечалось. При этом действие антител оказалось более заметным на ранних стадиях контакта клеток линии Colo-205 и эозинофилов, подтверждая то, что $\gamma\delta$ TCR-опосредованные взаимодействия эозинофилов с опухолью значимы для запуска цитотоксических реакций. Несмотря на невысокий уровень экспрессии $\gamma\delta$ TCR на мембране (по сравнению с таковым у $\gamma\delta$ T-лимфоцитов), эозинофилы участвуют в реализации реакций врожденного иммунитета, в особенности против клеток, несущих $\gamma\delta$ TCR-лиганды. Полученные результаты указывают на протективную роль эозинофилов в противоопухолевом иммунном ответе, опосредованном экспрессией комплекса $\gamma\delta$ TCR/CD3 [28].

Однако в литературе описаны механизмы, благодаря которым эозинофилы используются опухолевыми клетками в целях их собственного выживания и развития. Известно, что эозинофилы принимают активное участие в заживлении ран и ремоделировании тканей за счет секреции факторов роста и многих

проангиогенных посредников [134]. Так, например, в носовых полипах эозинофилы экспрессируют трансформирующий фактор роста (TGF – transforming growth factor) $\beta 1$, который активирует пролиферацию, дифференцировку и другие функции клеток. Предполагается, что синтез этого фактора может способствовать развитию структурных аномалий носовых полипов в виде фиброза стромы и утолщения базальной мембраны. Секреция TGF $\beta 1$ эозинофилами усиливает синтез коллагена в ткани легких и пролиферацию фибробластов кожи [88].

Кроме этого, за счет продукции VEGF эозинофилы могут способствовать пролиферации эндотелиальных и опухолевых клеток, экспрессирующих на своей поверхности рецепторы VEGFR [91]. VEGF рассматривается в качестве ключевого медиатора опухолевого ангиогенеза, который стимулирует рост новых кровеносных сосудов из близлежащих капилляров, обеспечивая опухолевые клетки кислородом и питательными веществами; играет роль в образовании новых лимфатических сосудов, представляющих собой пути метастазирования. Эозинофилы в условиях гипоксии, создаваемой в участках некроза опухоли, способны экспрессировать VEGF, стимулируя ангиогенез и пролиферацию трансформированных клеток [88, 91, 134].

Таким образом, проблема опухолеассоциированной тканевой эозинофилии на сегодняшний день не имеет однозначного решения. Изучение роли опухолевого микроокружения, в состав которого входят эозинофильные гранулоциты, при злокачественных новообразованиях различной локализации является перспективным ввиду его значимого влияния на рост и развитие опухолевых клеток, и, как следствие, на течение и прогноз онкологических заболеваний.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Клиническая характеристика обследованных пациентов

Исследование выполнено на базе лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий кафедрой – член-корр. РАН, д-р мед. наук, профессор Уразова О.И.) 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 T₁₋₂, у 278 (65,1%) больных – символу T₃. Очаги регионарного метастазирования (T1-3N1-3M0) 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 (Рисунок 4).



Рисунок 4. Группы обследованных лиц, включенных в исследование.

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±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±5,2 лет). Среди пациентов с раком толстого кишечника основную группу исследования составили 23 человека (средний возраст 63,0±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.

2.2 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. Образцы тканей помещали в 12%-ный раствор рН-нейтрального формалина, затем материал подготавливали согласно стандартной методике и заливали в парафин [13]. Из парафиновых блоков тканей желудка и толстого кишечника готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм. Для окрашивания микропрепаратов применяли растворы красителей гематоксилина и эозина. Подготовка материала для исследования, а также гистологическая верификация опухолей проводились на базе патологоанатомического отделения ОГАУЗ «ТООД» (заведующий – д-р мед. наук И.Л. Пурлик).

2.3 Методы исследования

2.3.1 Оценка эозинофилии опухолевой ткани желудка и толстого кишечника

Оценку тканевой эозинофилии проводили на гистологических препаратах опухолевой ткани желудка и толстого кишечника, окрашенных гематоксилином и эозином, полуколичественным методом с применением светового микроскопа Leica DM2000 (Leica Microsystems, Германия). 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 (Рисунки 5, 6). При наличии единичных эозинофилов (среднее количество от 0 до 10 клеток в поле зрения) констатировали отсутствие опухолиассоциированной тканевой эозинофилии [68, 81].

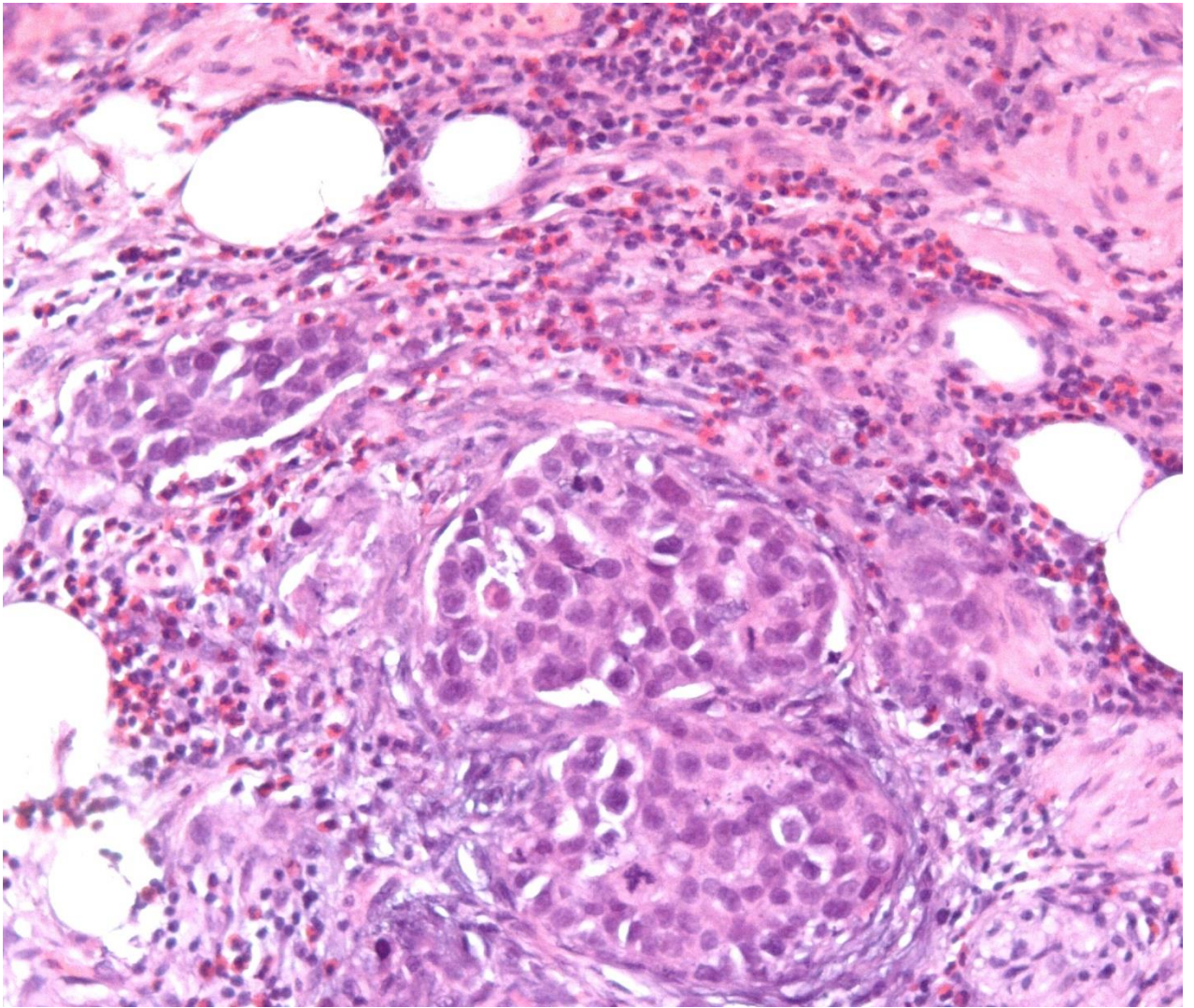


Рисунок 5. Рак желудка, сопровождающийся тканевой эозинофилией. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. 200.

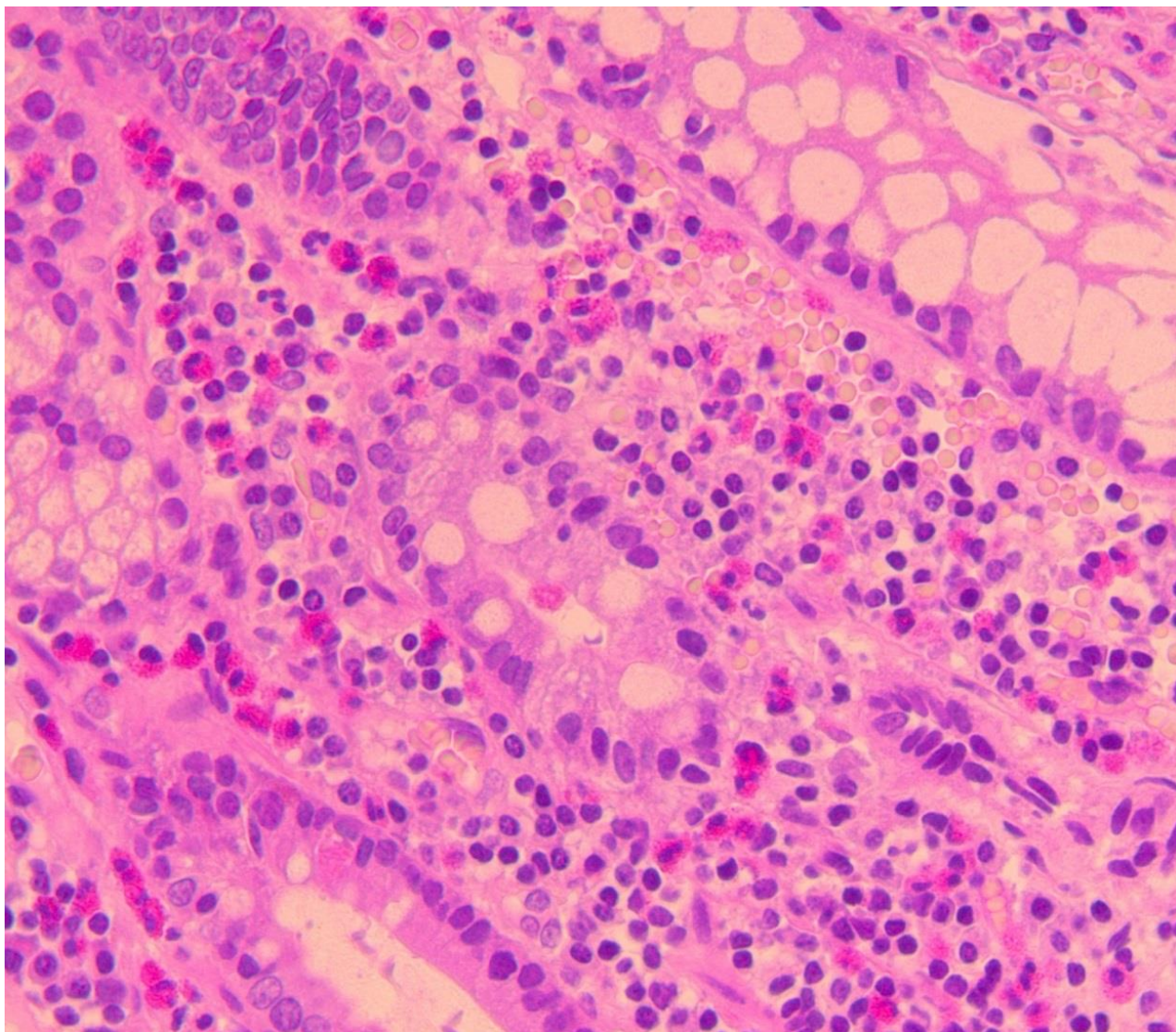


Рисунок 6. Рак ободочной кишки, сопровождающийся тканевой эозинофилией. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. 400.

2.3.2 Оценка экспрессии CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника

Оценку экспрессии CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника проводили на парафиновых срезах иммуногистохимическим методом по стандартной методике [18] с использованием автоматического

иммуногистостейнера Bond-maX (Leica Biosystems, Германия). Срезы докрашивали гематоксилином и заключали в канадский бальзам.

Принцип метода. В основе метода лежит реакция антиген-антитело, что позволяет идентифицировать антиген, основываясь на его связывании с антителом. Немаркированные первичные антитела связываются с определяемым антигеном (регистрируемой молекулой), которые затем выявляются при помощи вторичных меченых антител.

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).

Ход работы. Оценку экспрессии CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника осуществляли в участках максимальной экспрессии маркера (в «горячих точках»), что более воспроизводимо, чем в случайных полях зрения. При исследовании экспрессии CCL11 проводили оценку цитоплазматического окрашивания опухолевых клеток и выражали в % относительное содержание положительно окрашенных клеток. Экспрессию CCR3 оценивали на мембране клеток опухолевого микроокружения и определяли относительное количество положительно окрашенных клеток (выражали в %) [68, 94]. Подсчитывали не менее 300 клеток.

2.3.3 Оценка экспрессии VEGFR и EGFR в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника

Исследование экспрессии VEGFR и EGFR в опухолевой ткани осуществляли методом иммуногистохимии на парафиновых срезах по стандартной методике, принцип метода описан в п. 2.3.2.

В исследовании использовали антитела марки «Novocastra» (Leica Biosystems, Германия) к VEGFR (клон KLT9, рабочее разведение 1:100, мышиные) и EGFR (клон EGFR.25, RTU, мышиные).

Ход работы. При исследовании экспрессии VEGFR и EGFR в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника оценивали относительное количество положительно окрашенных опухолевых клеток (в %), учитывали только мембранную экспрессию рецепторов [23, 48, 142]. Подсчитывали не менее 300 клеток в участках максимальной экспрессии рецептора.

2.3.4 Оценка экспрессии белков-регуляторов клеточного цикла p53 и p21 в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника

Изучение экспрессии белков-регуляторов клеточного цикла p53 и p21 в опухолевой ткани проводили методом иммуногистохимии на парафиновых срезах по стандартной методике, принцип метода описан в п. 2.3.2.

В ходе исследования использовали моноклональные антитела фирмы «Novocastra» (Leica Biosystems, Германия) к p21 (клон 4D10, рабочее разведение 1:40, мышиные) и моноклональные антитела марки «Bond» (Leica Biosystems, Германия) к p53 (клон DO-7, RTU, мышиные).

Дикий тип белка p53 не идентифицируется методом иммуногистохимии ввиду короткого периода полураспада, в то время как мутантная формы белка p53 накапливается в ядре клетки. Это вызвано изменением пространственного строения и увеличением периода полураспада мутантного белка, что позволяет его определять иммуногистохимическим методом [5].

Ход работы. При исследовании экспрессии мутантного белка p53 и белка p21 оценивали относительное количество опухолевых клеток с позитивно окрашенными ядрами (выражали в %) [9, 75]. Подсчитывали не менее 300 клеток в участках максимальной экспрессии маркера.

2.3.5. Выделение ДНК

Выделение ДНК проводили из образцов тканей, полученных с границы резекции опухоли, фиксированных в формалине и залитых в парафин. В полученных образцах методом световой микроскопии верифицировали присутствие только нормальной ткани органа. Выделение ДНК из нормальной ткани желудка и толстого кишечника проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору «FFPET DNA – Extraction Kit» (Биолинк, Новосибирск).

Принцип метода. ДНК осаждается на сорбент, затем отмывается буферным раствором и сорбент удаляется. Полученная ДНК растворяется в ТЕ-буфере и может использоваться для дальнейших исследований.

Ход работы. На первом этапе срезы ткани помещали в специальный раствор, входящий в набор для выделения ДНК, в котором одновременно расплавлялся парафин, лизировалась ткань и удалялись формалиновые сшивки. На следующем этапе, после лизиса ткани, ДНК экстрагировали хлороформом и осаждали изопропанолом. Осадок ДНК промывали этиловым спиртом, высушивали и растворяли в ТЕ буфере. Готовую ДНК хранили при -20°C.

2.3.6. Исследование аллельного полиморфизма генов *CCL11 (A384G)*, *CCR3 (T51C)*, *IL5 (C703T)*, *IL5RA (G80A)*, *TP53 (G215C)* и *CDKN1A (A1026G)*

Исследование полиморфных участков генов *CCL11 (A384G)*, *CCR3 (T51C)*, *IL5 (C703T)*, *IL5RA (G80A)*, *TP53 (G215C)* и *CDKN1A (A1026G)* осуществляли с применением рестрикционного анализа продуктов ПЦР-амплификации специфических участков генома (ПДРФ-анализ) с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете.

Принцип метода заключается в амплификации определенного фрагмента ДНК, содержащего анализируемый полиморфизм гена, с последующим расщеплением

наработанного ампликона соответствующей эндонуклеазой рестрикции. Далее оценивается длина полученных фрагментов ДНК путём гель-электрофореза. Размер фрагментов ДНК зависит от полиморфного варианта гена, который определяет наличие или отсутствие сайта рестрикции для эндонуклеазы.

Ход работы. Амплификацию осуществляли путем ПЦР, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе [16, 82, 99, 114] с применением амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США).

Реакционная смесь для ПЦР содержала 10 мкл образца ДНК, буфер для амплификации в финальной концентрации 1×, по 5 пмоль специфичных праймеров (Медиген, Новосибирск), 2 ед. акт. SuperHotTaq-ДНК-полимеразы (Bioron GmbH, Германия), 1,5 ммоль/л MgCl₂, 0,8 ммоль/л смеси dNTP (Bioron GmbH, Германия) и дистиллированную воду до конечного объема 50 мкл.

Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 94°C (5 мин), 30 циклов отжига при специфической для каждой пары праймеров температуре в течение 45 с, элонгации при 72°C (45 с) и денатурации при 94°C (45 с). Программу завершала элонгация при 72°C в течение 3 мин. Амплификат (7 мкл) подвергали гидролизу рестриктазой (3-5 ед. акт., «Сибэнзим», Новосибирск) при оптимальной для фермента температуре (Таблица 1). Продукты рестрикции анализировали в 4%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

Таблица 1

Условия проведения ПЦР и ПДРФ-анализа полиморфных вариантов генов цитокинов, их рецепторов и белков-регуляторов клеточного цикла [16, 82, 99, 114]

Ген и полиморфизм	Структура праймеров	Температура отжига	Фермент рестрикции	Температура и время рестрикции
<i>CCL11</i> <i>A384G</i>	5'-GGT-TTC-CTT-GCT- CCT-TTC-CTC-3'; 5'-GCA-GAA-CAG-AAG- AGA-GAG-GCA-A-3'	58°C	<i>TaqI</i>	65°C, 12 ч
<i>CCR3T51C</i>	5'-CTT-TGG-TAC-CAC- ATC-СТА-ССА-3'; 5'-TGA- GAG-GAG-CTT-ACA-CAT- GC-3'	55°C	<i>FaeI</i>	37°C, 12 ч

<i>IL5</i> <i>C703T</i>	5'-CAG-GGA-GAG-CCA-ATC-AGT-3'; 5'-ATG-ATG-TCC-AGA-CTC-CAG-GAT-CT-3'	60°C	<i>PstNI</i>	37°C, 12 ч
<i>IL5RA</i> <i>G80A</i>	5'-AT-GGC-TAT-CTG-GAC- GAG-AG-3'; 5'-TTA-GAG-GCG-GTT-CTT-CAC- TC-3'	57°C	<i>AcsI</i>	50°C, 12 ч
<i>TP53</i> <i>G215C</i>	5'-TTG-CCG-TCC-CAA-GCA-ATG-GAT-GA-3'; 5'-TCT-GGG-AAG-GGA-CAG-AAG-ATG-AC-3'	62,5°C	<i>BstFNI</i>	60°C, 4 ч
<i>CDKN1A</i> <i>A1026G</i>	5'-CAT-TTC-TTT-GCT-GCA-TGA-TCT-GAG-TT-3'; 5'-CCC-TAC-ACT-CAC-CTG-AAC-AGA-AGG-3'	61°C	<i>HinfI</i>	37°C, 12 ч

При изучении полиморфизма гена *CCL11 (A384G)* в ходе ПЦР получали участок ДНК размером 204 п.н., который при наличии дикого А-аллеля гидролизовался рестриктазой *TaqI* на 2 фрагмента – 187 и 17 п.н. Присутствие G-аллеля приводило к исчезновению сайта рестрикции для *TaqI* и ПЦР-продукт в 204 п.н. не гидролизовался. В случае гетерозиготного варианта AG в рестрикционной смеси присутствовали все 3 фрагмента [99].

Аналогичным образом анализировали полиморфизм гена *CCR3 (T51C)*. При наличии T-аллеля амплифицированный в ходе ПЦР участок гена *CCR3*, размером 130 п.н., гидролизовался рестриктазой *FaeI* на 2 фрагмента – 108 и 22 п.н. Присутствие C-аллеля приводило к исчезновению сайта рестрикции для *FaeI* и ПЦР-продукт не гидролизовался. При наличии гетерозиготного варианта в рестрикционной смеси присутствовали все 3 фрагмента [82].

При изучении полиморфизма гена *IL5 (C703T)*, в ходе проведения ПЦР, получали фрагмент ДНК размером 178 п.н. При наличии C-аллеля участок гена *IL5* гидролизовался рестриктазой *PstNI* на 2 фрагмента – 160 и 18 п.н. Присутствие T-аллеля приводило к исчезновению сайта рестрикции для *PstNI*, и ПЦР-продукт не подвергался гидролизу. В случае CT-генотипа в рестрикционной смеси обнаруживались все 3 фрагмента ДНК [114].

В ходе исследования полиморфизма гена *IL5RA (G80A)* получали фрагмент ДНК

размером 206 п.н. При наличии *G*-аллеля амплифицированный участок гена *IL5RA* не гидролизировался. Присутствие *A*-аллеля приводило к появлению сайта рестрикции для *AcsI* и ПЦР-продукт гидролизировался на фрагменты длиной 154 и 52 п.н. В случае *GA*-генотипа в рестрикционной смеси присутствовали все 3 фрагмента [114].

При амплификации участка гена *TP53*, в котором располагается полиморфизм *G215C*, получали фрагмент ДНК размером 199 п.н. При наличии дикого *G*-аллеля этот участок гена *TP53* гидролизировался рестриктазой *BstFNI* на 2 фрагмента – 113 и 86 п.н. Вариант *C*-аллеля приводил к исчезновению сайта рестрикции для *BstFNI* и ПЦР-продукт в 199 п.н. не гидролизировался. В случае *GC*- гетерозиготы в рестрикционной смеси присутствовали все 3 фрагмента [16].

После электрофоретической идентификации в агарозном геле продуктов ПДРФ-анализа полиморфизма гена *CDKN1A (A1026G)* визуализировали фрагмент 186 п.н. (*G*-аллель) или фрагменты 166 и 20 п.н. (*A*-аллель). В случае гетерозиготного варианта *AG* в рестрикционной смеси присутствовали все 3 фрагмента [16].

2.3.7. 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 (σ). 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 ϕ , который отражает достоверность различий между процентными долями двух выборок (Таблица 2). Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$.

Таблица 2

Интерпретация значений критерия ϕ , согласно рекомендациям
Rea and Parker [3]

Значение критерия ϕ	Сила взаимосвязи
$<0,1$	Несущественная
$0,1 - <0,2$	Слабая
$0,2 - <0,4$	Средняя
$0,4 - <0,6$	Относительно сильная
$0,6 - <0,8$	Сильная
$0,8 - 1,0$	Очень сильная

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:

$$OR = (A \times D) / (B \times C), (1)$$

где: А – количество больных раком с эозинофилией, имеющих генотип (аллель);

В – количество больных раком с эозинофилией, не имеющих генотип (аллель);

С – количество больных раком без эозинофилии, имеющих генотип (аллель);

D – количество больных раком без эозинофилии, не имеющих генотип (аллель).

При $OR=1$ судили об отсутствии связи между сравниваемыми факторами, при $OR<1$ – об отрицательной связи и, при $OR>1$ – о положительной связи признаков [20].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящем исследовании все пациенты были разделены на группы в зависимости от локализации опухолевого процесса и наличия или отсутствия тканевой эозинофилии. Среди больных раком желудка и раком толстого кишечника выделены индивидуумы, у которых опухолевый процесс ассоциирован с тканевой эозинофилией (в «горячих точках» опухолевой ткани регистрировали эозинофильные гранулоциты в количестве 10 и более в поле зрения). В группы сравнения вошли больные раком желудка и раком толстого кишечника без эозинофилии, у которых в опухолевой ткани эозинофильные гранулоциты не определялись либо регистрировались единичные клетки.

В данной главе представлены результаты исследования молекулярно-генетических факторов, обуславливающих формирование эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани с учетом генетической детерминированности секреции эозинофилактивирующих цитокинов и их рецепторов. Проанализированы гистологические, морфологические и клинические характеристики злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника, ассоциированных с тканевой эозинофилией.

3.1 Экспрессия CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани у больных раком желудка и толстого кишечника

Ключевым фактором хемотаксиса эозинофилов является CCL11, действующий через рецептор CCR3. Источником CCL11 могут быть резидентные тканевые элементы, макрофаги, эозинофилы, тучные клетки, а также клетки эпителиальных опухолей. В результате исследования была установлена экспрессия CCL11 в цитоплазме опухолевых клеток во всех образцах тканей злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника (Рисунки 7, 8, 9, 10).

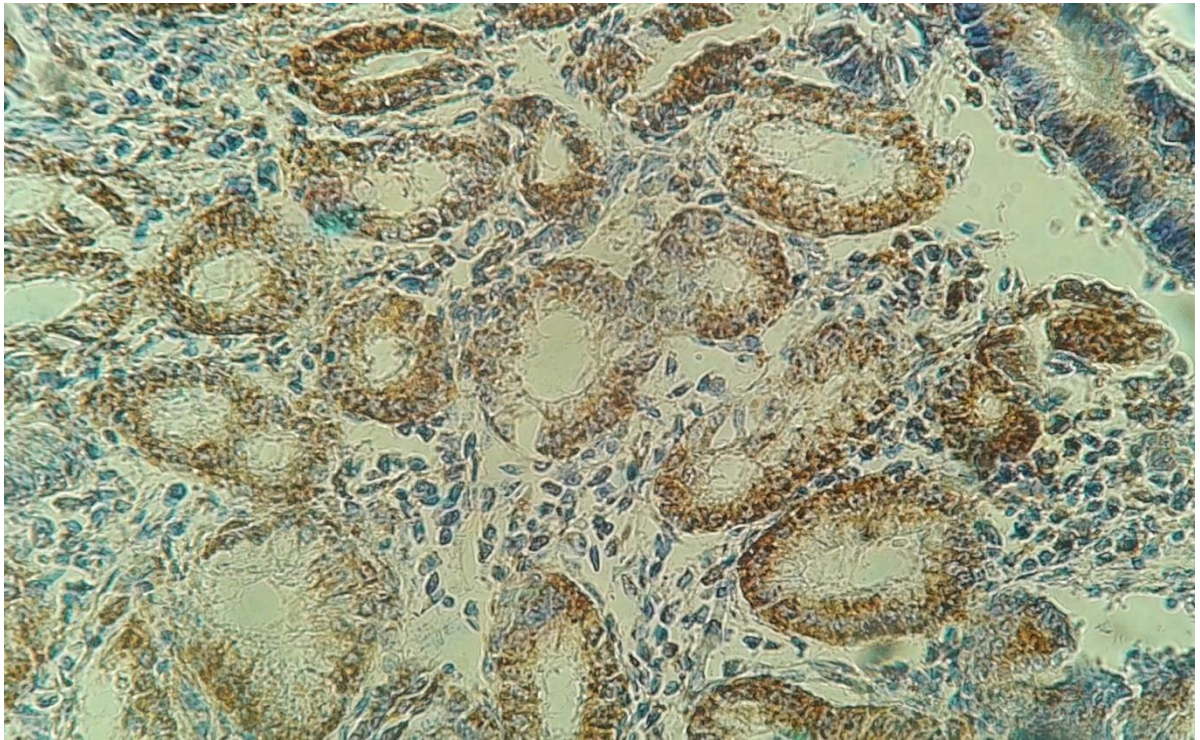


Рисунок 7. Рак желудка, сопровождающийся тканевой эозинофилией. Иммуногистохимическая реакция выявления ССL11 в цитоплазме опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

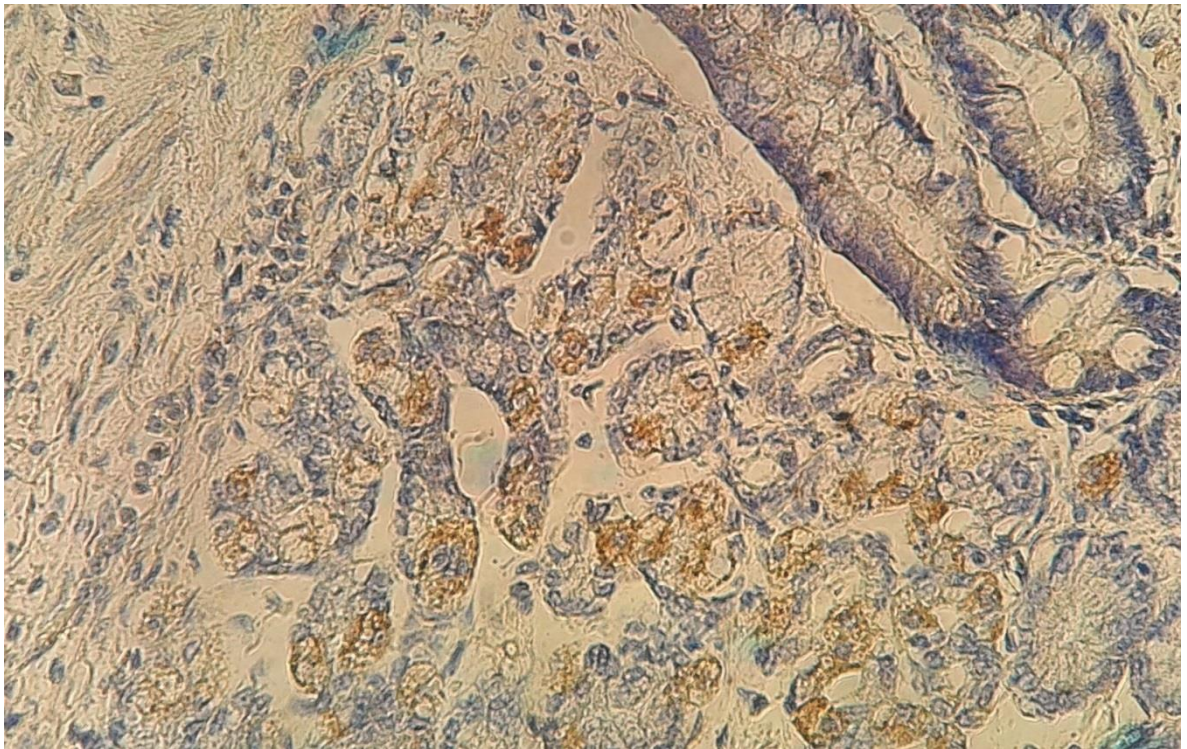


Рисунок 8. Рак желудка без эозинофилии. Иммуногистохимическая реакция выявления ССL11 в цитоплазме опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

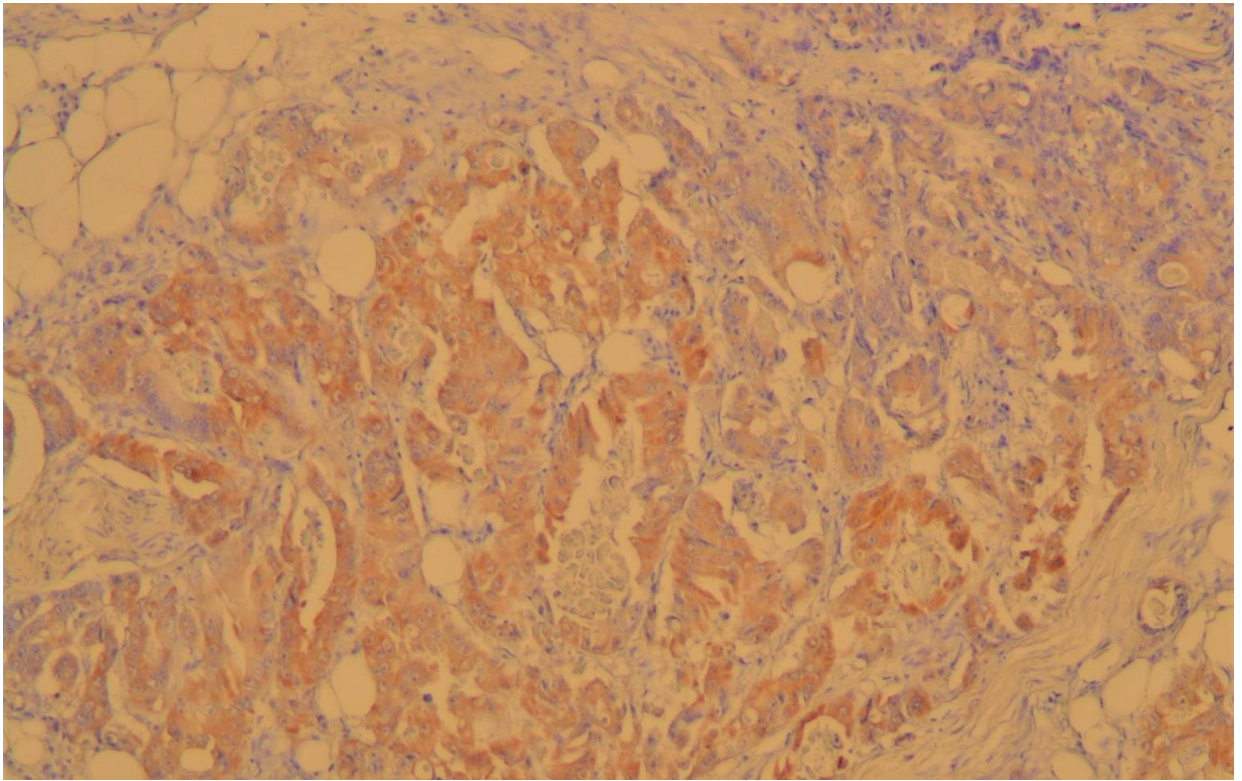


Рисунок 9. Рак ободочной кишки, сопровождающийся тканевой эозинофилией. Иммуногистохимическая реакция выявления ССL11 в цитоплазме опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

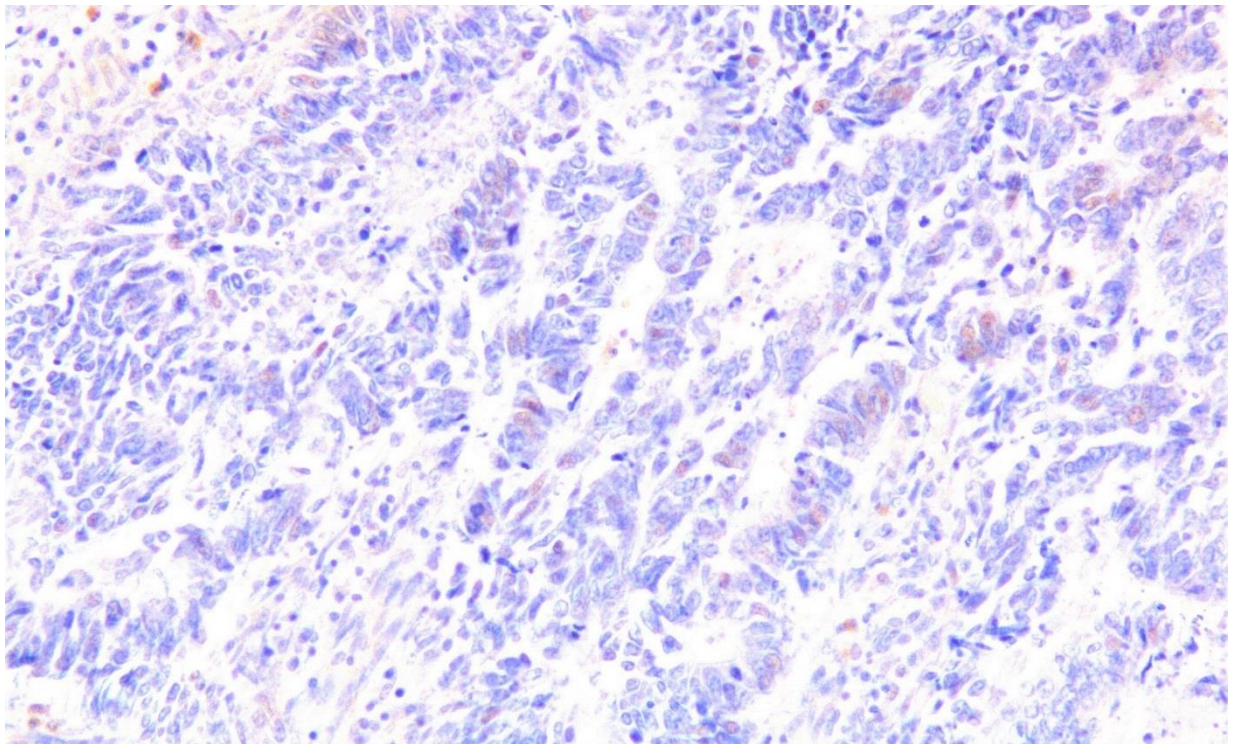


Рисунок 10. Рак ободочной кишки без эозинофилии. Иммуногистохимическая реакция выявления ССL11 в цитоплазме опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

При этом относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих белок CCL11, у больных раком желудка и толстого кишечника варьировало от 12% до 92%. Показаны достоверные различия уровня экспрессии CCL11 в образцах тканей злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией и без нее (Таблица 3). Установлена более выраженная экспрессия CCL11 опухолевыми клетками при раке желудка и раке толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией. Относительное содержание опухолевых клеток, экспрессирующих CCL11, в новообразованиях желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией 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).

Таблица 3

Экспрессия CCL11 опухолевыми клетками и CCR3 клетками микроокружения при раке желудка и толстого кишечника, % ($M\pm S.D.$)

Показатель	Локализация опухоли			
	Рак желудка (n=52)		Рак толстого кишечника (n=55)	
	С тканевой эозинофилией (n=25)	Без тканевой эозинофилии (n=27)	С тканевой эозинофилией (n=23)	Без тканевой эозинофилии (n=32)
CCL11	61,64±19,42	34,78±14,53	62,7±23,17	31,03±14,77
	F=32,20; p<0,05		F=38,28; p<0,05	
CCR3	15,84±6,34	8,70±4,39	10,87±3,19	9,09±3,44
	F=22,56; p<0,05		F=3,78; p>0,05	

Примечание: p – уровень статистической значимости различий между показателями у пациентов с эозинофилией и без; F – значение F-статистики по результатам дисперсионного анализа.

При исследовании в ткани злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника экспрессии CCR3 было показано присутствие этого рецептора на клетках опухолевого инфильтрата (Рисунки 11, 12, 13, 14).

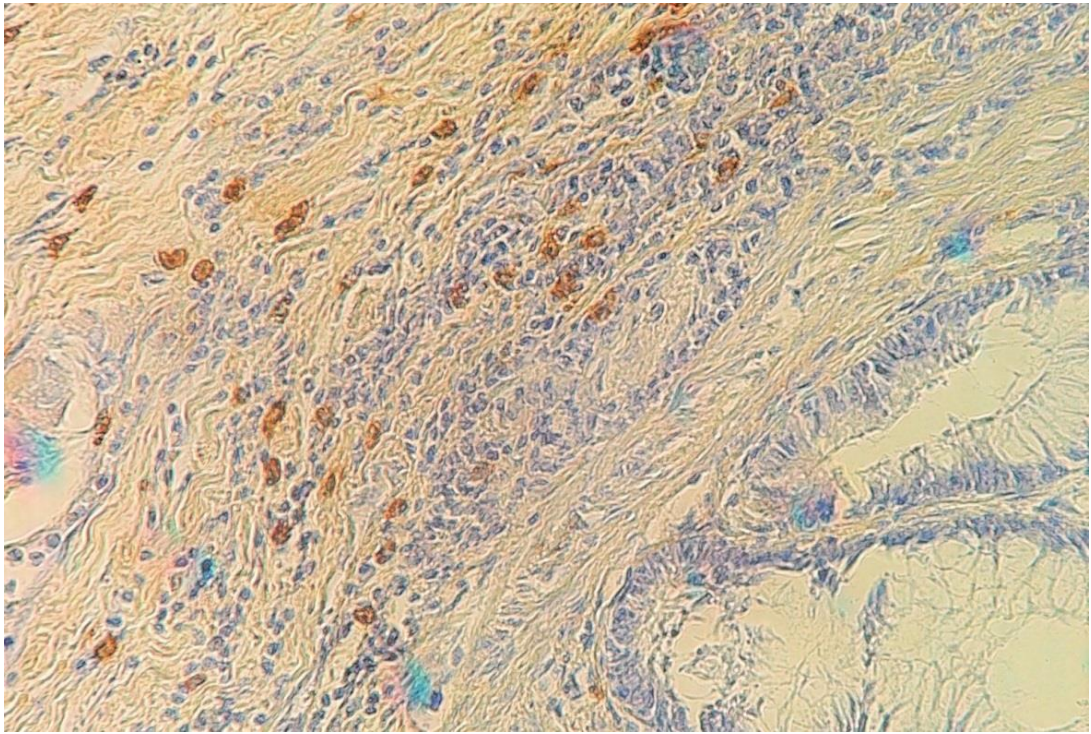


Рисунок 11. Рак желудка, сопровождающийся тканевой эозинофилией. Иммуногистохимическая реакция выявления CCR3 на клетках опухолевого микроокружения. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

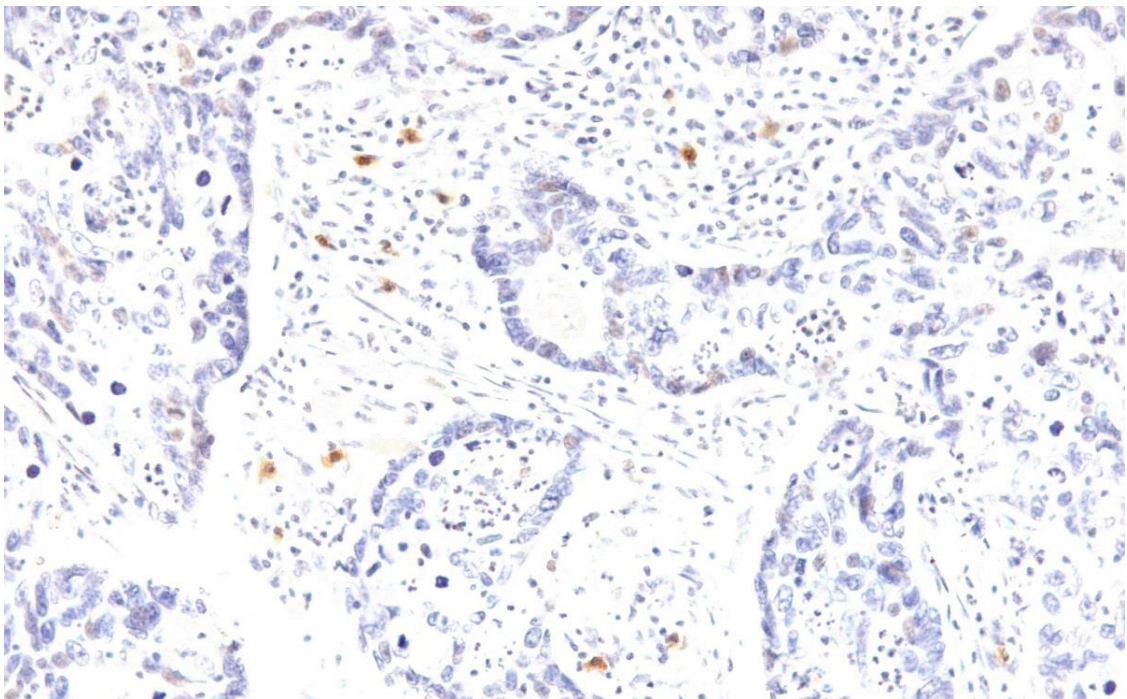


Рисунок 12. Рак желудка без эозинофилии. Иммуногистохимическая реакция выявления CCR3 на клетках опухолевого микроокружения. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

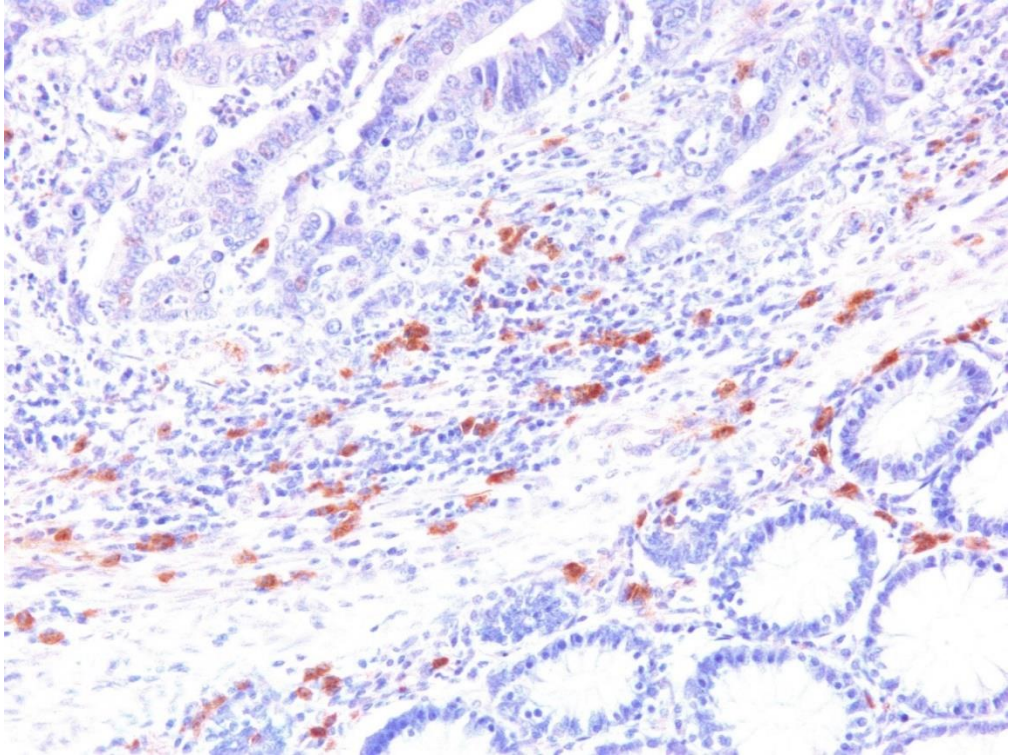


Рисунок 13. Рак ободочной кишки, сопровождающийся тканевой эозинофилией. Иммуногистохимическая реакция выявления CCR3 на клетках опухолевого микроокружения. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

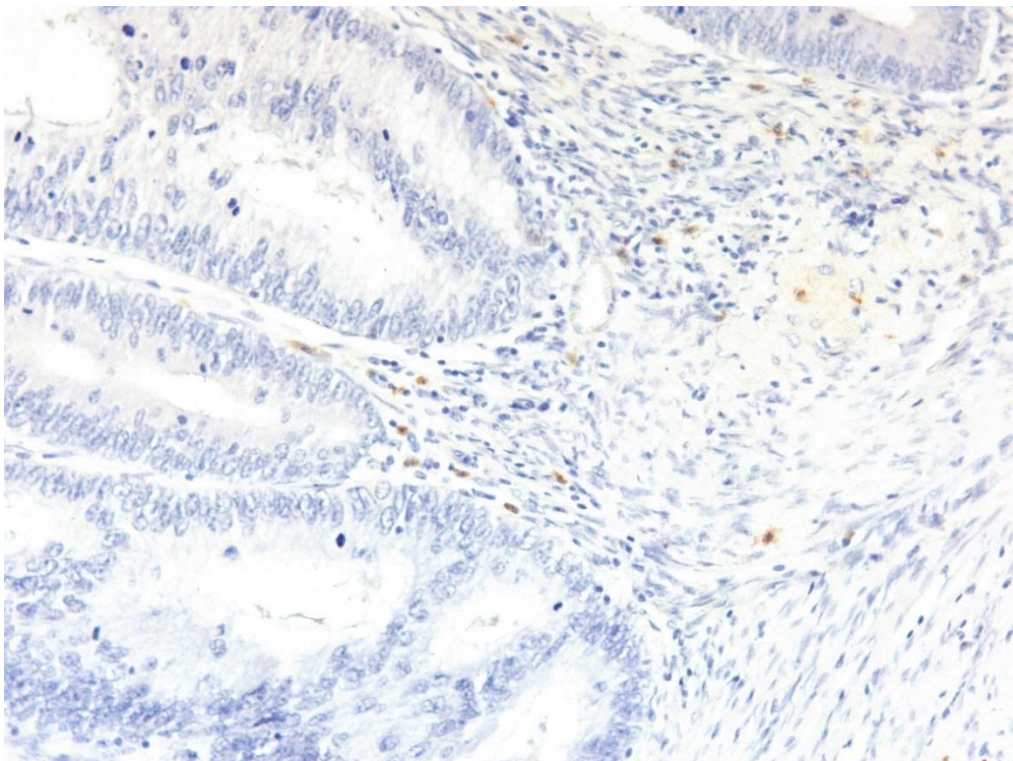


Рисунок 14. Рак ободочной кишки без эозинофилии. Иммуногистохимическая реакция выявления CCR3 на клетках опухолевого микроокружения. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

Рецептор CCR3 определялся во всех исследуемых образцах опухолевой ткани желудка и толстого кишечника. При этом уровень экспрессии CCR3 оказался почти в два раза выше при раке желудка с эозинофилией по сравнению с аналогичным показателем при раке желудка без эозинофилии ($F=22,56$; $p<0,05$) (Таблица 3). Различия относительного содержания клеток опухолевого микроокружения, экспрессирующих CCR3, при раке толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией и без нее не достигли статистически значимого уровня.

Таким образом, при раке желудка и раке толстого кишечника с эозинофилией опухолевые клетки экспрессируют CCL11, регулирующий состав микроокружения. Клетки внутри- и околоопухолевого инфильтрата, в свою очередь, экспрессируют CCR3, что обеспечивает адекватное функционирование CCL11/CCR3-опосредованного механизма рекрутирования эозинофилов в опухолевую ткань.

3.2 Распределение генотипов и аллелей генов эозинофил-активирующих цитокинов и их рецепторов у больных раком желудка и толстого кишечника

Важным фактором, определяющим уровень экспрессии белков и их рецепторов, является аллельный полиморфизм генов. Наличие полиморфных вариантов в промоторной области генов определяет частоту актов транскрипции генов, сродство к факторам транскрипции и инактивации генов, что влияет на экспрессию белка.

В связи с этим, в исследовании проводилась оценка ассоциаций носительства полиморфных вариантов генов ключевых эозинофил-активирующих факторов CCL11 и IL5, а также их рецепторов с наличием эозинофильной инфильтрации в ткани злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника.

В результате проведенного нами молекулярно-генетического исследования установлено, что во всех группах обследованных лиц преобладал гомозиготный

генотип *AA* и аллель *A* полиморфизма *A384G* гена *CCL11*. У больных раком желудка и толстого кишечника как с эозинофилией, так и без нее достоверных различий в распределении аллелей и генотипов данного полиморфизма выявлено не было (Таблица 4).

Таблица 4

Распределение генотипов и аллелей гена *CCL11 (A384G)* у больных раком желудка и толстого кишечника (в абсолютных числах и %)

Группы сравнения	Генотипы			p ₁	Аллели		p ₂
	AA	AG	GG		A	G	
Больные раком желудка с эозинофилией (n=100)	49 (49,0%)	37 (37,0%)	14 (14,0%)	>0,05; $\chi^2=1,37$	135 (67,5%)	65 (32,5%)	>0,05; $\chi^2=1,55$
Больные раком желудка без эозинофилии (n=113)	63 (55,8%)	39 (34,5%)	11 (9,7%)		165 (73,0%)	61 (27,0%)	
Больные раком толстого кишечника с эозинофилией (n=104)	46 (44,2%)	47 (45,2%)	11 (10,6%)	>0,05; $\chi^2=2,13$	139 (66,8%)	69 (33,2%)	>0,05; $\chi^2=0,65$
Больные раком толстого кишечника без эозинофилии (n=110)	58 (52,7%)	39 (35,5%)	13 (11,8%)		155 (70,5%)	65 (29,5%)	

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий частоты генотипов между группами больных; p₂ – уровень статистической значимости различий частоты аллелей между группами больных; χ^2 – критерий Хи-квадрат Пирсона.

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма *T51C* гена *CCR3* у больных раком желудка и толстого кишечника позволил выявить статистически значимые различия в зависимости от наличия опухолеассоциированной тканевой эозинофилии (Таблица 5). Во всех группах обследованных лиц гомозиготный генотип *TT* полиморфизма *T51C* гена *CCR3* преобладал над гомозиготным по аллелю *C* генотипом и гетерозиготным генотипом *TC* полиморфизма *T51C* гена

CCR3. При этом среди больных раком желудка и толстого кишечника, сопровождающимся тканевой эозинофилией, гомозиготный генотип *CC* исследуемого полиморфизма встречался в 2,0 раза чаще (19,0% и 16,4% соответственно), чем в группах больных раком желудка и толстого кишечника без эозинофильной инфильтрации (8,0% и 7,3% соответственно). У пациентов с раком 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)), а также аллеля *C* (OR=1,69 (1,13-2,53) и OR=1,87 (1,23-2,85)) с эозинофилией.

Таблица 5

Распределение генотипов и аллелей гена *CCR3 (T51C)* у больных раком желудка и толстого кишечника (в абсолютных числах и %)

Группы сравнения	Генотипы			p ₁	Аллели		p ₂
	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>		<i>T</i>	<i>C</i>	
Больные раком желудка с эозинофилией (n=100)	41 (41,0%)	40 (40,0%)	19 (19,0%)	<0,05; $\chi^2=6,57$	122 (61,0%)	78 (39,0%)	<0,05; $\chi^2=6,43$
Больные раком желудка без эозинофилии (n=113)	60 (53,1%)	44 (38,9%)	9 (8,0%)		164 (72,6%)	62 (27,4%)	
Больные раком толстого кишечника с эозинофилией (n=104)	46 (44,2%)	41 (39,4%)	17 (16,4%)	<0,05; $\chi^2=7,45$	133 (63,9%)	75 (36,1%)	<0,05; $\chi^2=8,53$
Больные раком толстого кишечника без эозинофилии (n=110)	67 (60,9%)	35 (31,8%)	8 (7,3%)		169 (76,8%)	51 (23,2%)	

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий частоты генотипов между группами больных; p₂ – уровень статистической значимости различий частоты аллелей между группами больных; χ^2 – критерий Хи-квадрат Пирсона.

При исследовании распределения частоты генотипов и аллелей полиморфного сайта *C703T* гена *IL5* было показано, что во всех группах пациентов с раком

желудка и толстого кишечника чаще регистрировались носители гомозиготного генотипа *CC* и аллеля *C*, реже – носители генотипов *CT* и *TT* и аллеля *T* (Таблица 6).

Таблица 6

Распределение генотипов и аллелей гена *IL5* (*C703T*) у больных раком желудка и толстого кишечника (в абсолютных числах и %)

Группы сравнения	Генотипы			p ₁	Аллели		p ₂
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>		<i>C</i>	<i>T</i>	
Больные раком желудка с эозинофилией (n=100)	61 (61,0%)	34 (34,0%)	5 (5,0%)	<0,05; $\chi^2=6,30$	156 (78,0%)	44 (22,0%)	<0,05; $\chi^2=6,59$
Больные раком желудка без эозинофилии (n=113)	52 (46,0%)	47 (41,6%)	14 (12,4%)		151 (66,8%)	75 (33,2%)	
Больные раком толстого кишечника с эозинофилией (n=104)	63 (60,6%)	32 (30,8%)	9 (8,6%)	<0,05; $\chi^2=7,36$	158 (76,0%)	50 (24,0%)	<0,05; $\chi^2=8,22$
Больные раком толстого кишечника без эозинофилии (n=110)	47 (42,7%)	45 (40,9%)	18 (16,4%)		139 (63,2%)	81 (36,8%)	

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий частоты генотипов между группами больных; p₂ – уровень статистической значимости различий частоты аллелей между группами больных; χ^2 – критерий Хи-квадрат Пирсона.

Статистический анализ выявил значимые различия в распределении генотипов полиморфизма *C703T* гена *IL5* между группами больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией и без таковой ($\chi^2=6,30$ и $\chi^2=7,36$ соответственно, p₁<0,05). Установлено, что генотип *CC* у больных раком желудка и толстого кишечника с эозинофилией встречался достоверно чаще (61,0% и 60,6% соответственно), чем у больных без эозинофильной реакции (46,0% и 42,7%

соответственно). Также показаны различия в распределении аллелей полиморфного сайта *C703T* гена *IL5* у больных раком желудка и толстого кишечника в зависимости от наличия тканевой эозинофилии ($\chi^2=6,59$ и $\chi^2=8,22$ соответственно, $p_2<0,05$). У пациентов с раком желудка и толстого кишечника установлена положительная ассоциация носительства 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* с наличием эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани.

При исследовании полиморфизма *G80A* гена *IL5RA* у больных раком желудка и толстого кишечника зарегистрировано преобладание гомозиготного генотипа *GG* над гетерозиготным вариантом *GA* и гомозиготным генотипом *AA* во всех группах обследованных лиц, при этом аллель *G* данного полиморфизма встречался в 3,0 раза чаще, чем *A*-аллель (Таблица 7).

Проведенный статистический анализ не позволил выявить значимых различий в распределении генотипов и аллелей полиморфизма *G80A* гена *IL5RA* у больных раком желудка с эозинофилией относительно аналогичных параметров у пациентов без эозинофильной инфильтрации ткани злокачественного новообразования желудка ($\chi^2=0,52$, $p_1>0,05$ и $\chi^2=0,52$, $p_2>0,05$). Схожие данные были получены и при сравнении частоты встречаемости генотипов и аллелей полиморфного сайта *G80A* гена *IL5RA* у больных раком толстого кишечника с эозинофилией и без таковой ($\chi^2=0,04$, $p_1>0,05$ и $\chi^2=0,05$, $p_2>0,05$).

Распределение генотипов и аллелей гена *IL5RA (G80A)* у больных раком желудка и толстого кишечника (в абсолютных числах и %)

Группы сравнения	Генотипы			p ₁	Аллели		p ₂
	GG	GA	AA		G	A	
Больные раком желудка с эозинофилией (n=100)	59 (59,0%)	35 (35,0%)	6 (6,0%)	>0,05; $\chi^2=0,52$	153 (76,5%)	47 (23,5%)	>0,05; $\chi^2=0,52$
Больные раком желудка без эозинофилии (n=113)	62 (54,9%)	42 (37,2%)	9 (7,9%)		166 (73,5%)	60 (26,5%)	
Больные раком толстого кишечника с эозинофилией (n=104)	61 (58,7%)	34 (32,7%)	9 (8,6%)	>0,05; $\chi^2=0,04$	156 (75,0%)	52 (25,0%)	>0,05; $\chi^2=0,05$
Больные раком толстого кишечника без эозинофилии (n=110)	62 (56,4%)	43 (39,1%)	5 (4,5%)		167 (75,9%)	53 (24,1%)	

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий частоты генотипов между группами больных; p_2 – уровень статистической значимости различий частоты аллелей между группами больных; χ^2 – критерий Хи-квадрат Пирсона.

Таким образом, в результате проведенного нами молекулярно-генетического исследования установлено, что при раке желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией преобладают аллель *C* и генотип *CC* полиморфизма *T51C* гена *CCR3* и аллель *C* и генотип *CC* полиморфизма *C703T* гена *IL5*. По данным литературы указанные генотипы и аллели полиморфизма *T51C* гена *CCR3* и полиморфизма *C703T* гена *IL5* ассоциированы с высокой экспрессией соответствующих белковых продуктов и предрасположенностью к атопии [37, 83, 100].

В целом, выявленное нами увеличение экспрессии в опухолевой ткани *CCL11* и его рецептора *CCR3*, и преобладание «высокопродуцирующих» аллелей и генотипов полиморфизма *T51C* гена *CCR3* и полиморфизма *C703T* гена *IL5*,

указывает на наличие генетически детерминированного компонента в механизме развития тканевой эозинофилии при раке желудка и раке толстого кишечника.

3.3 Экспрессия белков-регуляторов клеточного цикла p53 и p21 в опухолевой ткани у больных раком желудка и толстого кишечника

Известно, что уровень экспрессии белков-регуляторов клеточного цикла p53 и p21 характеризует активность опухолевого процесса и функциональное состояние опухолевых клеток. В опухолях различных локализаций, включая злокачественные новообразования ЖКТ, с высокой частотой регистрируются мутаций гена *TP53*. При иммуногистохимическом исследовании в ядрах клеток обнаруживается мутантный белок p53, который, в отличие от белка дикого типа, менее подвержен разрушению, накапливается в клетках и обеспечивает выраженное окрашивание. Однако мутантная форма p53 не обладает свойствами белка дикого типа.

В ходе исследования нами была проанализирована экспрессия мутантного белка p53 и белка p21 в образцах тканей рака желудка и рака толстого кишечника в зависимости от наличия тканевой эозинофилии. Экспрессию белков p53 и p21 оценивали в ядрах опухолевых клеток.

Мутантный белок p53 обнаруживался в большинстве исследованных образцов опухолей, что соответствует данным литературы, постулирующим, что мутации в гене *TP53* являются наиболее частым событием при опухолевой патологии (Рисунки 15, 16, 17, 18).

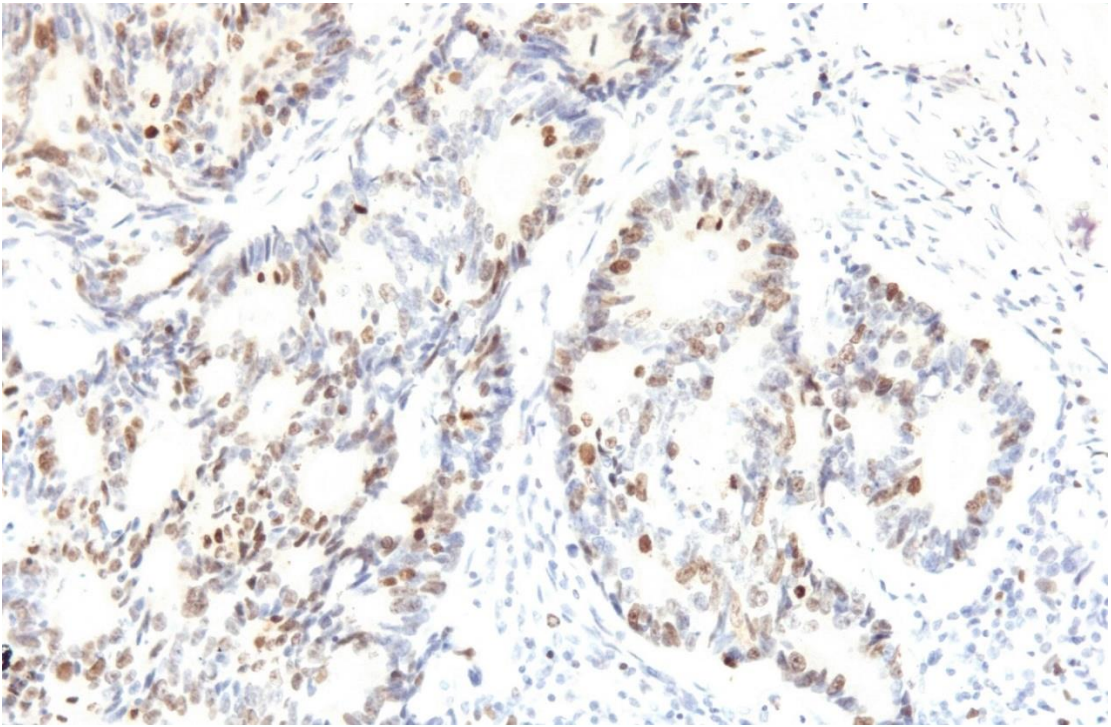


Рисунок 15. Рак желудка, сопровождающийся тканевой эозинофилией. Иммуногистохимическая реакция выявления мутантного белка p53 в ядрах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

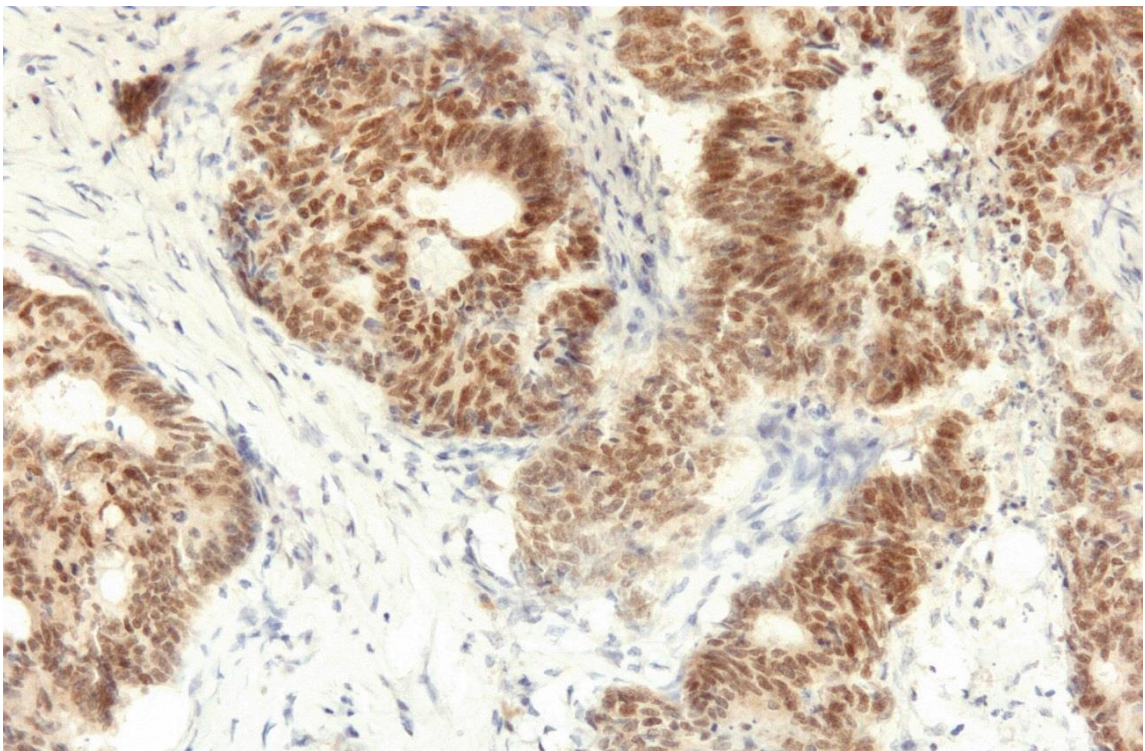


Рисунок 16. Рак желудка без эозинофилии. Иммуногистохимическая реакция выявления мутантного белка p53 в ядрах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

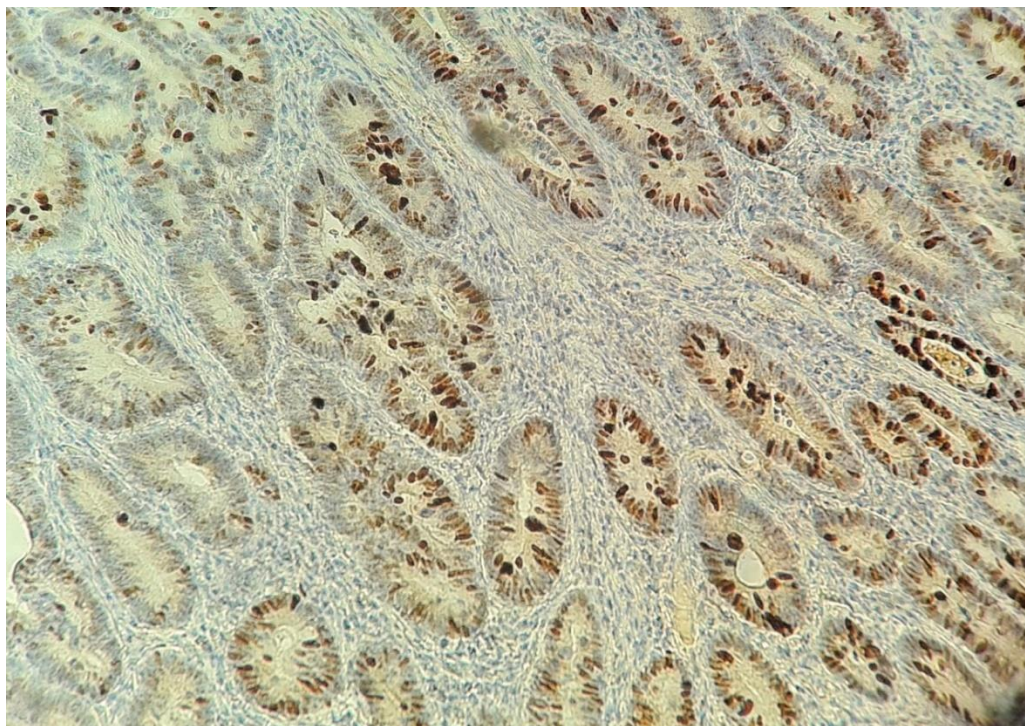


Рисунок 17. Рак ободочной кишки, сопровождающийся тканевой эозинофилией. Иммуногистохимическая реакция выявления мутантного белка p53 в ядрах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

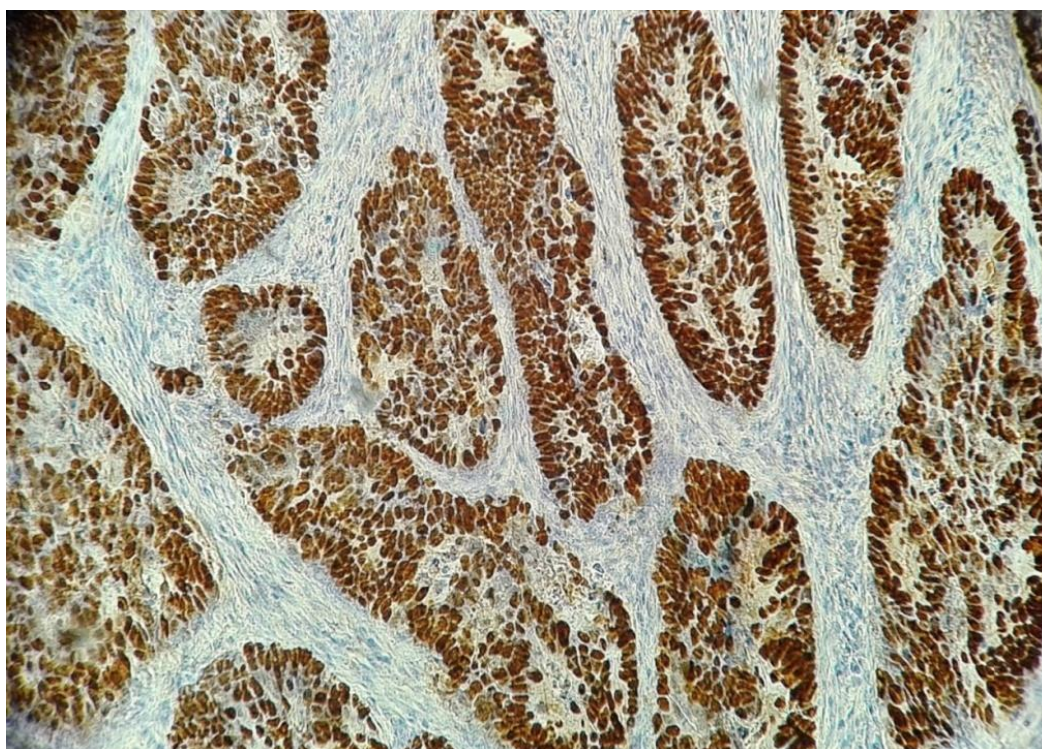


Рисунок 18. Рак ободочной кишки без эозинофилии. Иммуногистохимическая реакция выявления мутантного белка p53 в ядрах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

В образцах тканей рака желудка и толстого кишечника, сопровождающихся эозинофилией, уровень экспрессии белка p53 был достоверно ниже аналогичного параметра в образцах тканей опухолей без эозинофилии ($F=30,51$; $p<0,05$ и $F=5,45$; $p<0,05$, соответственно) (Таблица 8). При этом количество опухолевых клеток, в ядрах которых экспрессировался мутантный белок p53, при раке желудка без эозинофилии в 2,5 раза превышал соответствующий показатель у больных раком желудка, ассоциированным с эозинофильной инфильтрацией опухоли.

Таблица 8

Экспрессия белков-регуляторов клеточного цикла в опухолевых клетках при раке желудка и толстого кишечника, % ($M\pm S.D.$)

Показатель	Локализация опухоли			
	Рак желудка (n=52)		Рак толстого кишечника (n=55)	
	С тканевой эозинофилией (n=25)	Без тканевой эозинофилии (n=27)	С тканевой эозинофилией (n=23)	Без тканевой эозинофилии (n=32)
p53	21,48±9,09	54,67±28,72	28,68±19,78	44,09±26,90
	F=30,51; p<0,05		F=5,45; p<0,05	
p21	16,04±6,84	12,96±7,09	17,26±6,46	13,72±7,91
	F=2,53; p>0,05		F=3,12; p>0,05	

Примечание: p – уровень статистической значимости различий между показателями у пациентов с эозинофилией и без; F – значение F-статистики по результатам дисперсионного анализа.

При изучении в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника экспрессии белка-регулятора клеточного цикла p21, настоящее исследование не показало достоверных различий ее уровня в зависимости от наличия тканевой эозинофилии ($F=2,53$; $p>0,05$ и $F=3,12$; $p>0,05$ соответственно) (Таблица 8) (Рисунки 19,20,21,22). 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 клетке [73, 75].

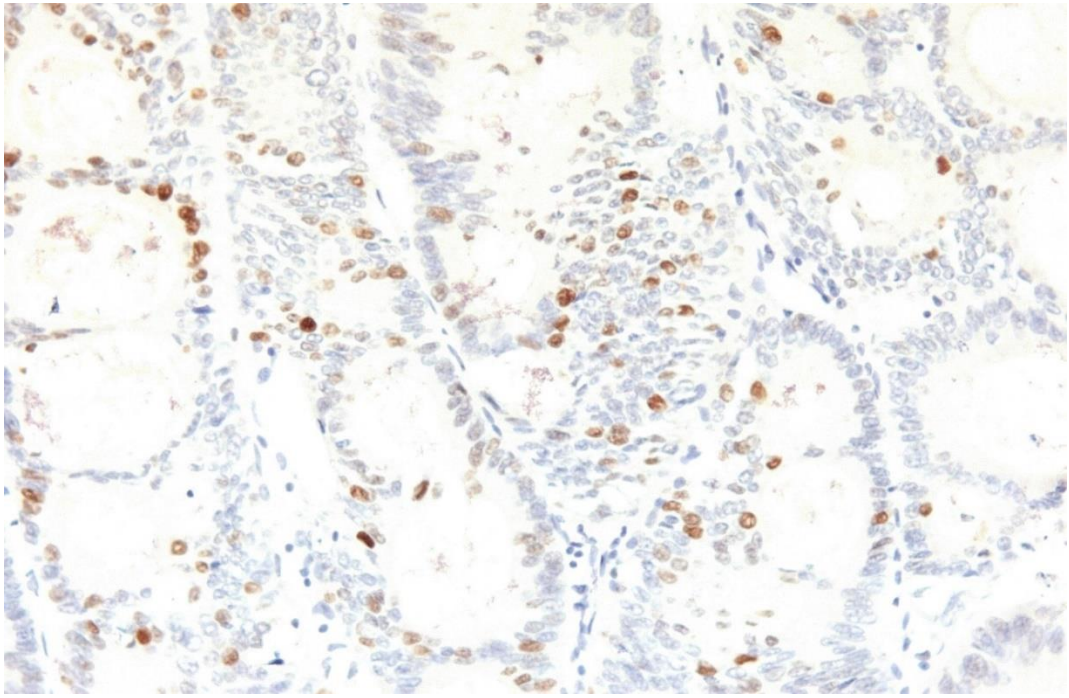


Рисунок 19. Рак желудка, сопровождающийся тканевой эозинофилией. Иммуногистохимическая реакция выявления белка p21 в ядрах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

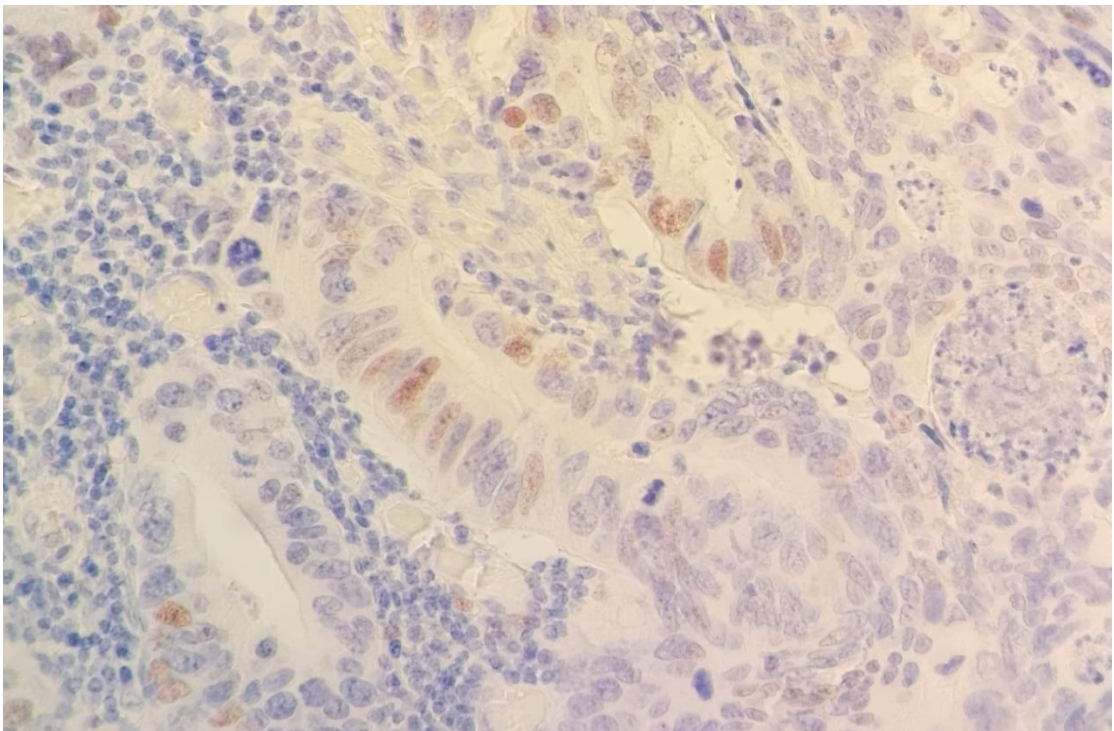


Рисунок 20. Рак желудка без эозинофилии. Иммуногистохимическая реакция выявления белка p21 в ядрах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

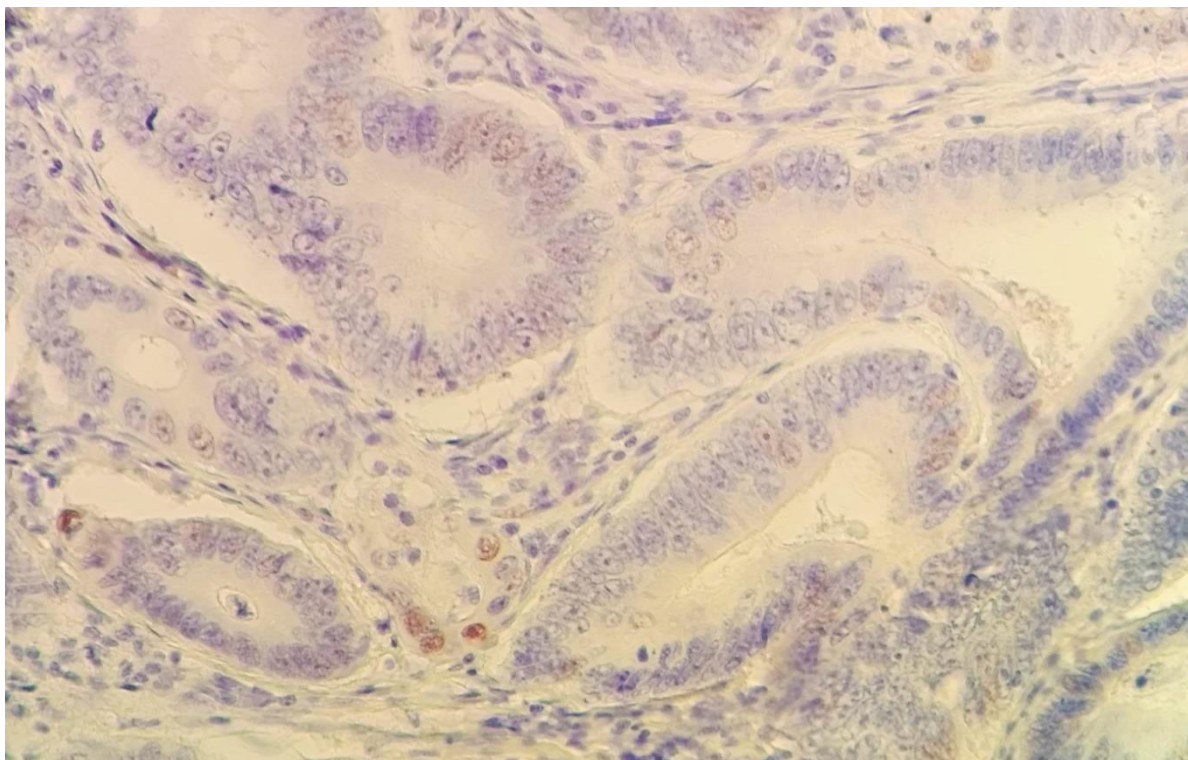


Рисунок 21. Рак ободочной кишки, сопровождающийся тканевой эозинофилией. Иммуногистохимическая реакция выявления белка p21 в ядрах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

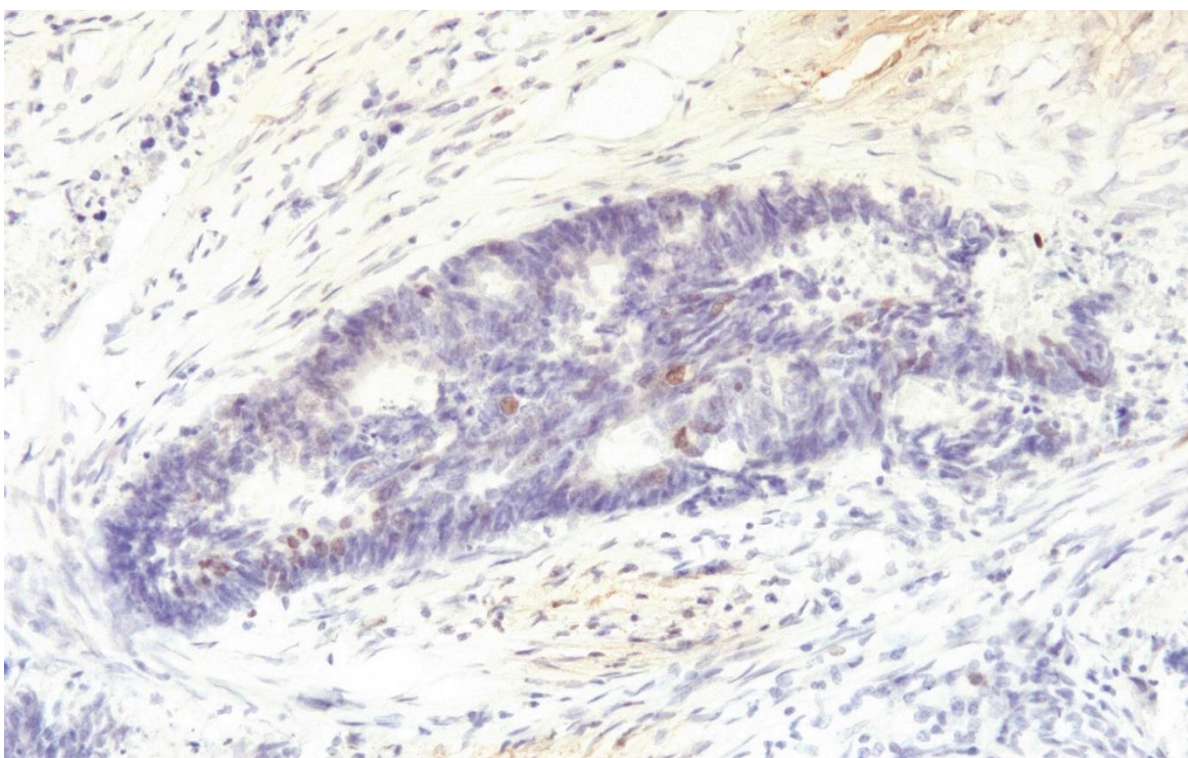


Рисунок 22. Рак ободочной кишки без эозинофилии. Иммуногистохимическая реакция выявления белка p21 в ядрах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

Поскольку экспрессия белка p21 находится под контролем белка p53, нами была проанализирована связь между экспрессией этих белков в тканях злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника. Оказалось, что при раке желудка и толстого кишечника, сопровождающемся тканевой эозинофилией, имеется 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).

Таким образом, рак желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией, характеризуется низкой экспрессией мутантного белка p53 (следовательно, в клетках функционирует белок дикого типа), сочетающейся с достаточной экспрессией белка p21 в ткани опухоли, что может указывать на возможное снижение пролиферативного потенциала трансформированных клеток и менее агрессивный характер течения опухолевого процесса.

3.4 Распределение генотипов и аллелей генов *TP53 (G215C)* и *CDKN1A (A1026G)* у больных раком желудка и толстого кишечника

В отличие от функционального аллельного полиморфизма генов, затрагивающего их промоторную область и обуславливающего изменение количества белка, экзонный полиморфизм генов приводит к структурной перестройке кодируемого белка. Так, наличие в экзонной области гена *TP53 (G215C)* аллеля *G* обуславливает синтез активно функционирующей формы белка p53, способной эффективно индуцировать апоптоз измененных и трансформированных клеток.

Среди больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией преобладали носители гомозиготного генотипа *GG* (72,0% и 69,2% соответственно) полиморфизма *G215C* гена *TP53*, реже встречался генотип *GC* (23,0% и 25,0% соответственно), наиболее редким оказался гомозиготный генотип *CC* (5,0% и 5,8%

соответственно) (Таблица 9). Анализ распределения полиморфных вариантов гена *TP53 (G215C)* при раке желудка и толстого кишечника позволил установить статистически значимые различия в зависимости от наличия эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани. У больных раком желудка и толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией гомозиготный генотип *GG* исследуемого полиморфизма встречался чаще (72,0% и 69,2% соответственно) по сравнению с аналогичными параметрами у пациентов без эозинофилии (54,0% и 51,8% соответственно), а гомозиготный генотип *CC* регистрировался, напротив, значительно реже. Статистический анализ также позволил выявить значимые различия в распределении аллелей полиморфизма *G215C* гена *TP53* у больных раком желудка и толстого кишечника с эозинофилией относительно аналогичных параметров у пациентов без эозинофилии ($\chi^2=7,32$ и $\chi^2=8,57$ соответственно, $p_2<0,05$).

Таблица 9

Распределение генотипов и аллелей гена *TP53 (G215C)* у больных раком желудка и толстого кишечника (в абсолютных числах и %)

Группы сравнения	<i>TP53 (G215C)</i>						
	Генотипы			p_1	Аллели		p_2
	GG	GC	CC		G	C	
Больные раком желудка с эозинофилией (n=100)	72 (72,0%)	23 (23,0%)	5 (5,0%)	<0,05 $\chi^2=7,36$	167 (83,5%)	33 (16,5%)	<0,05 $\chi^2=7,32$
Больные раком желудка без эозинофилии (n=113)	61 (54,0%)	42 (37,2%)	10 (8,8%)		164 (72,6%)	62 (27,4%)	
Больные раком толстого кишечника с эозинофилией (n=104)	72 (69,2%)	26 (25,0%)	6 (5,8%)	<0,05 $\chi^2=7,38$	170 (81,7%)	38 (18,3%)	<0,05 $\chi^2=8,57$

Больные раком толстого кишечника без эозинофилии (n=110)	57 (51,8%)	39 (35,5%)	14 (12,7%)		153 (69,5%)	67 (30,5%)	
--	---------------	---------------	---------------	--	----------------	---------------	--

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий частоты генотипов между группами больных; p_2 – уровень статистической значимости различий частоты аллелей между группами больных; χ^2 – критерий Хи-квадрат Пирсона.

У больных раком желудка и толстого кишечника выявлена 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 исследовании полиморфизма *A1026G* гена *CDKN1A* у всех больных раком желудка и толстого кишечника независимо от наличия эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани было установлено преобладание аллеля *A* и гомозиготного генотипа *AA* (Таблица 10).

Таблица 10

Распределение генотипов и аллелей гена *CDKN1A (A1026G)* у больных раком желудка и толстого кишечника (в абсолютных числах и %)

Группы сравнения	<i>CDKN1A (A1026G)</i>						
	Генотипы			p_1	Аллели		p_2
	AA	AG	GG		A	G	
Больные раком желудка с эозинофилией (n=100)	62 (62,0%)	31 (31,0%)	7 (7,0%)	$>0,05$ $\chi^2=3,07$	155 (77,5%)	45 (22,5%)	$>0,05$ $\chi^2=3,49$
Больные раком желудка без эозинофилии (n=113)	58 (51,3%)	41 (36,3%)	14 (12,4%)		157 (69,5%)	69 (30,5%)	
Больные раком толстого кишечника с эозинофилией (n=104)	65 (62,5%)	34 (32,7%)	5 (4,8%)	$>0,05$ $\chi^2=2,28$	164 (78,8%)	44 (21,2%)	$>0,05$ $\chi^2=1,88$

Больные раком толстого кишечника без эозинофилии (n=110)	62 (56,4%)	37 (33,6%)	11 (10,0%)		161 (73,2%)	59 (26,8%)	
--	---------------	---------------	---------------	--	----------------	---------------	--

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий частоты генотипов между группами больных; p_2 – уровень статистической значимости различий частоты аллелей между группами больных; χ^2 – критерий Хи-квадрат Пирсона.

В группах больных раком желудка и толстого кишечника с эозинофилией носители генотипа *AA* встречались чаще (62,0% и 62,5% соответственно), чем среди пациентов без эозинофильной инфильтрации ткани опухоли (51,3% и 56,4% соответственно). Однако различия в распределении генотипов полиморфизма *A1026G* гена *CDKN1A* между группами пациентов с эозинофилией и без таковой не достигли статистически значимого уровня ($\chi^2=3,07$ и $\chi^2=2,28$ соответственно, $p_1>0,05$). Частота встречаемости аллелей данного полиморфного участка у больных раком желудка и толстого кишечника с эозинофилией и без эозинофильной инфильтрации опухоли была практически сопоставимой, а проведенный статистический анализ не позволил выявить значимых различий в распределении аллелей ($\chi^2=3,49$ и $\chi^2=1,88$ соответственно, $p_2>0,05$).

3.5 Экспрессия рецепторов VEGFR и EGFR в опухолевой ткани у больных раком желудка и толстого кишечника

Экспрессия опухолевыми клетками рецепторов к эндотелиальному (VEGF) и эпидермальному (EGF) факторам роста (VEGFR и EGFR) отражает способность опухолевых клеток воспринимать сигналы, индуцирующие их рост и пролиферацию. Источником ростовых факторов являются клетки внутри- и околоопухолевого микроокружения, в том числе эозинофильные гранулоциты.

Взаимодействие VEGF и EGF с одноименными рецепторами на клетках опухолей может способствовать опухолевой прогрессии. В настоящем исследовании мы проводили оценку экспрессии VEGFR и EGFR на клетках злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника, сопровождающихся эозинофильной инфильтрацией и без нее.

По результатам иммуногистохимического исследования, в образцах тканей злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника не зависимо от наличия тканевой эозинофилии в опухолевых клетках обнаруживалась положительная реакция на VEGFR (Рисунки 23, 24).

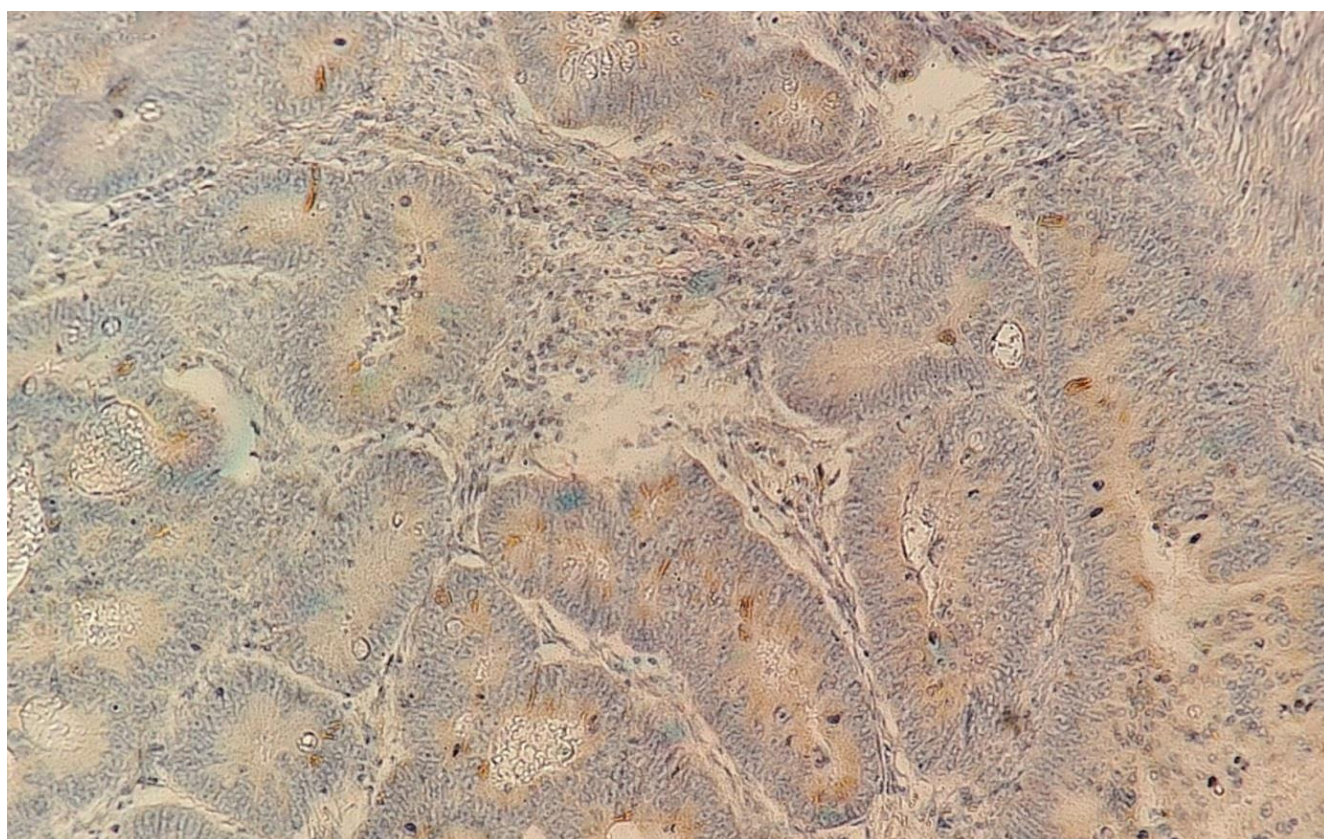


Рисунок 23. Рак ободочной кишки, сопровождающийся эозинофилией. Иммуногистохимическая реакция выявления VEGFR на мембранах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

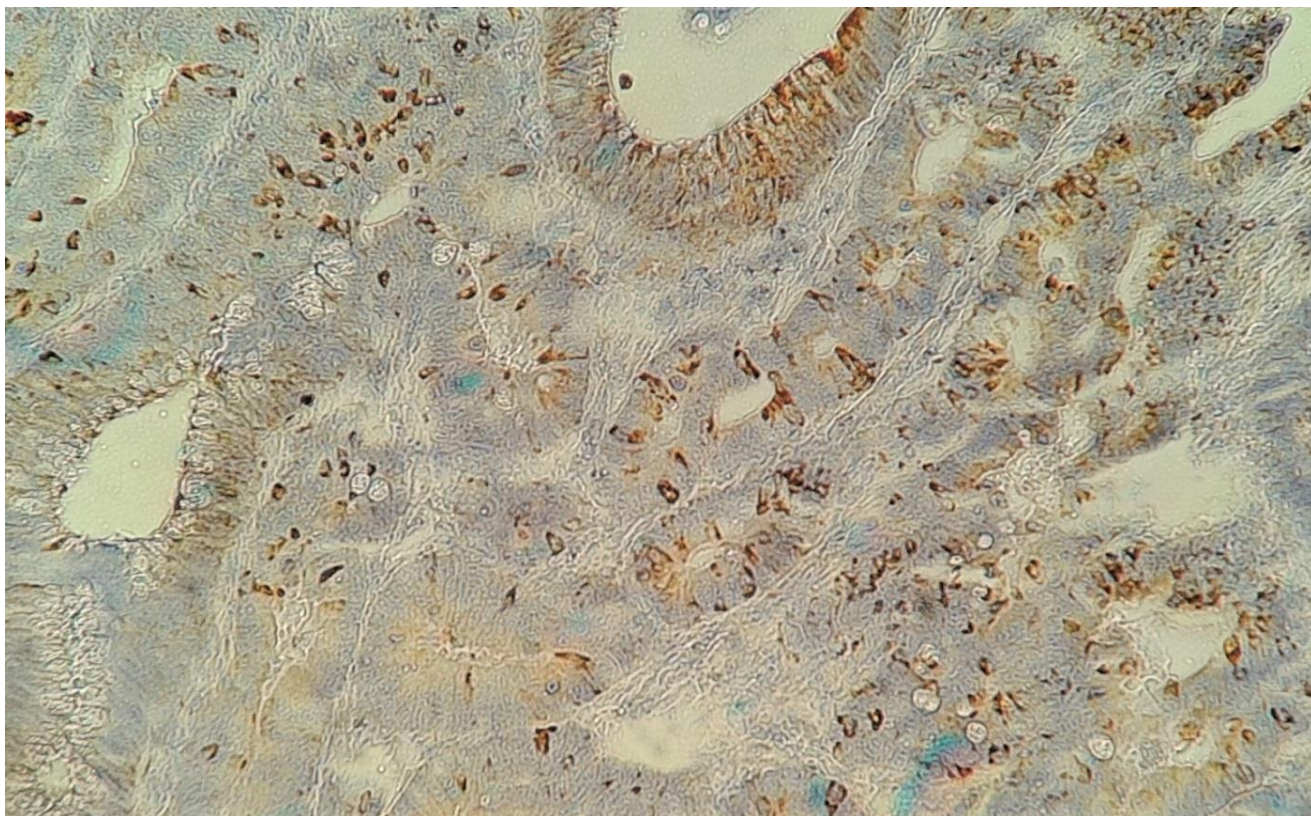


Рисунок 24. Рак ободочной кишки без эозинофилии. Иммуногистохимическая реакция выявления VEGFR на мембранах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

Различия уровня экспрессии VEGFR при раке желудка и толстого кишечника в зависимости от наличия эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани не достигали статистически значимого уровня ($F=0,02$; $p>0,05$ и $F=0,01$; $p>0,05$ соответственно) (Таблица 11).

Экспрессия VEGFR и EGFR в опухолевой ткани при раке желудка и толстого кишечника, % (M±S.D.)

Показатель	Локализация опухоли			
	Рак желудка (n=52)		Рак толстого кишечника (n=55)	
	С тканевой эозинофилией (n=25)	Без тканевой эозинофилии (n=27)	С тканевой эозинофилией (n=23)	Без тканевой эозинофилии (n=32)
VEGFR	13,20±8,47	12,81±10,43	15,22±9,34	14,87±12,37
	F=0,02; p>0,05		F=0,01; p>0,05	
EGFR	9,16±4,62	23,15±12,72	12,65±9,92	20,19±11,42
	F=26,69; p<0,05		F=6,49; p<0,05	

Примечание: p – уровень статистической значимости различий между показателями у пациентов с эозинофилией и без; F – значение F-статистики по результатам дисперсионного анализа.

При оценке экспрессии EGFR учитывалась также мембранная экспрессия этого рецептора на опухолевых клетках (Рисунки 25, 26, 27, 28).

Анализ результатов иммуногистохимического исследования экспрессии EGFR показал, что в образцах тканей рака желудка, сопровождающегося тканевой эозинофилией, процент опухолевых клеток, несущих на своей поверхности данный рецептор, оказался в 2,6 раза ниже такового в образцах без эозинофилии (F=26,69; p<0,05) (Таблица 11). Схожие результаты были получены в отношении экспрессии EGFR в злокачественных новообразованиях толстого кишечника: экспрессия EGFR клетками опухолей, сопровождающихся тканевой эозинофилией, была ниже соответствующего параметра в опухолевой ткани без эозинофилии (F=6,49; p<0,05).

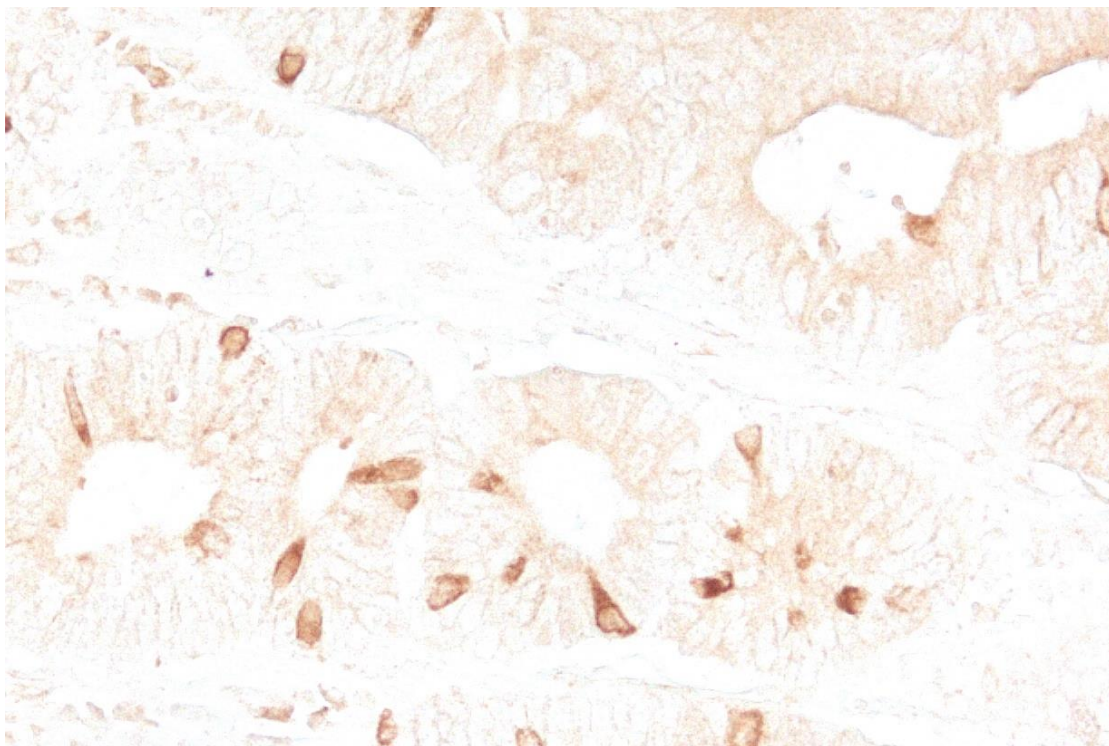


Рисунок 25. Рак желудка, сопровождающийся эозинофилией. Иммуногистохимическая реакция выявления EGFR на мембранах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 400.

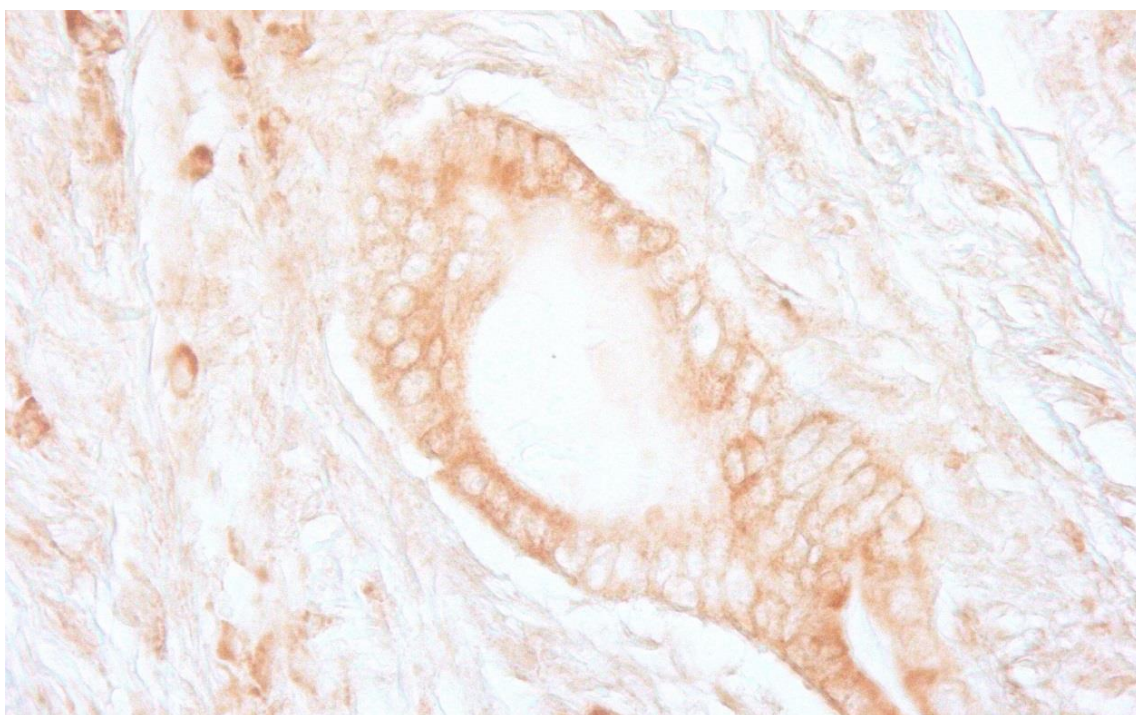


Рисунок 26. Рак желудка без эозинофилии. Иммуногистохимическая реакция выявления EGFR на мембранах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 400.

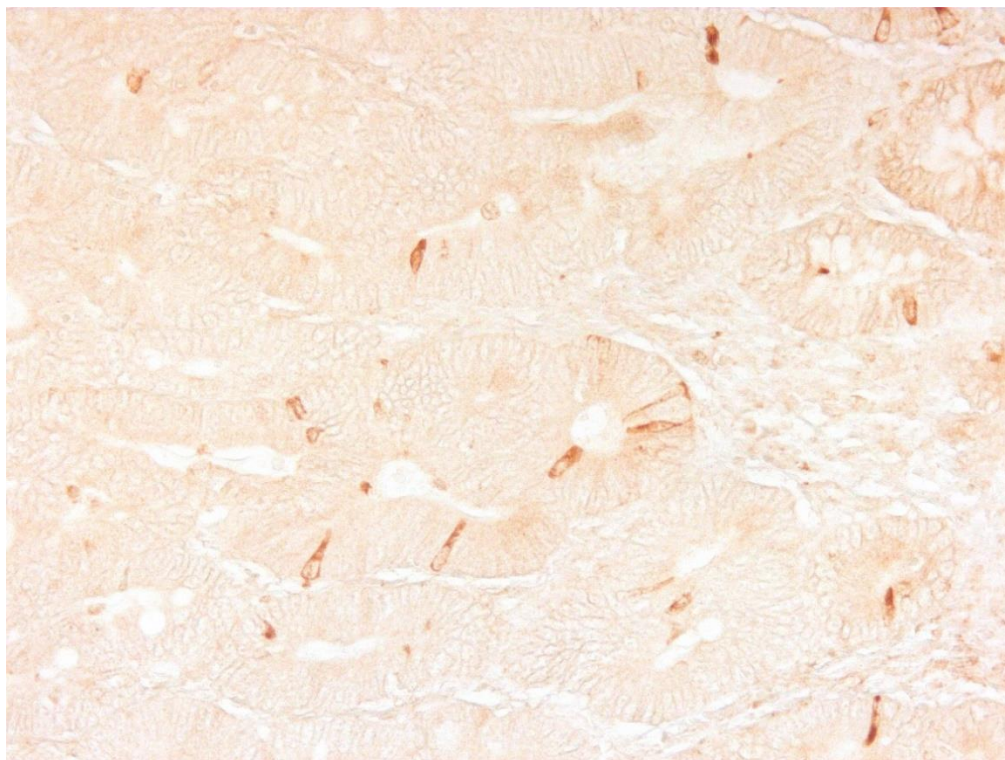


Рисунок 27. Рак ободочной кишки, сопровождающийся эозинофилией. Иммуногистохимическая реакция выявления EGFR на мембранах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

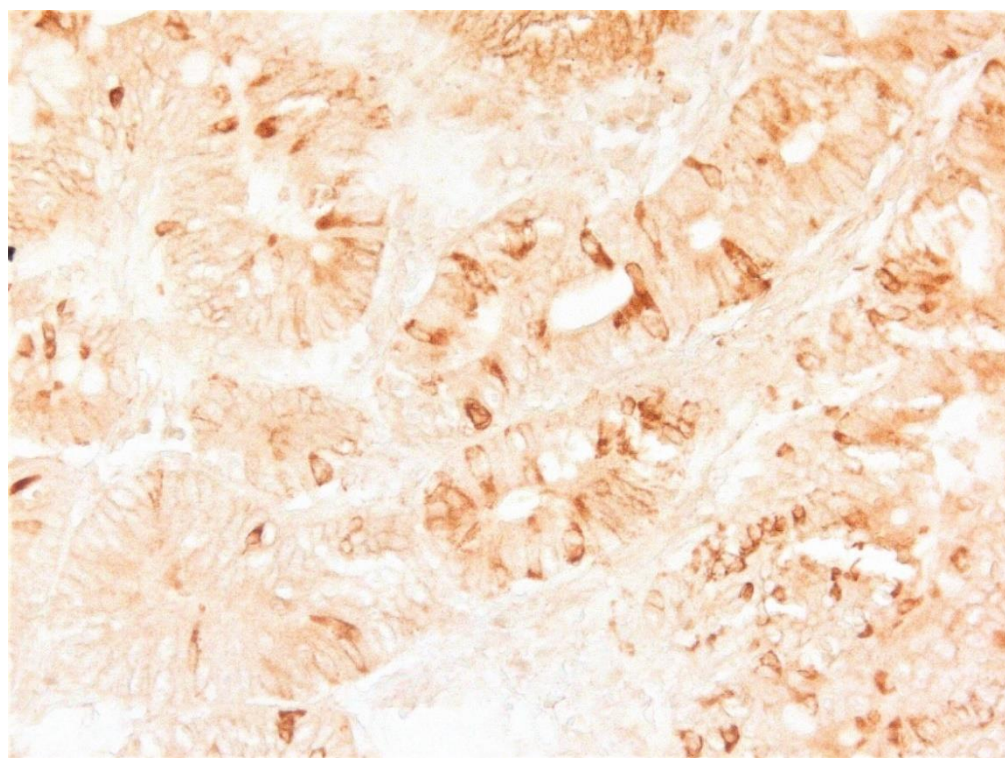


Рисунок 28. Рак ободочной кишки без эозинофилии. Иммуногистохимическая реакция выявления EGFR на мембранах опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200.

В целом, у больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией опухолевые клетки характеризуются более низкой экспрессией рецептора к EGF, который регулирует их пролиферацию и дифференцировку, что, по-видимому, может быть благоприятным признаком течения болезни.

3.6. Клинико-морфологическая характеристика опухолей у больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией

Клинико-морфологическая характеристика опухолей при онкологических заболеваниях 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.

У пациентов с раком желудка и толстого кишечника были проанализированы степень дифференцировки опухоли, наличие метастазов и показатель одногодичной летальности в зависимости от наличия эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани.

В результате гистологического исследования образцов опухолевой ткани в 89,4% случаях 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 умереннодифференцированными ($\chi^2=17,40$, $p<0,05$) (Таблица 12).

Распределение больных раком желудка и толстого кишечника по степени дифференцировки опухоли при раке желудка и толстого кишечника
(в абсолютных числах и %)

Степень дифференцировки опухоли	Локализация опухоли			
	Рак желудка (n=213)		Рак толстого кишечника (n=214)	
	С тканевой эозинофилией (n=100)	Без тканевой эозинофилии (n=113)	С тканевой эозинофилией (n=104)	Без тканевой эозинофилии (n=110)
Низкая	34 (34,0%)	49 (43,4%)	11 (10,6%)	38 (34,5%)
Высокая и умеренная	66 (66,0%)	64 (56,6%)	93 (89,4%)	72 (65,5%)
	$\chi^2=1,95; p>0,05$		$\chi^2=17,40; p<0,05; \varphi=0,285$	

Примечание: p – уровень статистической значимости различий между группами сравнения; χ^2 – критерий Хи-квадрат Пирсона; φ – критерий φ для оценки силы взаимосвязи между номинальными переменными.

При раке толстого кишечника установлена связь средней силы между тканевой эозинофилией и высокой и умеренной степенью дифференцировки опухоли ($\varphi=0,285$). 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 высокой и умеренной степени дифференцировки (66,0% и 56,6% соответственно).

При оценке состояния регионарных лимфатических узлов только у 17% больных раком желудка, сопровождающимся эозинофильной инфильтрацией опухоли, были диагностированы лимфогенные метастазы (Таблица 13).

Частота встречаемости метастазов в регионарных лимфатических узлах при раке желудка и толстого кишечника (в абсолютных числах и % случаев)

Статус регионарных лимфатических узлов	Локализация опухоли			
	Рак желудка (n=213)		Рак толстого кишечника (n=214)	
	С тканевой эозинофилией (n=100)	Без тканевой эозинофилии (n=113)	С тканевой эозинофилией (n=104)	Без тканевой эозинофилии (n=110)
N0	83 (83,0%)	76 (67,3%)	88 (84,6%)	87 (79,1%)
N+	17 (17,0%)	37 (32,7%)	16 (15,4%)	23 (20,9%)
	$\chi^2=6,95; p<0,05; \phi=0,181$		$\chi^2=1,09; p>0,05$	

Примечание: p – уровень статистической значимости различий между группами сравнения; χ^2 – критерий Хи-квадрат Пирсона; ϕ – критерий ϕ для оценки силы взаимосвязи между номинальными переменными.

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 ($\phi=0,181, p<0,05$). Частота встречаемости метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у больных раком толстого кишечника как с эозинофилией, так и без нее была сопоставимой. Метастазы были выявлены в 15,4% случаев рака толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией опухоли и в 20,9% случаев рака толстого кишечника без эозинофилии ($\chi^2=1,09, p>0,05$).

Показатель одногодичной летальности характеризует долю пациентов, умерших в течение года с момента установления диагноза. 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 на 4% ниже соответствующих показателей у пациентов без эозинофилии (Таблица 14).

Распределение больных раком желудка и толстого кишечника по продолжительности жизни после постановки диагноза (в абсолютных числах и % случаев)

Продолжительность жизни пациентов	Локализация опухоли			
	Рак желудка (n=213)		Рак толстого кишечника (n=214)	
	С тканевой эозинофилией (n=100)	Без тканевой эозинофилии (n=113)	С тканевой эозинофилией (n=104)	Без тканевой эозинофилии (n=110)
Более 1 года с момента постановки диагноза	86 (86,0%)	93 (82,3%)	95 (91,4%)	96 (87,3%)
Менее 1 года с момента постановки диагноза	14 (14,0%)	20 (17,7%)	9 (8,6%)	14 (12,7%)
	$\chi^2=0,54; p>0,05$		$\chi^2=0,92; p>0,05$	

Примечание: p – уровень статистической значимости различий между группами больных; χ^2 – критерий Хи-квадрат Пирсона.

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

Таким образом, эозинофильная инфильтрация регистрируется преимущественно в высоко- и умереннодифференцированных опухолях (при раке толстого кишечника), без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов (при раке желудка), характеризуется тенденцией к снижению показателя одногодичной летальности пациентов, т.е. ассоциирована с более благоприятными клинико-морфологическими характеристиками опухолевого процесса.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проблема ранней диагностики и своевременного лечения опухолей желудочно-кишечного тракта актуализирует необходимость детального изучения молекулярных механизмов развития злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника. Последние могут отличаться клинико-морфологическими, генетическими и молекулярными признаками, которые обуславливают тактику лечения пациентов и влияют на прогноз заболевания.

Важной характеристикой опухоли является состав и состояние ее микроокружения, которое выполняет модулирующую функцию. В состав опухолевого микроокружения могут входить фибробласты, лимфоциты, макрофаги, эозинофилы и другие клетки [38]. Опухолевые клетки находятся в постоянной кооперации с элементами микроокружения, они могут высвобождать во внеклеточную среду различные регуляторные молекулы и тем самым влиять на состав клеток, инфильтрирующих опухоль. Опухолевые клетки могут усиливать ангиогенез и повышать проницаемость микрососудов в ткани новообразования. В свою очередь, клетки, окружающие опухоль, могут также влиять на ее рост и развитие [153].

В составе околоопухолевого и внутриопухолевого воспалительного инфильтрата весьма часто обнаруживаются эозинофильные гранулоциты [52]. Этот факт стал основой активного изучения эозинофилов крови и тканей в патогенезе опухолевого процесса [95, 121]. Эозинофилы играют важную роль в норме и при различных заболеваниях. Эти клетки участвуют в воспалении инфекционной и неинфекционной природы, являются модификаторами врожденного и приобретенного иммунитета [156]. Зарубежными и отечественными исследователями описаны новые функции эозинофилов, их сложный рецепторный аппарат и состав секреторных гранул [10, 40, 97]. Однако до сих пор отсутствуют четкие представления о механизмах развития опухолеассоциированной тканевой

эозинофилии, неоднозначны сведения литературы о межклеточной кооперации эозинофильных гранулоцитов и опухолевых клеток [156].

При формировании групп исследования в нашей работе мы проанализировали 650 гистологических препаратов, среди которых тканевая эозинофилия была зарегистрирована у 34,0% больных раком желудка и 29,2% раком толстого кишечника до начала проведения специфической лучевой и лекарственной терапии. Результаты, полученные нами в ходе исследования, не противоречат сведениям литературы, согласно которым частота встречаемости тканевой эозинофилии колеблется в широких пределах [54, 112]. Так S. Kiziltas et al. (2008) приводят данные об обнаружении умеренной тканевой эозинофилии у 24,4% пациентов со злокачественными новообразованиями толстого кишечника и об отсутствии случаев интенсивной эозинофильной инфильтрации [54]. В свою очередь, по данным L. Narbaum et al. (2015), интратуморальная эозинофилия встречается в 75% образцов колоректального рака [112]. В этом исследовании пациентам проводилась химиотерапия, что могло отразиться на частоте и выраженности эозинофильной реакции при раке толстого кишечника.

Известно, что механизм эозинофильной инфильтрации опухоли при онкологических заболеваниях, исключая неопластическую трансформацию самих эозинофилов, обусловлен способностью опухолевых клеток продуцировать факторы, активирующие эозинофилы [6]. В то же время, тканевая эозинофилия может представлять собой своеобразный ответ макроорганизма на присутствие опухолевой ткани [61].

Привлечение эозинофильных гранулоцитов в желудочно-кишечный тракт и другие органы осуществляется при участии хемокинов. Ключевым фактором хемотаксиса эозинофилов в ткани является эотаксин-1 (CCL11), действующий через специфический рецептор CCR3 [10, 68]. CCL11 относится к семейству CC-хемокинов и способен активировать G-белок-зависимые внутриклеточные сигнальные каскады эозинофилов, опосредующие миграцию клеток. Наряду с выраженными хематтрактантными свойствами, эотаксин-1 способен также усиливать мобилизацию эозинофильных гранулоцитов из костного мозга,

обуславливая увеличение их числа в периферической крови. По данным литературы, изменение секреции CCL11 и экспрессии CCR3 может лежать в основе развития тканевой эозинофилии при заболеваниях различной природы [10, 50].

В нашей работе мы провели исследование молекулярно-генетических механизмов формирования опухолеассоциированной тканевой эозинофилии. Мы проанализировали взаимосвязь между экспрессией CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани при раке желудка и толстого кишечника и наличием тканевой эозинофилии, а также провели оценку полиморфизма генов ключевых эозинофил-активирующих цитокинов и их рецепторов.

По результатам иммуногистохимического исследования CCL11 обнаруживался в цитоплазме опухолевых клеток во всех исследованных образцах. Однако при раке желудка и раке толстого кишечника с эозинофилией количество CCL11-экспрессирующих опухолевых клеток в несколько раз превышало соответствующий параметр при раке желудка и раке толстого кишечника без нее (Рисунок 29). Установленный нами факт экспрессии CCL11 самими опухолевыми клетками желудка и толстого кишечника подтверждает способность трансформированных клеток высвобождать хемотаксические факторы, привлекающие в зону опухолевого поражения эозинофилы. Секретируемый опухолевыми клетками, CCL11 способен индуцировать не только хемотаксис, но и дегрануляцию эозинофилов, а также продукцию ими активных форм кислорода [127]. Во многих экспериментах *in vitro* продемонстрировано, что эозинофильные цитотоксические протеины оказывают повреждающее действие на клетки новообразований [89, 128].

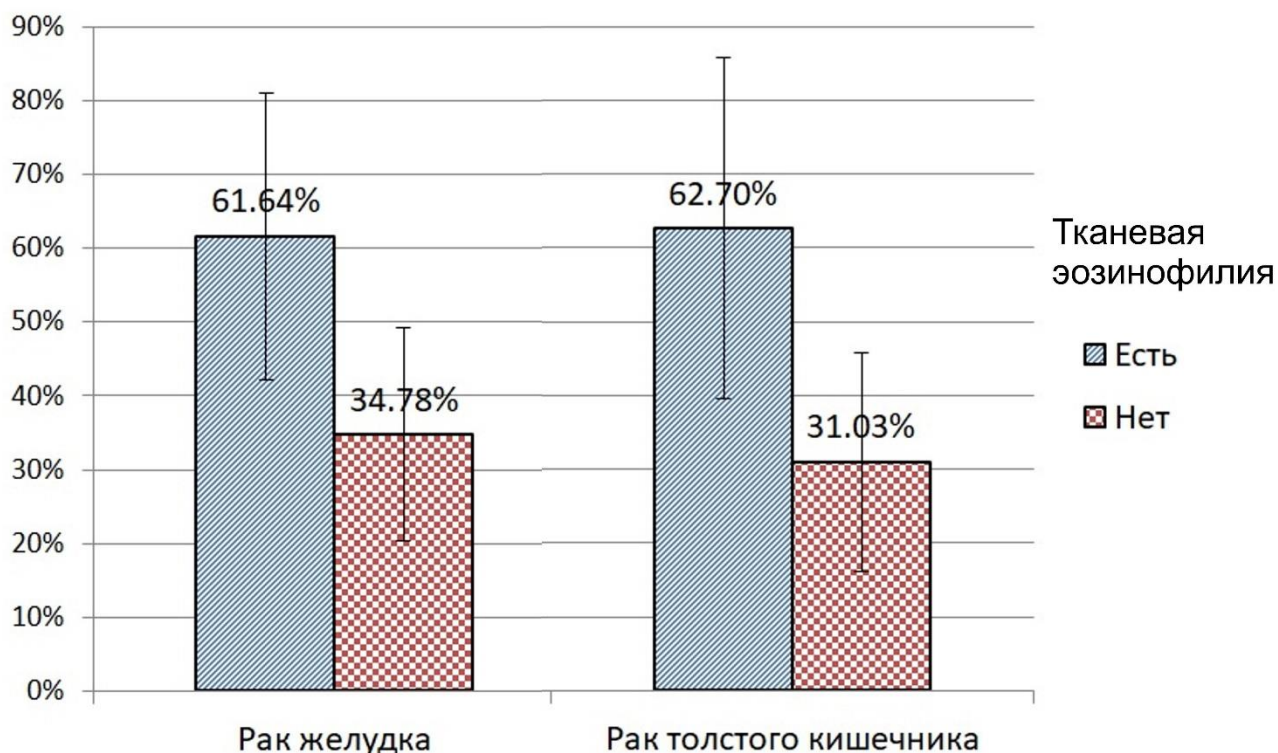


Рисунок 29. Относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих CCL11 при раке желудка и толстого кишечника, % (среднее значение и стандартное квадратическое отклонение).

Следует отметить, что при изучении экспрессии CCL11 в опухолевой ткани положительная реакция была зарегистрирована в цитоплазме отдельных клеток опухолевого микроокружения. Известно, что клетки околоопухолевого инфильтрата, а именно, тучные клетки, макрофаги, «здоровые» эпителиальные клетки и др. способны секретировать CCL11, особенно, в ответ на стимуляцию провоспалительными цитокинами, TNF α , IL-3, C5a компонента комплемента [127]. В то же время, по данным зарубежных авторов, основным источником эотаксина-1 являются эозинофильные гранулоциты, способные к аутоактивации [156]. Секреция CCL11 тканевыми эозинофилами обосновывает существование механизма аутокринной регуляции хемотаксиса эозинофилов.

Известно, что CCL11 выполняет свою функцию, связываясь с рецептором CCR3 [10, 147], который присутствует в основном на мембране эозинофильных гранулоцитов [50, 82].

В результате проведенного нами исследования рецептор к эотаксину-1 был обнаружен в клетках инфильтративного компонента всех исследованных опухолей желудка и толстого кишечника. При этом у больных раком желудка с тканевой эозинофилией количество клеток опухолевого микроокружения, несущих CCR3, в 2,0 раза превышало соответствующий параметр у пациентов с раком желудка без эозинофилии. Полученные нами результаты согласуются с работами других исследователей, которые рассматривают CCR3 в качестве основного патогенетического фактора развития тканевой и гемической эозинофилии при заболеваниях различной природы [10]. Посредством связывания со своим рецептором CCL11 реализует два основных эффекта: активацию хемотаксиса и дегрануляции эозинофилов. В экспериментальных исследованиях показано отсутствие рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в нормальную ткань у CCR3-дефицитных мышей [147].

Таким образом, опухолевые клетки злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника способны самостоятельно продуцировать CCL11, что опосредует привлечение CCR3-экспрессирующих эозинофильных гранулоцитов в опухолевую ткань.

Анализируя возможные причины гиперэкспрессии рецептора к эотаксину-1 клетками опухолевого микроокружения и, принимая во внимание другие факторы, обуславливающие возникновение тканевой эозинофилии, следует учитывать генетически детерминированный характер секреции цитокинов и их рецепторов [82, 99]. Существуют различные описания ассоциаций полиморфных вариантов генов цитокинов и их рецепторов с особенностями экспрессии кодируемых ими продуктов и наличием предрасположенности к определенным болезням [10, 17, 21, 82, 99, 100, 114, 149, 166]. Аллельный полиморфизм генов, в норме существующих в популяции, определяет количество и активность белкового продукта.

В нашей работе, 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.

Изученные нами полиморфизмы располагаются в некодируемых областях генов и, следовательно, не изменяют последовательность аминокислот в соответствующем белковом продукте. Аллельный полиморфизм в промоторной области гена может влиять лишь на скорость транскрипции и стабильность мРНК, что приводит к изменению содержания или уровня активности белка. Согласно данным литературы носительство определенных аллелей и генотипов гена *CCL11* и гена *CCR3* обуславливает повышенную экспрессию эотаксина-1 и его рецептора клетками организма [37, 82, 166].

При исследовании полиморфизма *A384G* гена *CCL11* у всех больных раком желудка и толстого кишечника наиболее часто регистрируется 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. В то время как многими исследователями показана положительная ассоциация аллеля *G* и генотипа *GG* полиморфизма (*A-384G*) гена *CCL11* с развитием эозинофилии при различных заболеваниях [10]. По данным К.А. Attab et al. (2008), наличие аллеля *G* в позиции -384 гена *эотаксина-1* ассоциировано с повышенной продукцией *CCL11* тканевыми элементами при бронхиальной астме [37]. Другие авторы показали ассоциацию аллеля *G* полиморфного сайта *A384G* с развитием рака толстого кишечника и, напротив, низким сывороточным уровнем эотаксина-1 [32].

Следует отметить, что оценка аллельного полиморфизма (*A384G*) гена *CCL11* проводилась нами на образцах нормальной ткани, полученной с границы резекции опухоли, в то время как гиперэкспрессия *CCL11* была зарегистрирована в злокачественно трансформированных клетках желудка и толстого кишечника. Известно, что опухолевые клетки характеризуются нестабильностью генома и высокой вероятностью возникновения мутаций в ДНК. Высокая экспрессия *CCL11* опухолевыми клетками желудка и толстого кишечника в сочетании с тканевой эозинофилией, вероятно, опосредована изменениями, происходящими в самих опухолевых клетках, и не связана с аллельным полиморфизмом *A384G* гена *CCL11*.

Как уже упоминалось ранее, эотаксин-1 осуществляет свое действие при взаимодействии со специфическим рецептором *CCR3*. В промоторной области гена *CCR3* идентифицированы более восьми полиморфных сайтов в различных точках. Показано, что полиморфизмы *T520G* и *T51C* гена *CCR3* ассоциированы с развитием эозинофилии крови при бронхиальной астме [82]. По сведениям S.A. Al-Abdulhadi et al. (2010), полиморфизм *T51C* гена *CCR3* ассоциирован с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом, а также с рассеянным склерозом и хроническим гепатитом С [30].

В результате проведенного нами молекулярно-генетического исследования полиморфизма *T51C* гена *CCR3* было установлено, что у больных раком желудка и толстого кишечника, сопровождающегося тканевой эозинофилией, наиболее часто регистрируется гомозиготный по аллелю *C* генотип. Выявлена положительная ассоциация генотипа *CC* и аллеля *C* полиморфного сайта *T51C* гена *CCR3* с развитием эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани при раке желудка и толстого кишечника. Вместе с тем, нами показано увеличение риска возникновения тканевой эозинофилии при носительстве *C*-аллеля гена *CCR3* (*T51C*) у больных раком желудка в 1,69 раза, а у больных раком толстого кишечника в 1,87 раза. В свою очередь, при носительстве генотипа, гомозиготного по аллелю *C*, риск развития тканевой эозинофилии при раке желудка и раке толстого кишечника увеличивался в 2,71 и 2,49 раза, соответственно.

Следует отметить, что данные литературы, описывающие роль отдельных аллелей и генотипов генов *CCL11* и *CCR3* в формировании тканевой эозинофилии при патологии весьма немногочисленны. На примере бронхиальной астмы и атопического дерматита [37, 82, 166] показано, что аллель *G* и генотип *GG* (*A384G*) гена *CCL11* и аллель *C* и генотип *CC* полиморфизма *T51C* гена *CCR3* являются высокопродуцирующими и определяют генетически детерминированный характер эозинофилии при этих заболеваниях.

Наряду с эотаксином-1 главным фактором активации эозинофильных гранулоцитов является интерлейкин (IL) 5, который избирательно стимулирует образование эозинофилов из их коммитированного предшественника в костном

мозге, модулирует экспрессию рецепторных структур на клетках, усиливает хемотаксис эозинофилов в ткани с последующим высвобождением цитотоксических протеинов [10, 114]. Свое действие IL-5 оказывает, связываясь с комплементарным рецептором IL-5R, который экспрессируется эозинофилами крови и тканей [125].

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 [83, 107].

В промоторной области гена *IL5* идентифицировано множество полиморфных сайтов, среди которых наиболее хорошо изученным является функциональный полиморфизм *C703T* гена *IL5*. По данным литературы, функциональный полиморфизм гена *IL5* в положении 703 промоторной зоны, сопровождающийся заменой цитозина на тимин, сопряжен с развитием бронхиальной астмы и гемической эозинофилии [114]. N. Yamamoto et al. (2003) указывают на то, что данный полиморфизм обуславливает выраженность эозинофилии крови при atopическом дерматите [87]. При этом А.В. Карпова (2009) полагает, что фактором риска развития atopического дерматита является носительство, напротив, гомозиготного генотипа по аллелю *T* полиморфизма *C703T* гена *IL5*.

В результате проведенного нами исследования у всех пациентов с раком желудка и раком толстого кишечника было установлено изменение распределения аллельных вариантов полиморфизма *C703T* гена *IL5*, выражающееся в преобладании гомозиготного генотипа *CC* над гетерозиготным *CT* и гомозиготным *TT* генотипами. При этом носители генотипа *CC* и аллеля *C* данного полиморфизма гена *IL5* достоверно чаще встречались при раке желудка и толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией опухоли по сравнению с соответствующими частотами у пациентов без эозинофилии (Рисунки 30, 31). Статистический анализ показал наличие положительной ассоциации гомозиготного генотипа *CC*, а также аллеля *C* с тканевой эозинофилией у больных раком желудка и толстого кишечника. При исследовании влияния аллеля *C* полиморфизма *C703T* гена *IL5* на вероятность возникновения тканевой эозинофилии у пациентов с раком желудка и

толстого кишечника было показано, что риск развития эозинофилии у этих больных увеличен в 1,76 и 1,84 раза, соответственно. Носительство генотипа *CC* гена *IL5* (*C703T*) повышает вероятность развития тканевой эозинофилии при раке желудка в 1,83 раза, а при раке толстого кишечника – более чем в 2 раза.

Таким образом, нами показано определяющее значение полиморфизма гена *IL5* (*C703T*), а именно гомозиготного генотипа *CC* и аллеля *C*, в формировании эозинофилии при злокачественных новообразованиях желудка и толстого кишечника, что подтверждается результатами других отечественных и зарубежных исследований [17, 87, 114].

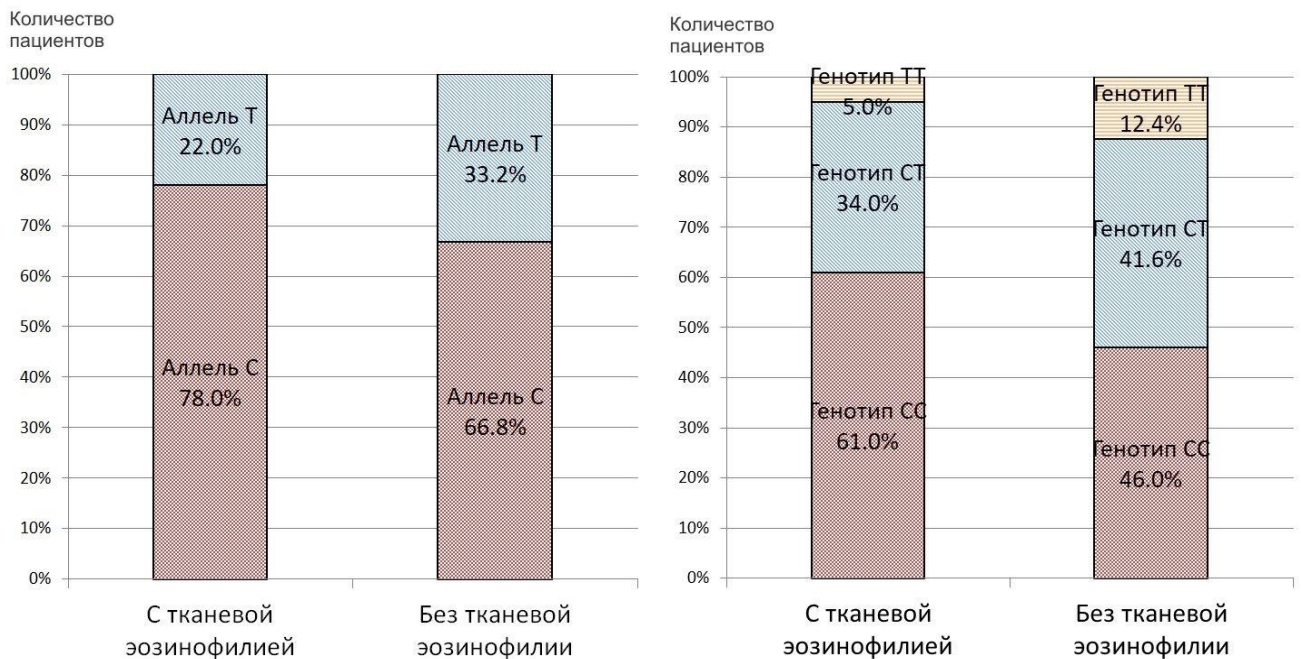


Рисунок 30. Распределение генотипов и аллелей полиморфизма *C703T* гена *IL5* у больных раком желудка.

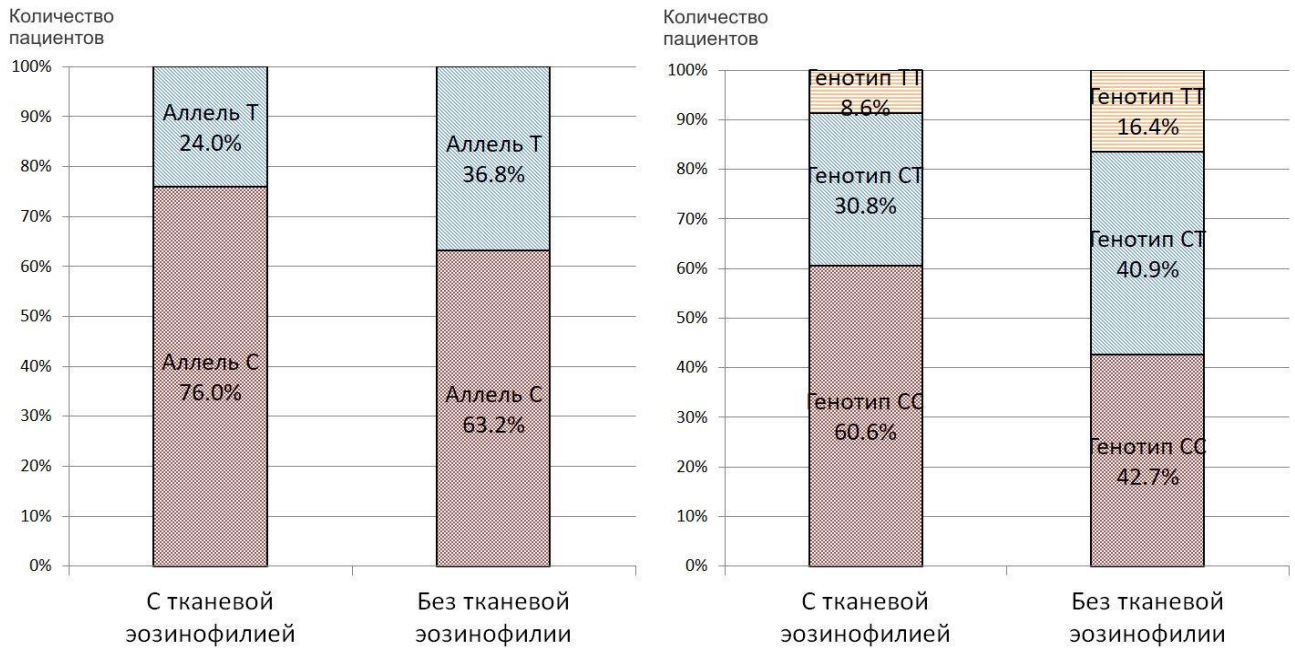


Рисунок 31. Распределение генотипов и аллелей полиморфизма *C703T* гена *IL5* у больных раком толстого кишечника.

Развитие гемической и тканевой эозинофилии может быть опосредовано не только увеличением секреции *IL5*, но и изменением экспрессии его рецептора на эозинофилах. Известно, что рецептор к *IL-5* состоит из α -цепи (внеклеточный домен, обозначаемый *IL-5RA*) и β -цепи, общей с *IL-3* и *GM-CSF*. Внеклеточный домен кодируется геном *IL5RA*, в промоторном регионе которого обнаружена единичная нуклеотидная замена гуанина на аденин в положении 80. Значение полиморфизма *G80A* гена *IL5RA* в отношении формирования эозинофилии при различных заболеваниях до сих пор не определено [17, 83, 100, 107]. Одни исследователи указывают на наличие ассоциации полиморфного сайта *G80A* гена *IL5RA* с развитием эозинофилии крови при бронхиальной астме и атопическом дерматите, и высокой экспрессией *IL-5RA* на эозинофильных гранулоцитах [107]. Другие авторы, напротив, постулируют отсутствие достоверной взаимосвязи между носительством аллеля *G* и генотипа *GG* полиморфизма *G80A* гена *IL5RA* с риском развития бронхиальной астмы, а также с высоким содержанием эозинофилов в крови [83].

При исследовании полиморфного сайта *G80A* гена *IL5RA* статистически

значимых различий в распределении аллелей и генотипов у больных раком желудка и толстого кишечника обнаружено не было. Иными словами, увеличение числа эозинофильных гранулоцитов в опухолевой ткани у больных раком желудка и толстого кишечника не зависит от присутствия гуанина или аденина в положении 80 промоторного региона гена *IL5RA*. Следует отметить, что схожие результаты были получены Ю.В. Колобовниковой и соавт. (2013), согласно которым у больных туберкулезом легких не было выявлено ассоциации гемической эозинофилии и повышенного содержания IL-5RA-позитивных эозинофилов в культуре *in vitro* с вариантом полиморфного сайта G80A гена *IL5RA*. По мнению авторов, увеличение числа эозинофилов, экспрессирующих IL-5RA, у больных туберкулезом легких с эозинофилией генетически не детерминировано, а является следствием активирующего влияния IL-5, обнаруживаемого в избыточном количестве в крови у этих пациентов.

Таким образом, тканевая эозинофилия при злокачественных новообразованиях желудка и толстого кишечника обуславливается 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.

Согласно данным литературы, наличие эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани связано с благоприятным прогнозом болезни, лучшей дифференцировкой опухоли, отсутствием сосудистой инвазии и увеличением показателя пятилетней выживаемости пациентов [34, 112, 116]. Так, у больных плоскоклеточным раком ротовой полости выраженная тканевая эозинофилия была ассоциирована с пятилетней безрецидивной выживаемостью в 72% случаев, тогда как умеренная тканевая эозинофилия и анэозинофилия были связаны с пятилетней

выживаемостью только у 44% и 32% больных соответственно [155]. Положительные признаки опухолевого процесса, ассоциированного с тканевой эозинофилией, связывают, как правило, с действием эозинофильных цитотоксических протеинов на клетки опухоли.

Вместе с тем, в современной литературе представлены данные о связи тканевой эозинофилии с неблагоприятным прогнозом, инвазией и ангиогенезом опухоли [34, 151]. По сведениям M. Jain et al. (2014), эозинофильная инфильтрация опухолевой ткани более выражена при раке полости рта, чем при ее дисплазии. Другие авторы предполагают, что эозинофильные гранулоциты влияют на процесс инвазии опухолевых клеток [34]. Схожие результаты получили S.J. Alrawi et al. (2005), отмечавшие более высокое количество эозинофильных гранулоцитов в составе инвазивной плоскоклеточной карциномы по сравнению с неинвазивными новообразованиями головы и шеи [152]. В последнем исследовании показано, что тканевая эозинофилия ассоциирована с низкой выживаемостью пациентов.

Вопрос о роли тканевых эозинофилов в механизмах опухолевого процесса в настоящее время остается открытым. В большинстве научных работ рассматривается прямое цитотоксическое действие эозинофильных гранулярных белков на опухолевые клетки [89, 128]. Показано, что эозинофилы проявляют цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток мастоцитомы мышей и клеточной линии В-лимфомы за счет высвобождения из гранул эозинофильной пероксидазы [26]. F. Legrand et al. (2010) проводили совместное культивирование эозинофилов с клеточной линией рака толстого кишечника Colo-205, в результате чего было зарегистрировано высвобождение эозинофильного катионного белка, нейротоксина, TNF α и гранзима А [89]. Авторы утверждают, что эозинофилы, являясь короткоживущими клетками, погибают вследствие дегрануляции.

Наряду с этим, в литературе описаны различные рецепторные структуры ($\gamma\delta$ TCR/CD3, CD244 и др.) и регуляторные молекулы, посредством которых эозинофильные гранулоциты могут участвовать в противоопухолевом ответе макроорганизма [89, 62].

Примером регуляторных молекул, экспрессируемых эозинофилами, являются галектины, которые представляют собой β -галактозид-связывающие белки, объединенные в одну группу согласно гомологии их углевод-распознающего домена. Галектины способны действовать на клетки через запуск факторов сигнальной трансдукции и активацию белков-регуляторов клеточного цикла, что влияет на баланс апоптоза и пролиферации в нормальных и опухолевых клетках [62].

Ключевым регулятором клеточного цикла является белок p53, который выполняет супрессорную функцию в отношении опухолевой трансформации путем подавления деления клеток и стимуляции апоптоза [15, 24]. Белок p53 играет роль транскрипционного фактора для многих генов, в том числе для генов белков-регуляторов клеточного цикла p21 и p27 [144].

Считается, что самым распространенным молекулярным изменением в опухолевых клетках является инактивация белка p53 [5], вызванная появлением миссенс-мутаций гена *TP53*, приводящих к изменениям в аминокислотной последовательности белка [5]. Мутантная форма белка p53 не проявляет функциональную активность, характерную для белка дикого типа, и может инактивировать продукт, синтезируемый с неповрежденного аллеля. Клетки, содержащие неправильный белок p53, характеризуются генетической нестабильностью, низкой чувствительностью к внутриклеточным инактивирующим агентам, развитием устойчивости к неблагоприятным условиям микроокружения [5]. Исследование белка p53 в ядрах опухолевых клеток методом иммуногистохимии позволяет обнаружить именно мутантную форму белка. Гиперэкспрессия мутантного белка p53 свидетельствует о нарушении процессов клеточного деления и апоптоза. Высокая экспрессия мутантной формы белка p53 ассоциирована с агрессивным течением заболевания и нечувствительностью опухоли к действию противоопухолевых агентов [5, 9, 75]. Уровень экспрессии данного белка позволяет судить о темпах роста опухоли и способности опухолевых клеток к инвазии и образованию очагов метастазирования [5, 9].

В нашем исследовании мы изучили экспрессию мутантного белка p53 в ядрах опухолевых клеток желудка и толстого кишечника в ассоциации с тканевой эозинофилией. Так, при раке желудка и толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией количество опухолевых клеток, экспрессирующих мутантный белок p53, оказалось в 2,5 и 1,5 раза соответственно ниже аналогичных параметров у больных раком желудка и толстого кишечника без эозинофилии (Рисунок 32).

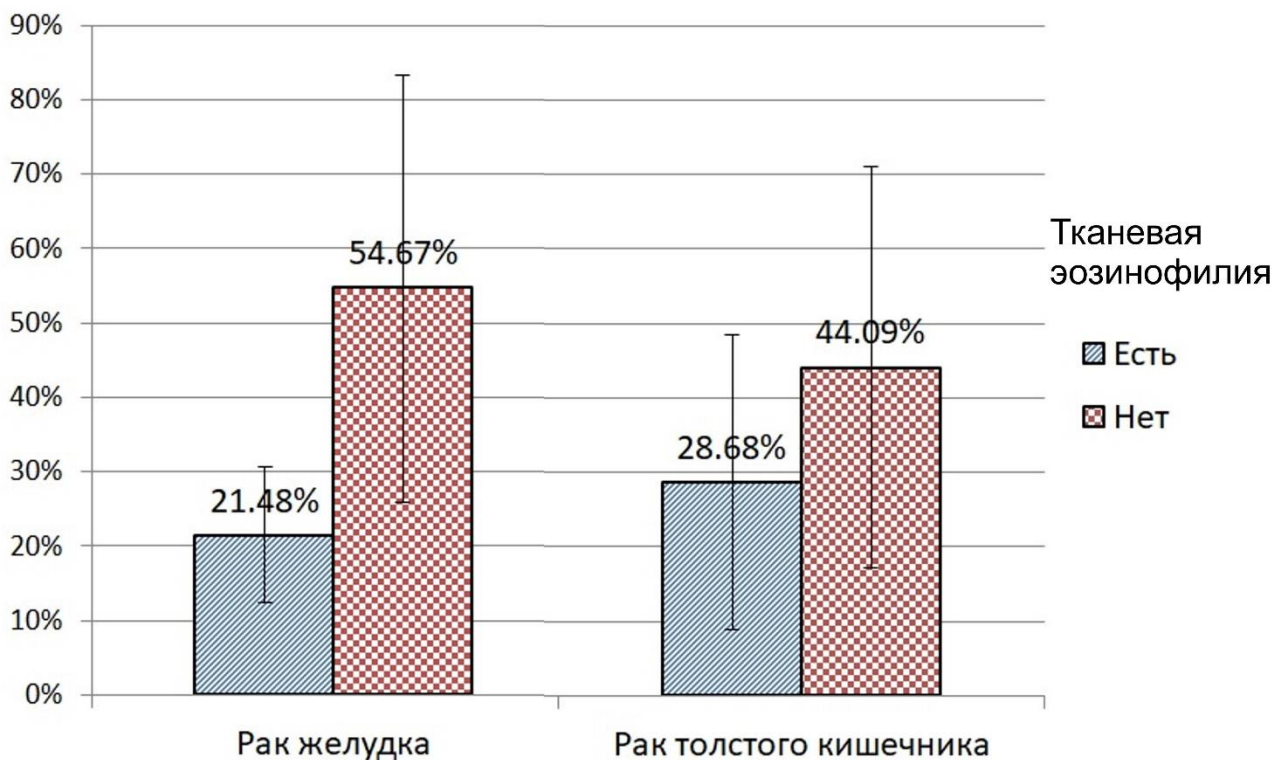


Рисунок 32. Относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих мутантный белок p53, при раке желудка и толстого кишечника, % (среднее значение и стандартное квадратическое отклонение).

Низкая экспрессия мутантной формы белка p53 в опухолевых клетках желудка и толстого кишечника позволяет думать о преобладании в ядрах клеток белка дикого типа, способного связываться со своей транскрипционной мишенью — промоторной областью гена *CDKN1A*, кодирующий белок ингибитор циклин-зависимых киназ p21 [4]. Вместе с тем, неизмененный белок p53 способен взаимодействовать с белками Вах/Bcl-2 и Вах, и напрямую участвовать в

реализации запрограммированной гибели опухолевых клеток [5]. Ассоциация p53 с факторами, обеспечивающими процессы репликации и репарации ДНК, позволяет белку p53 также влиять на восстановление целостности ДНК [5]. Высокую экспрессию нормального белка p53 в опухолевых клетках связывают с позитивными показателями прогноза общей и безрецидивной выживаемости пациентов со злокачественными новообразованиями различной локализации [5, 9].

Как уже упоминалось ранее, существует множество генов, являющихся мишенью для белка p53. К ним относятся гены, обеспечивающие регуляцию клеточного цикла, апоптоза и ангиогенеза. Основным механизмом регуляции неконтролируемой пролиферации клеток является p53/p21-опосредованный путь. Слаженное функционирование транскрипционного фактора p53 и белка-регулятора клеточного цикла p21 в клетках организма обеспечивает генетическую стабильность и однородность соматических клеток [144].

В нашем исследовании мы провели сравнительный анализ экспрессии белка p21 в клетках злокачественных опухолей желудка и толстого кишечника в зависимости от наличия тканевой эозинофилии. По результатам иммуногистохимического исследования во всех исследованных образцах средний уровень экспрессии опухолевыми клетками белка p21 превышал значение 10%, которое рассматривается многими авторами, как критическое [73, 75]. При этом в гистологических образцах рака желудка и толстого кишечника с эозинофилией и без нее количество клеток, экспрессирующих белок p21 было сопоставимым. Считается, что положительная иммуногистохимическая реакция на белок p21 в менее чем 10% ядер опухолевых клеток ассоциирована с отрицательной динамикой течения болезни. По данным литературы, высокая экспрессия белка p21 характерна для опухолей пищевода умеренной степени дифференцировки, тогда как, отсутствие экспрессии данного белка в клетках обнаруживается при недифференцированных формах рака пищевода [73]. Установлена положительная корреляция низкой экспрессии белка p21 в опухоли и глубиной инвазии, метастазированием в лимфатические узлы и клинической стадией заболевания [73].

Следует отметить, что у больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией экспрессия опухолевыми клетками белка p21 была сопряжена с низкой экспрессией мутантного белка p53 опухолевыми клетками. В связи с этим, можно предположить, что в опухолевых клетках желудка и толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией p53-зависимый путь активации белка p21 функционирует более эффективно.

Согласно данным литературы, появление в клетках функционально различных форм белка p53 может быть следствием точечных мутаций, возникающих в экзонной области гена *TP53*. Так, экзонный *G215C*-полиморфизм гена *TP53*, определяющий замену аминокислоты Pro на Arg в положении 72 структуры белка, приводит к наработке такой изоформы p53, которая более эффективно индуцирует апоптоз [109]. В литературе встречается достаточно много работ, описывающих наличие ассоциации определенных аллелей и генотипов полиморфизма *G215C* гена *TP53* с онкологическими заболеваниями. Показано, что *C*-аллель *G215C*-полиморфизма гена *TP53* ассоциирован с риском развития рака яичника [58] и рака молочной железы [72]. Установлена ассоциация гетерозиготного генотипа *GC* данного полиморфизма с ранней прогрессией рака легкого у индийского населения [92].

В настоящем исследовании мы провели анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизма *G215C* гена *TP53* при раке желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией и без нее. В результате исследования установлено, что у пациентов с раком желудка и толстого кишечника, ассоциированным с тканевой эозинофилией, достоверно чаще регистрировались аллель *G* и генотип *GG* полиморфизма *G215C* гена *TP53*. Кроме этого, у пациентов данной группы была выявлена положительная ассоциация тканевой эозинофилии с носительством гомозиготного генотипа *GG* и аллеля *G* этого полиморфизма (Рисунки 33, 34).

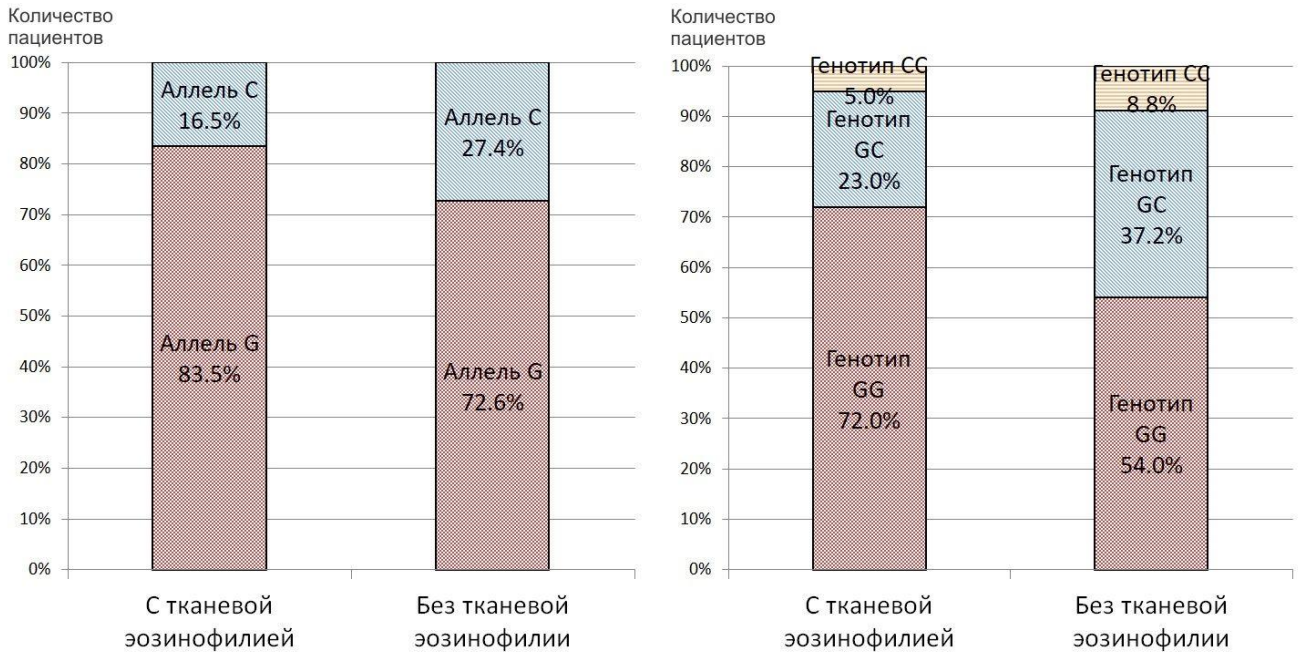


Рисунок 33. Распределение генотипов и аллелей полиморфизма *G215C* гена *TP53* у больных раком желудка.

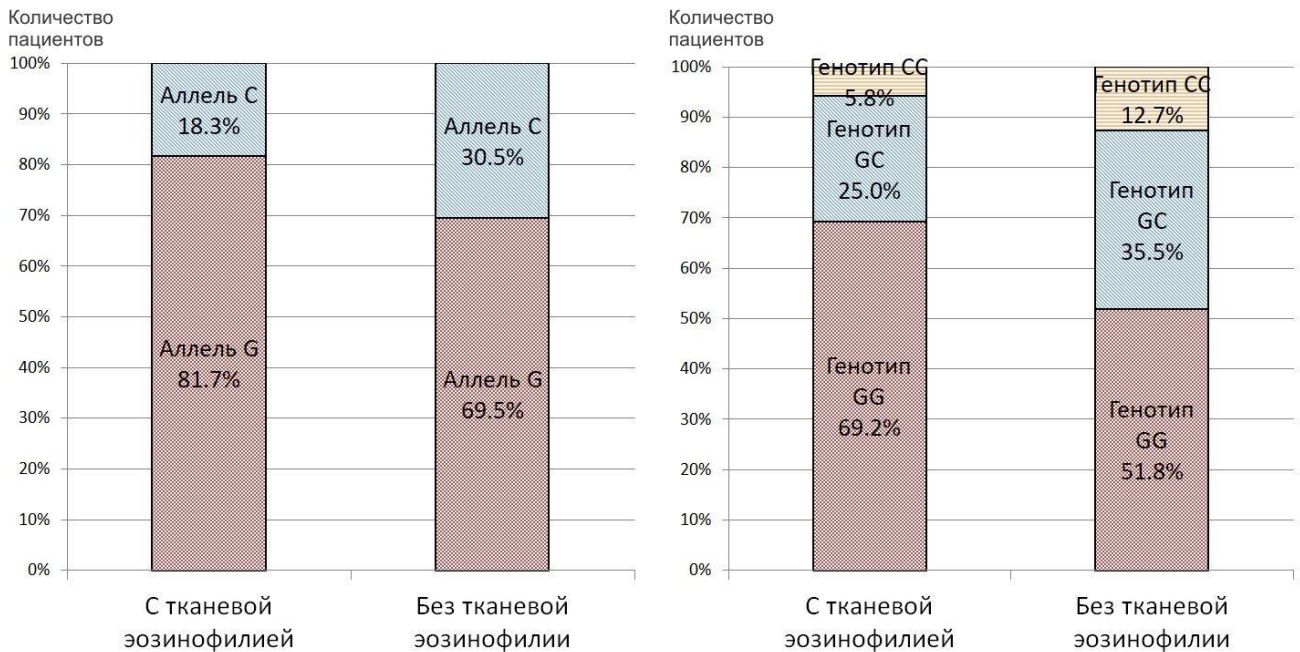


Рисунок 34. Распределение генотипов и аллелей полиморфизма *G215C* гена *TP53* у больных раком толстого кишечника.

Таким образом, при раке желудка и толстого кишечника, сопровождающемся тканевой эозинофилией, в промоторной области гена *TP53* преобладает аллель *G*, который обуславливает синтез белка p53 с выраженными проапоптотическими

свойствами. Генетически детерминированное превалирование данной изоформы белка в нормальных клетках желудка и толстого кишечника у пациентов с тканевой эозинофилией, по-видимому, может обеспечивать более эффективный контроль пролиферации клеток и их элиминацию при повреждении. С этим фактом может быть косвенно связана выявленная нами гипоэкспрессия мутантной формы белка p53 в ядрах опухолевых клеток при раке желудка и толстого кишечника, ассоциированных с тканевой эозинофилией.

Как упоминалось ранее, белок p53, выступая в роли транскрипционного фактора, связывается с промоторным регионом гена *CDKN1A* и инициирует его экспрессию. Наличие полиморфных вариантов в области промотора гена *CDKN1A* могут привести к нарушению взаимодействия с транскрипционными факторами [36]. Показано, что полиморфизм *A1026G* в 5'-промоторе гена *CDKN1A* обуславливает снижение скорости синтеза РНК на данном участке, что приводит к уменьшению экспрессии гена и снижению синтеза белка p21 [124]. В литературе приводятся данные о связи полиморфизма *CDKN1A (A1026G)* с риском развития злокачественных новообразований различной локализации, причем *G*-аллель рассматривается предрасполагающим [35].

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. По данным литературы *A*-аллель полиморфизма *A1026G* гена *CDKN1A* считается высокопродуцирующим, так как ассоциирован с высокой экспрессией белка p21 в клетках [124].

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. Данный тезис позволяет рассматривать эозинофильную

инфильтрацию опухолевой ткани желудка и толстого кишечника скорее в позитивном контексте.

Следует отметить, что эозинофильные гранулоциты помимо участия в противоопухолевом ответе макроорганизма, способны также содействовать развитию опухоли. В современной литературе приводятся механизмы, посредством которых эозинофилы используются опухолевыми клетками в целях их собственного выживания [91, 145, 146].

Известно, что эозинофильные гранулоциты принимают активное участие в механизмах заживления ран и ремоделирования тканей за счет секреции различных ростовых факторов и проангиогенных посредников. К ним относятся, главным образом: TGF β , EGF, VEGF, фактор роста нервов (NGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), матриксные металлопротеиназы (MMP) и др. [134, 151]. К. Hirohito (2011) установлено, что в носовых полипах эозинофильные гранулоциты экспрессируют TGF β 1, определяющий развитие структурных аномалий в виде фиброза стромы и утолщения базальной мембраны. Также показано, что секреция TGF β 1 тканевыми эозинофилами усиливает синтез коллагена в легких и инициирует пролиферацию фибробластов кожи [88].

Известно, что ростовые факторы регулируют пролиферацию и дифференцировку не только нормальных клеток, но и могут участвовать в их опухолевой трансформации. Сигнальные пути EGF и VEGF играют ключевую роль в развитии и прогрессировании эпителиальных опухолей человека [10, 25, 93].

Эпидермальный фактор роста, связываясь со своим рецептором EGFR, может инициировать синтез онкогенных белков и обеспечивать растормаживание пролиферации опухолевых клеток, что приводит к их паракринной и аутокринной регуляции [55]. Гиперэкспрессия EGFR на клетках опухоли может обеспечивать лиганд-независимую димеризацию рецептора и проведение пролиферативного сигнала [103].

По данным литературы, в большинстве эпителиальных опухолей человека регистрируется высокая экспрессия EGFR. По мнению исследователей, гиперэкспрессия EGFR опухолевыми клетками при раке молочной железы, раке

яичников, раке желудка и др. является показателем плохого прогноза, ассоциируется с метастазированием опухоли и поздними стадиями болезни [48, 74, 90, 93]. Экспрессия EGFR может быть независимым прогностическим показателем возникновения рецидива и низкой выживаемости больных колоректальным раком после хирургического лечения [117].

В нашем исследовании мы оценивали экспрессию EGFR в опухолевой ткани 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 35). Несмотря на то, что эозинофильные гранулоциты и другие клетки опухолевого микроокружения являются активными продуцентами EGF, 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 [103].

В качестве промотора пролиферации опухолевых клеток может выступать также VEGF. Этот ростовой фактор играет ключевую роль в ангиогенезе, обеспечивающем рост и выживание опухоли через образование новых кровеносных сосудов [135]. Считается, что основным источником VEGF в опухоли являются трансформированные клетки и в меньшей степени элементы микроокружения (эндотелиальные клетки, фибробласты, макрофаги и эозинофилы) [135]. 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. [108, 142]. Это указывает на потенциальную двойную роль ангиогенных факторов, связанную как с опосредованным, так и с прямым влиянием VEGF на пролиферацию опухолевых клеток.

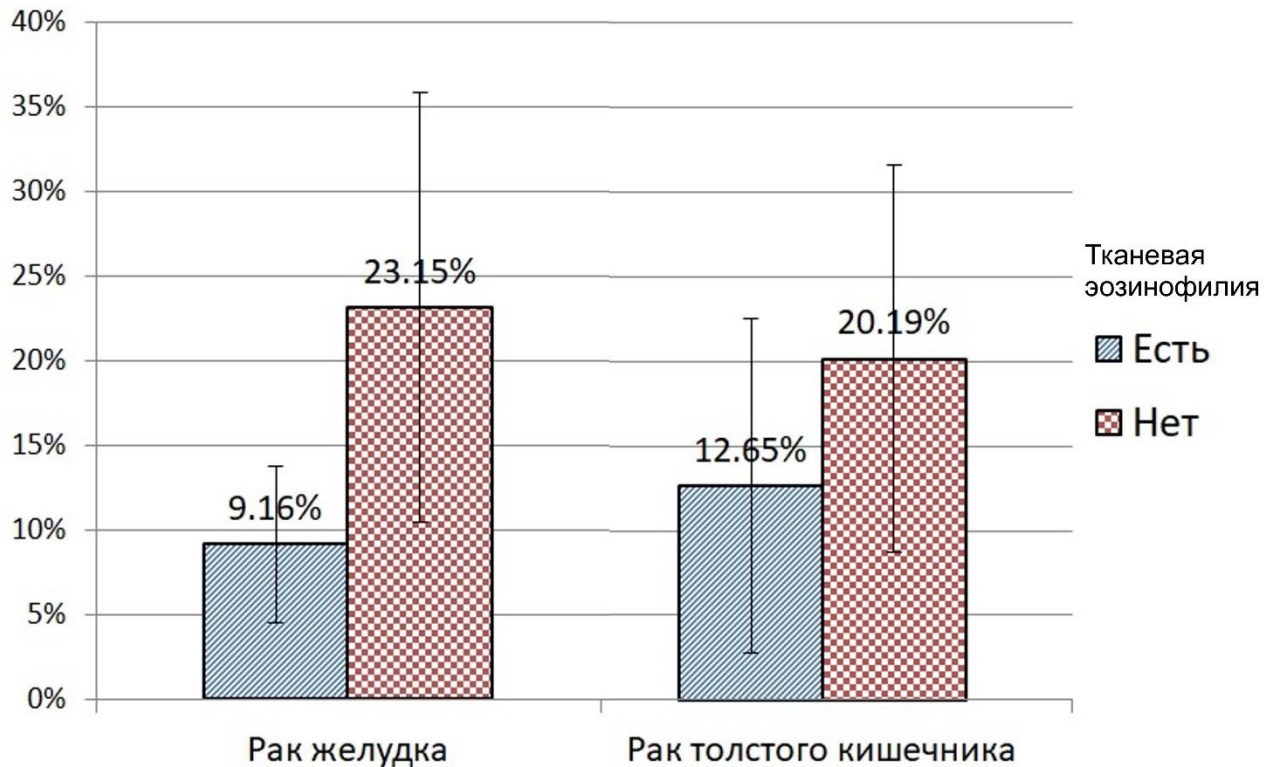


Рисунок 35. Относительное содержание опухолевых клеток, экспрессирующих EGFR, при раке желудка и толстого кишечника, % (среднее значение и стандартное квадратическое отклонение).

В результате проведенного нами иммуногистохимического исследования, во всех образцах рака желудка и толстого кишечника отмечалась положительная реакция опухолевых клеток на VEGFR. У больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией и без нее содержание опухолевых клеток, экспрессирующих VEGFR, было сопоставимым. Отсутствие взаимосвязи между экспрессией этого рецептора и тканевой эозинофилией при раке желудка и толстого кишечника указывает на то, что наличие эозинофильных гранулоцитов в опухолевой ткани не влияет на уровень экспрессии VEGFR на опухолевых клетках, несмотря на потенциальную возможность эозинофилов выделять в окружающую ткань VEGF.

В целом, полученные нами результаты подтверждают тезис о специфичности экспрессии рецептора VEGFR клетками сосудистого эндотелия. Взаимодействие VEGF со своим рецептором повышает проницаемость сосудов, что облегчает

проникновение опухолевых клеток в кровоток [76, 93]. Установлен более медленный рост опухолей и низкий уровень метастазирования у мутантной линии мышей с недостатком лиганд-связывающего домена VEGFR [135]. Примечательно, что неопластические сосуды отличаются от нормальных более высокой проницаемостью и отсутствием организации сосудистой сети, что обуславливает неравномерное поступление кислорода в ткани и возникновение локальных очагов гипоксии, инициирующих ангиогенез [46]. Последний играет основополагающую роль в неопластических процессах и необходим для выживания, прогрессирования и метастатического распространения опухоли [93]. По данным литературы, активный рост кровеносных и лимфатических сосудов в опухолях коррелирует с неблагоприятным прогнозом болезни [46, 93]. Показано, что плотность микрососудов значительно выше в ткани аденокарцином различной локализации, чем в соответствующих доброкачественных новообразованиях. Расширение микрососудистого русла ассоциировано с поздними стадиями заболевания и наличием метастазов [142].

Метастазирование (появление вторичных очагов опухолевого роста, удаленных от первичного опухолевого узла) является маркерным признаком опухолевой прогрессии. Опухолевые клетки отрываются от первичной опухоли, мигрируют по лимфатическим и кровеносным сосудам, имплантируются и дают начало новым опухолям в других органах. Очаги метастатического поражения в первую очередь регистрируются в регионарных лимфатических узлах. Несмотря на то, что формирование метастатических очагов является продолжительным процессом, который может начинаться на ранней стадии первичной опухоли, наличие вторичных опухолевых образований ассоциировано, как правило, с негативным прогнозом заболевания [5].

В современной литературе описаны результаты работ, в которых проводилась попытка установить взаимосвязь между наличием очагов регионарного метастазирования и эозинофильной инфильтрацией опухолевой ткани. Так, D.T. Oliveira et al. (2012) предлагают использовать опухолеассоциированную тканевую эозинофилию в качестве дополнительного прогностического критерия наличия

скрытых метастазов в лимфатических узлах при плоскоклеточном раке полости рта. Исследователями было показано присутствие большого количества эозинофилов в ткани опухоли при наличии метастазов этой локализации. Все регионарные рецидивы произошли у пациентов, имеющих интенсивную эозинофильную инфильтрацию опухоли [69]. Другими авторами было показано, что при плоскоклеточном раке полости рта, ассоциированном с выраженной эозинофильной инфильтрацией, течение опухолевого процесса было, напротив, менее агрессивным [65]. По сведениям Y. Ohashi al. (2000), более выраженная аккумуляция эозинофилов наблюдалась в опухолях с неметастатическим фенотипом [136].

В настоящем исследовании мы оценивали наличие очагов метастазирования у больных раком желудка и толстого кишечника в зависимости от присутствия эозинофильных гранулоцитов в ткани опухоли. В результате проведенного исследования было установлено, что у больных раком желудка с тканевой эозинофилией лимфогенные метастазы регистрировались значительно реже, чем у пациентов без эозинофилии. При раке желудка установлена достоверная ассоциация тканевой эозинофилии с отсутствием очагов регионарного метастазирования. При анализе частоты встречаемости метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у больных раком толстого кишечника с эозинофилией наблюдалась схожая тенденция. Полученные нами результаты указывают на существование взаимосвязи между эозинофильной инфильтрацией опухолевой ткани и менее агрессивным характером опухоли. Низкий метастатический потенциал злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника в сочетании с тканевой эозинофилией может быть связан с выявленной нами гипоэкспрессией опухолевыми клетками EGFR. Снижение экспрессии рецепторов к эндотелиальному фактору роста определяет менее эффективное проведение сигнала внутрь клетки, что обуславливает снижение скорости пролиферации клеток и темпа роста опухоли.

По данным литературы, наличие опухолиассоциированной тканевой эозинофилии сопряжено не только с отсутствием метастазов, но и с более высокой

степенью дифференцировки опухоли [112, 155], и лучшей выживаемостью пациентов [116].

Известно, что опухолевые клетки характеризуются превалированием пролиферации над явлением нормальной клеточной дифференцировки. Степень дифференцировки опухоли указывает, насколько опухоль агрессивна и определяет степень ее злокачественности. Клетки высокодифференцированных опухолей сохраняют признаки нормальных клеток, из которых они были сформированы. Такие опухоли наименее агрессивны и легче поддаются лечению. Низкодифференцированные новообразования проявляют себя более активно, поскольку их клетки утрачивают все специфические функции, кроме способности к неконтролируемому делению.

В нашем исследовании мы оценили взаимосвязь степени дифференцировки опухоли при раке желудка и раке толстого кишечника с наличием эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани. В результате исследования установлено, что опухоли толстого кишечника с эозинофилией почти в 90% случаев высоко- и умеренно дифференцированные, у пациентов с раком желудка установлена лишь тенденция к изменению данного показателя. В связи с тем, что клетки высокодифференцированных опухолей не в полной мере утрачивают антигенные структуры, обладающие иммуногенностью [5], 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. По сведениям L. Harbaum et al. (2015), наличие и степень тканевой эозинофилии при колоректальном раке дает важную прогностическую информацию [107]. Исследователи установили связь тканевой эозинофилии с более высокой степенью дифференцировки опухоли, отсутствием метастатического поражения лимфатических узлов и сосудистой инвазии [112, 155, 141]. Полученные

результаты авторы связывают с прямым действием на опухолевые клетки эозинофильных цитотоксических гранулярных протеинов.

Положительное влияние опухолеассоциированной тканевой эозинофилии констатируют также на основании результатов оценки пятилетней безрецидивной выживаемости пациентов [155].

Среди пациентов со злокачественными новообразованиями желудка и толстого кишечника мы проанализировали показатель одногодичной летальности больных в зависимости от наличия тканевой эозинофилии. Показатель одногодичной летальности характеризует долю пациентов, умерших в течение года с момента установления диагноза. У больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией показатель одногодичной летальности имел тенденцию к снижению по сравнению с соответствующим показателем у пациентов без эозинофилии. Полученные результаты соответствуют представлениям о скорее положительном значении эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани при раке желудка и толстого кишечника.

Резюмируя вышеизложенное, следует заключить, что тканевая эозинофилия чаще сопровождает высоко- и умереннодифференцированные опухоли (при раке толстого кишечника) без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов (при раке желудка) с относительно сохранными антимутационными механизмами противоопухолевой резистентности; и ассоциирована с дисбалансом экспрессии факторов, регулирующих пролиферацию опухолевых клеток (Рисунок 36).

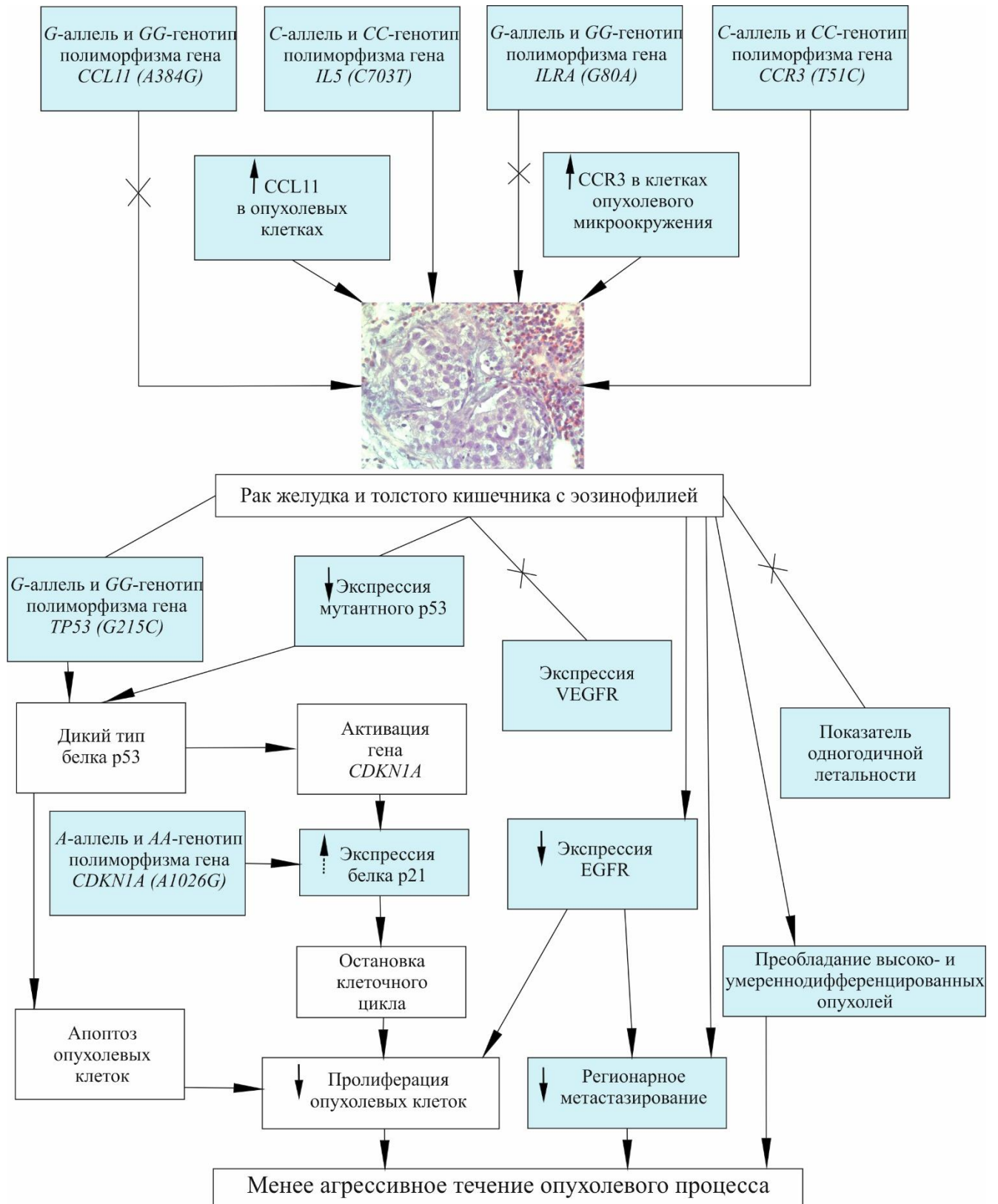


Рисунок 36. Патогенетические факторы развития и прогрессии рака желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией (по данным Cho H. et al. (2016), Pehlivanoglu B. et al. (2016), Zhou Y. et al. (2016), Peurala E. et al. (2018) и результатам собственных исследований (выделено цветом)).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опухولةассоциированная тканевая эозинофилия регистрируется более чем в 25% случаев рака желудка и рака толстого кишечника до начала проведения лучевой и химиотерапии. Опухولةвые клетки желудка и толстого кишечника способны продуцировать CCL11, 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 на опухолевых клетках при раке желудка и толстого кишечника с эозинофилией обуславливает возможное снижение их пролиферативного потенциала 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, обосновывает скорее позитивную роль эозинофильных гранулоцитов в патогенезе рака желудка и толстого кишечника.

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

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 и отсутствием метастатического поражения лимфатических узлов у больных раком желудка и не связана с показателем одногодичной летальности пациентов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

APC – (adenomatous polyposis coli) – ген аденоматозного полипоза-коли

CCL – (C-C motif Chemokine Ligand) – хемокиновый лиганд, содержащий два остатка цистеина подряд

CCR – (C-C Chemokine Receptor) – хемокиновый рецептор

Cdk – (cyclin-dependent kinases) – циклин-зависимые киназы

CDKN1A – (cyclin dependent kinase inhibitor 1A) – ген ингибитора циклин-зависимой киназы 1A

CKIs – (cdk Inhibitors) – ингибиторы циклин-зависимых киназ

EBV – (epstein-Barr virus) – вирус Эпштейна-Барр

EGF – (epidermal growth factor) – эпидермальный фактор роста

EGFR – (epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста

ErbB – (receptor tyrosine kinases) – рецептор тирозиновая протеинкиназа

IL – (interleukin) – интерлейкин

IL5RA – (interleukin 5 Receptor Subunit Alpha) – ген, кодирующий α -субъединицу рецептора интерлейкина 5

MMP – (matrix metalloproteinases) – матриксные металлопротеиназы

NGF – (nerve growth factor) – фактор роста нервов

PDGF – (platelet-derived growth factor) – тромбоцитарный фактор роста

SNP – (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм

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

TGF – (transforming growth factor) – трансформирующий фактор роста

TNF – (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

TP53 – (tumor protein p53) – ген опухолевого белка p53

VEGF – (vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов

VEGFR – (vascular endothelial growth factor receptor) – рецептор фактора роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генетический полиморфизм системы репарации ДНК у больных раком желудка с различными гистологическими типами опухоли / С. С. Ракитин, А. И. Дмитриева, В. В. Новицкий и др. // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 3. – С. 125-130.
2. Геномные основы подверженности к инфекционным заболеваниям / И. А. Гончарова, М. Б. Фрейдин, А. А. Рудко и др. // *Вестник Вавиловского общества генетиков и селекционеров*. – 2006. – Т. 10, № 3. – С. 540-552.
3. Гржибовский, А. М. Анализ номинальных данных (независимые наблюдения) / А. М. Гржибовский // *Экология человека*. – 2008. – № 6. – С. 58-68.
4. Желтухин, А. О. Повседневные и индуцируемые функции гена p53 / А. О. Желтухин, П. М. Чумаков // *Успехи биологической химии*. – 2010. – Т. 50. – С. 447-516.
5. Заридзе, Д. Г. Канцерогенез / Д. Г. Заридзе. – М. : Медицина, 2004. – 576 с.
6. Зеленова, О. В. Некоторые иммунологические аспекты и предполагаемые причины болезни Ходжкина / О. В. Зеленова, Н. А. Тереньтеева, Е. Г. Зеленова // *Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина*. – 2006. – Т. 17, № 1. – С. 22-25.
7. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М. : МНИОИ им. П. А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. – илл. – 250 с.
8. Касчиато, Д. Онкология / Д. Касчиато. – М. : Практика, 2008. – 1039 с.
9. Колесник, А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого / А. П. Колесник // *Онкология*. – 2013. – Т. 15, № 1. – С. 20-23.

10. Колобовникова, Ю. В. Эозинофил в норме и при патологии / Ю. В. Колобовникова, О. И. Уразова, В. В. Новицкий. – Томск : Печатная мануфактура, 2014. – 124 с.
11. Копнин, Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Б. П. Копнин // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 5-33.
12. Мерабишвили, В. М. Рак желудка: эпидемиология, профилактика, оценка эффективности лечения на популяционном уровне / В. М. Мерабишвили // Практическая онкология. – 2001. – Т. 2, № 3(07). – С. 3-8.
13. Меркулов, Г.А. Курс патологогистологической техники / Г.А. Меркулов – Л. : Медицина. – 1996. – 544 с.
14. О роли активации процессов липопероксидации в механизмах развития цитотоксических эффектов полихимио- и лучевой терапии у больных раком молочной железы / В. Ю. Барсуков, Н. П. Чеснокова, В. Н. Плохов, Т. Д. Селезнева // Медицинские науки. – 2007. – № 12. – С. 452-456.
15. Полиморфизм гена *CDKN1A* как фактор риска первичной открытоугольной глаукомы среди населения Забайкальского края / А. И. Белоусова, Ю. А. Витковский, Н. А. Логунова и др. // Забайкальский медицинский вестник. – 2009. – №2. – С. 47-49.
16. Полиморфизм генов-регуляторов клеточного цикла *p53* и *p21^{WAF1/CIP1}* при раке лёгкого / И.А. Кузнецова, А.И. Дмитриева, С.С. Ракитин, В.В. Новицкий // Сиб. мед. журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 110, № 3. – С. 47-50.
17. Роль полиморфизма генов интерлейкина-5 (-703) и рецептора к интерлейкину-5 (-80) в формировании эозинофилии крови при туберкулезе легких / К.О. Михеева, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 57-63.
18. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / под ред. С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. – 3-е изд, доп. и перераб. – Казань : Титул, 2004. – 456 с.

19. Сенников, С. В. Аллельные варианты и изоформы цитокинов в диагностике и патогенезе иммунопатологических состояний / С. В. Сенников, А. Н. Силков, В. А. Козлов // Иммунология. – 2002. – №4. – С. 243-250.
20. Сергиенко, В. И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В. И. Сергиенко, И.Б. Бондарева. – М. : «ГЭОТАР – Медиа», 2006. – 306 с.
21. Симбирцев, А. С. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления / А. С. Симбирцев, А. Ю. Громова // Цитокины и воспаление. – 2005. – Том 4, № 1. – С. 3-10.
22. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М. : МНИОИ им. П. А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. – илл. – 236 с.
23. Туманский, В. А. Сравнительная оценка экспрессии ростовых рецепторов семейства ErbB, Ki-67 и E-кадгерина клетками протоковой аденокарциномы поджелудочной железы / В. А. Туманский, А. В. Евсеев // Патология. – 2014. – Vol. 3, № 32. – P. 55-59.
24. Ченцов, Ю. С. Введение в клеточную биологию / Ю. С. Ченцов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2005. – 495 с.
25. Эозинофил и его роль в патологии / Ю. В. Колобовникова, О. И. Уразова, В. В. Новицкий и др. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2011. – № 2. – С. 6-13.
26. 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils / A. Munitz, I. Bachelet, S. Fraenkel et al. // J. Immunol. – 2005. – Vol. 174, № 1. – P. 110-118.
27. A case of eosinophilic abscess mistaken for metastasis due to FDG uptake in PET-CT / Y. S. Kim, S. J. Park, H. K. Kim, J. M. Park // Korean J. Gastroenterol. – 2009. – Vol. 54, № 6. – P. 349-354.
28. A functional $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex distinct from $\gamma\delta$ T cells is expressed by human eosinophils [Electronic resource] / F. Legrand, V. Driss, G. Woerly et al. // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, № 6. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0005926&type=printable>

29. Akuthota, P. Eosinophils and disease pathogenesis / P. Akuthota, P. F. Weller // *Semin. Hematol.* – 2012. – Vol. 49, № 2. – P. 113-119.
30. Al-Abdulahadi, S.A. Linkage and haplotype analysis for chemokine receptors clustered on chromosome 3p21.3 and transmitted in family pedigrees with asthma and atopy / S.A. Al-Abdulahadi, M.W.O. Al-Rabia. // *J. Ann Saudi Med.* – 2010. – Vol. 30(2). – P. 115-122.
31. Alcohol Drinking, Cigarette Smoking and Risk of Colorectal Cancer in the Korean Multi-center Cancer Cohort / S. Cho, A. Shin, S. K. Park et al. // *J. Cancer Prev.* – 2015. – Vol. 20, № 2. – P. 147-152.
32. Analysis of single nucleotide polymorphism in the promoter and protein expression of the chemokine Eotaxin-1 in colorectal cancer patients / D. Wagsater, S. Lofgren, A. Hugander et al. // *World Journal of Surgical Oncology.* – 2007. – Vol. 5(84). – P. 1-7.
33. Anti-cancer effects of p21^{WAF1/CIP1} transcriptional activation induced by dsRNAs in human hepatocellular carcinoma cell lines / Z. Wu, C. Dai, Y. Huang et al. // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2011. – Vol. 32, № 7. – P. 939-946.
34. Assessment of tissue eosinophilia as a prognosticator in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma – an image analysis study [Electronic resource] / M. Jain, S. Kasetty, U. S. Sudheendra et al. // *Patholog. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/507512>.
35. Association between SNPs in P53 binding regions and risk of esophageal squamous cell carcinoma / K. Wang, B. Liu, J. Li, et al. // *Int. J. Biol. Markers.* – 2014. – Vol. 29, № 2. – P. 160-168.
36. Association of p21 SNPs and risk of cervical cancer among Chinese women [Electronic resource] / N. Wang, S. Wang, Q. Zhang et al. // *BMC Cancer.* – 2012. – Vol. 12. Available at: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-589>.
37. Association of SNP in the IL-4, IL-18 and eotaxin genes with asthma in a Jordanian population / K. A. Attab, K. M. Al-Qaoud, K. Al-Bataieneh et al. // *Int. J. of Integrative Biology.* – 2008. – Vol. 4, № 2. – P. 86-91.

38. Balkwill, F. R. The tumor microenvironment at a glance / F. R. Balkwill, M. Capasso, T. Hagemann // *J. Cell Sci.* – 2012. – Vol. 125, № 23. – P. 5591-5596.
39. Bendelac, A. The biology of NKT cells / Bendelac A., Savage P. B., Teyton L. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007. – V. 25. – P. 297-336.
40. Blanchard, C. Biology of the eosinophil / C. Blanchard, M. E. Rothenberg // *J. Adv. Immunol.* – 2009. – Vol. 101. – P. 81-121.
41. Bone Marrow Blood Vessels: Normal and Neoplastic Niche [Electronic resource] / S. Shahrabi, H. Rezaeeyan, A. Ahmadzadeh et al. // *Oncol. Rev.* – 2016. – Vol. 10, № 2. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5136754/>.
42. Brandes, M. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T cells / M. Brandes, K. Willmann, B. Moser // *Science.* – 2005. – Vol. 309, № 5732. – P. 264-268.
43. Burn, J. Genetics, Inheritance and Strategies for Prevention in Populations at High Risk of Colorectal Cancer (CRC) / J. Burn, J. Mathers, D. T. Bishop // *Recent Results Cancer Res.* – 2013. – Vol. 191. – P. 157-183.
44. Cancer-related symptom clusters, eosinophils, and survival in hepatobiliary cancer: an exploratory study / J. Steel, K. H. Kim, M. A. Dew et al. // *J. Pain Symptom Manage.* – 2010. – Vol. 39, № 5. – P. 859-871.
45. Carfilzomib induces G2/M cell cycle arrest in human endometrial cancer cells via upregulation of p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1} / Y. Zhou, K. Wang, S. Zhen et al. // *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* – 2016. – Vol. 55, № 6. – P. 847-851.
46. Carmeliet, P. Angiogenesis in cancer and other diseases / P. Carmeliet, R. K. Jain // *Nature.* – 2000. – Vol. 407, № 6801. – P. 249-257.
47. Cervical carcinoma in Malawi: A histopathologic study of 260 cases / D. Lowe, J. Jorizzo, J. Chiphangwi, M. S. Hutt // *Cancer.* – 1981. – Vol. 47, № 10. – P. 2493-2495.
48. Characterization of the expression and clinical features of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in esophageal carcinoma / M. Niyaz, J. Anwer, H. Liu et al. // *Oncol. Lett.* – 2015. – Vol. 10, № 6. – P. 3696-3704.

49. Conroy, D. M. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung / D. M. Conroy, T. J. Williams // *Respir. Res.* – 2001. – Vol. 2, № 3. – P. 150-156.
50. CpG methylation at GATA elements in the regulatory region of CCR3 positively correlates with CCR3 transcription / T. G. Uhm, S. K. Lee, B. S. Kim et al. // *Exp. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 44, № 4. – P. 268-280.
51. Crew, K. D. Epidemiology of gastric cancer / K. D. Crew, A. I. Neugut // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 12, № 3. – P. 354-362.
52. Davis, B. P. Eosinophils and cancer / B. P. Davis, M. E. Rothenberg // *Cancer Immunol. Res.* – 2014. – Vol. 2, № 1. – P. 1-8.
53. Dendritic cell immunotherapy combined with cytokine-induced killer cells promotes skewing toward Th2 cytokine profile in patients with metastatic non-small cell lung cancer / P. Zhao, X. Bu, X. Wei et al. // *Int. Immunopharmacol.* – 2015. – Vol. 25, № 2. – P. 450-456.
54. Does the severity of tissue eosinophilia of colonic neoplasms reflect their malignancy potential? / S. Kiziltas, S. S. Ramadan, A. Topuzoglu, S. Kullu // *Turk. J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 19, № 4. – P. 239-244.
55. Duffy, M. J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients / M. J. Duffy // *J. Cancer Treatment Reviews.* – 2011. – Vol. 37, № 2. – P. 151-159.
56. Early *Helicobacter pylori* eradication decreases risk of gastric cancer in patients with peptic ulcer disease / C. Y. Wu, K. N. Kuo, M. S. Wu et al. // *Gastroenterology.* – 2009. – Vol. 137, № 5. – P. 1641-1648.
57. EBV-positive gastric adenocarcinomas: a distinct clinicopathologic entity with a low frequency of lymph node involvement / J. van Beek, A. zur Hausen, E. K. Kranenbarg et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2004. – Vol. 22, № 4. – P. 664-670.
58. Effect of the codon 72 polymorphism (c.215G>C, p.Arg72Pro) in combination with somatic sequence variants in the TP53 gene on survival in patients with advanced ovarian carcinoma / Y. Wang, P. Kringen, G. B. Kristensen et al. // *Hum. Mutat.* – 2004. – V. 24, № 1. – P. 21-34.

59. Ehrlich, P. Methodologische beitrage zur physiologie und pathologie der verschiedenen formen der leukocyteni / P. Ehrlich // *Z. Klin. Med.* – 1880. – Vol. 1. – P. 553-560.
60. Eosinophil depletion protects mice from tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline-1-oxide / J. M. Silva, C. M. Queiroz-Junior, A. C. Batista et al. // *Histol. Histopathol.* – 2014. – Vol. 29, № 3. – P. 387-396.
61. Eosinophil tumor cellinteraction in advanced gastric carcinoma: an electron microscopic approach / R. A. Caruso, A. Bersiga, L. Rigoli, C. Inferrera // *Anticancer Res.* – 2004. – Vol. 22, № 6. – P. 3833-3836.
62. Eosinophil-expressed galectin-3 regulates cell trafficking and migration / X.N. Ge, S.G.Ha, F.T. Liu et al. // *Front Pharmacol.* – 2013. – Vol. 4, № 37. – P.1-9.
63. Eosinophilia and actinic enteritis due to radiotherapy for prostatic adenocarcinoma / F. J. Navajas Leon, A. J. Lucendo Villarin, J. C. Erdozain Sosa et al. // *Rev. Esp. Enferm. Dig.* – 2005. – Vol. 97, № 10. – P. 759-761.
64. Eosinophilia is a favorable prognostic marker for oral cavity and lip squamous cell carcinoma / E. Peurala, M. Tuominen, E. Löyttyniemi et al. // *APMIS.* – 2018. – V. 126, № 3. – P. 201-207.
65. Eosinophil-rich squamous carcinoma of the oral cavity: a study of 13 cases and delineation of a possible new microscopic entity / G. Falconieri, M. A. Luna, S. Pizzolitto et al. // *Ann. Diagn. Pathol.* – 2008. – Vol. 12, № 5. – P. 322-327.
66. Eosinophils and C4 predict clinical failure of combination immunotherapy with very low dose subcutaneous interleukin-2 and interferon in renal cell carcinoma patients / M. Moroni, C. Porta, M. De Amici et al. // *Haematologica.* – 2000. – Vol. 85, № 3. – P. 298-303.
67. Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable? / S. Sakkal, S. Miller, V. Apostolopoulos, K. Nurgali // *Curr. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 23, № 7. – P. 650-666.
68. Eosinophils in colorectal neoplasms associated with expression of CCL11 and CCL24 / H. Cho, S. J. Lim, K. Y. Won et al. // *J. Pathol. Transl. Med.* – 2016. – Vol. 50, № 1. – P. 45-51.

69. Eosinophils may predict occult lymph node metastasis in early oral cancer / D. T. Oliveira, T. P. Biassi, S. E. Faustino et al. // *Clin. Oral Investig.* – 2012. – Vol. 16, № 6. – P. 1523-1528.
70. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease / S. P. Hogan, H. F. Rosenberg, R. Moqbel et al. // *Clin. Exp. Allergy.* – 2008. – Vol. 38, № 5. – P. 709-750.
71. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma / H. Iizasa, A. Nanbo, J. Nishikawa et al. // *Viruses.* – 2012. – Vol. 4, № 12. – P. 3420-3439.
72. Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk / A. P. Damin, A. P. Frazzon, D. C. Damin et al. // *Cancer Detect. Prev.* – 2006. – V. 30, № 6. – P. 523-529.
73. Expression of Smad4, TGF- β RII, and p21^{waf1} in esophageal squamous cell carcinoma tissue / H. Cheng, C. Chen, L. Liu et al. // *Oncol. Lett.* – 2015. – Vol. 9, № 6. – P. 2847-2853.
74. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients / E. Lieto, F. Ferraraccio, M. Orditura et al. // *Ann. Surg. Oncol.* – 2008. – Vol. 15, № 1. – P. 69-79.
75. Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21, p27, and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis / F. Prall, C. Ostwald, H. Nizze, M. Barten // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* – 2004. – Vol. 12, № 2. – P. 111-121.
76. Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor as a target for anticancer therapy / N. Ferrara // *Oncologist.* – 2004. – Vol. 9, Suppl. 1. – P. 2-10.
77. Fine needle aspiration diagnosis of necrotizing eosinophilic abscess clinically mimicking hepatic neoplasia: a case report / G. Jackson, M. Kathuria, B. Abraham, V. J. Schnadig // *Acta Cytol.* – 2010. – Vol. 54, № 1. – P. 60-62.
78. Folkman, J. Angiogenesis / J. Folkman // *Annu. Rev. Med.* – 2006. – Vol. 57. – P. 1-18.

79. Franceschi, S. Alcohol and the risk of cancers of the stomach and colon-rectum / S. Franceschi, C. La Vecchia // *Dig. Dis.* – 1994. – Vol. 12, № 5. – P. 276-289.
80. Galectin-1 Interacts with the $\alpha 5\beta 1$ Fibronectin Receptor to Restrict Carcinoma Cell Growth via Induction of p21 and p27 / C. Fischer, H. Sanchez-Ruderisch, M. Welzel et al. // *The Journal of biological chemistry.* – 2005. – Vol. 280, № 44. – P. 37266-37277.
81. Gastrointestinal Parasitosis: Histopathological Insights to Rare but Intriguing Lesions of the Gastrointestinal Tract / B. Pehlivanoglu, B. Doganavsargil, M. Sezak et al. // *Turk. Patoloji Derg.* – 2016. – Vol. 32, № 2. – P. 82-90.
82. Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British asthmatics / K. Fukunaga, K. Asano, X. Q. Mao et al. // *Eur. Respir. J.* – 2001. – Vol. 17, № 1. – P. 59-63.
83. Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy / S. Hoffjan, I. Ostrovnaja, D. Nicolae et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 113, № 3. – P. 511-518.
84. GLOBOCAN 2012: Cancer Incidence and Mortality Worldwide [Electronic resource] / J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik et al. // International Agency for Research on Cancer. – 2013. – CancerBase № 11. Available at: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
85. Hayday, A. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells / A. Hayday, R. Tigelaar // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 3, № 3. – P. 233-242.
86. Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial / B. C. Wong, S. K. Lam, W. M. Wong et al. // *JAMA.* – 2004. – Vol. 291, № 2. – P. 187-194.
87. Heterogeneity of interleukin 5 genetic background in atopic dermatitis patients: significant difference between those with blood eosinophilia and normal eosinophil levels / N. Yamamoto, H. Sugiura, K. Tanaka, M. Uehara // *J. Dermatol. Sci.* – 2003. – Vol. 33, № 2. – P. 121-126.
88. Hirohito, K. Eosinophils: multifaceted biologic properties and roles in health and disease / K. Hirohito // *Immunol. Rev.* – 2011. – Vol. 242, № 1. – P. 161-177.

89. Human eosinophils exert TNF- α and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells / F. Legrand, V. Driss, M. Delbeke et al. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, № 12. – P. 7443-7451.
90. Human epidermal growth factor in gastric carcinoma as a biologic marker of high malignancy / E. Tahara, H. Sumiyoshi, J. Hata et al. // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1986. – Vol. 77, № 2. – P. 145-152.
91. Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis / I. Puxeddu, A. Alian, A. M. Piliponsky et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 37, № 3. – P. 628-636.
92. Infection of human papillomavirus type 18 and p53 codon 72 polymorphism in lung cancer patients from India / N. Jain, V. Singh, S. Hedau et al. // *Chest.* – 2005. – V. 128, № 6. – P. 3999-4007.
93. Interaction between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multi-target anticancer therapy / F. Ciardiello, T. Troiani, R. Bianco et al. // *Ann. Oncol.* – 2006. – Vol. 17, Suppl. 7. – P. 109-114.
94. Intratumoral expression of CCR3 in breast cancer is associated with improved relapse-free survival in luminal-like disease / D.H Gong, L. Fan, H.Y. Chen et al. // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, № 19. – P. 28570-28578.
95. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response / S. Gatault, F. Legrand, M. Delbeke et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2012. – Vol. 61, № 9. – P. 1527-1534.
96. Iwasaki, K. Malignant tumor and eosinophils. I. Prognostic significance in gastric cancer / K. Iwasaki, M. Torisu, T. Fujimara // *Cancer.* – 1986. – Vol. 58, № 6. – P. 1321-1327.
97. Kita, H. Eosinophils: multifaceted biologic properties and roles in health and disease / H. Kita // *Immunol. Rev.* – 2011. – Vol. 242, № 1. – P. 161-177.
98. Kobayashi, M. Endoscopic surveillance of gastric cancers after *Helicobacter pylori* eradication / M. Kobayashi, Y. Sato, S. Terai // *World J. Gastroenterol.* – 2015. – Vol. 21, № 37. – P. 10553-10562.

99. Lack of association between eotaxin-1 gene polymorphisms and nasal polyposis / S. Ekinçi, S.S. Erbek, E. Yurtcu, F. I. Sahin // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2011. – Vol. 145, № 6. – P. 1036-1039.
100. Lee, J.-H. Genetic effect of CCR3 and IL5RA gene polymorphisms on eosinophilia in asthmatic patients / J.-H. Lee, H. S. Chang, J. H. Kim // *J. Allergy Clin. immunol.* – 2007. – Vol. 120, № 5. – P. 1110-1117.
101. Lochhead, P. Helicobacter pylori infection and gastric cancer / P. Lochhead, E. M. El-Omar // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 21, № 2. – P. 281-297.
102. Lowe, D. Tumour-associated eosinophilia: A review / D. Lowe, J. Jorizzo, M. S. R. Hutt // *J. Clin. Pathol.* – 1981. – Vol. 34. – P. 1343-1348.
103. Mendelsohn, J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer / J. Mendelsohn, J. Baselga // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – Vol. 21, № 14. – P. 2787-2799.
104. Meta-analysis: can Helicobacter pylori eradication treatment reduce the risk for gastric cancer? / L. Fuccio, R. M. Zagari, L. H. Eusebi et al. // *Ann. Intern. Med.* – 2009. – Vol. 151, № 2. – P. 121-128.
105. Metabolic syndrome and colorectal neoplasms: An ominous association / D. Trabulo, S. Ribeiro, C. Martins et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2015. – Vol. 21, № 17. – P. 5320-5327.
106. Molecular analysis of CCR-3 events in eosinophilic cells / N. Zimmermann, B. L. Daugherty, J. M. Stark, M. E. Rothenberg // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164, № 2. – P. 1055-1064.
107. Namkung, J.-H. IL-5 and IL-5 receptor alpha polymorphisms are associated with atopic dermatitis in Koreans / J.-H. Namkung, J.-E. Lee, E. Kim // *J. Allergy.* – 2007. – Vol. 62, № 8. – P. 934-942.
108. Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis / C. Rodriguez-Antona, J. Pallares, C. Montero-Conde et al. // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2010. – Vol. 17, № 1. – P. 7-16.

109. P53 codon 72 (Arg72Pro) polymorphism and prostate cancer risk: association between disease onset and proline genotype / A. Rogler, M. Rogenhofer, A. Borchardt et al. // *Pathobiology*. – 2011. – V. 78, № 4. – P. 193-200.
110. Paired immunoglobulin-like receptor A is an intrinsic, self-limiting suppressor of IL-5-induced eosinophil development / N. B. Baruch-Morgenstern, D. Shik, I. Moshkovits et al. // *Nat. Immunol.* – 2014. – Vol. 15, № 1. – P. 36-44.
111. Pearson, E. J. Eosinophilic small bowel enteritis in response to folinic acid, fluorouracil, and oxaliplatin chemotherapy / E. J. Pearson, R. Mennel // *Proc. (Bayl Univ Med Cent)*. – 2013. – Vol. 26, № 3. – P. 288-289.
112. Peritumoral eosinophils predict recurrence in colorectal cancer / L. Harbaum, M. J. Pollheimer, P. Kornprat et al. // *Mod. Pathol.* – 2015. – Vol. 28, № 3. – P. 403-413.
113. Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response / S. A. Cormier, A.G. Taranova, C. Bedient et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2006. – Vol. 79, № 6. – P. 1131-1139.
114. Polymorphism of the interleukin-5 and interleukin receptor genes: population distribution and association with atopic asthma / M. B. Freidin., V. P. Puzyrev, L. M. Ogorodova et al. // *Russ. J. Genet.* – 2002. – Vol. 38, № 12. – P. 1452-1459.
115. Potential roles of eosinophils in cancer therapy: epidemiological studies, experimental models, and clinical pathology / C. Cao, Y. Gu, C. Zhu et al. // *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* – 2014. – Vol. 9, № 2. – P. 241-248.
116. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma / M. J. Fernandez-Acenero, M. Galindo-Gallego, J. Sanz, A. Aljama // *Cancer*. – 2000. – Vol. 88, № 7. – P. 1544-1548.
117. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery / G. Galizia, E. Lieto, F. Ferraraccio et al. // *Ann. Surg. Oncol.* – 2006. – Vol. 13, № 6. – P. 823-835.
118. Prominent hypereosinophilia with disseminated intravascular coagulation as an unusual presentation of advanced gastric cancer / H. Takeda, H. Nishikawa, T. Tsumura et al. // *Intern. Med.* – 2014. – Vol. 53, № 6. – P. 563-569.

119. Prospective of Colon Cancer Treatments and Scope for Combinatorial Approach to Enhanced Cancer Cell Apoptosis / J. Mishra, J. Dromund, S. H. Quazi et al. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2013. – Vol. 86, № 3. – P. 232-250.
120. Recurrent paraneoplastic wells syndrome in a patient with metastatic renal cell cancer [Electronic resource] / A. Rajpara, A. Liolios, G. Fraga, J. Blackmon // *Dermatol. Online J.* – 2014. – Vol. 20, № 6. Available at: <http://escholarship.org/uc/item/35w8r1g3#page-1>.
121. Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance / L. Simson, J. I. Ellyard, L. A. Dent et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178, № 7. – P. 4222-4229.
122. Regulation of chemokine receptor expression in eosinophils / H. Nagase, M. Miyamasu, M. Yamaguchi et al. // *J. Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2001. – Vol. 125, № 1. – P. 29-32.
123. Rheinbach, G. Uber des Verhalten der leukozyten bei malignen tumoren / G. Rheinbach // *Arch. Klin. Chir.* – 1893. – Vol. 46. – P. 486-562.
124. Role of the CDKN1A/p21, CDKN1C/p57 and CDKN2A/p16 Genes in the Risk of Atherosclerosis and Myocardial Infarction / I. Rodriguez, E. Coto, J. R. Reguero et al. // *Cell Cycle.* – 2007. – Vol. 6, № 5. – P. 620-625.
125. Rosenberg, H. F. Eosinophils: changing perspectives in health and disease / H. F. Rosenberg, K. D. Dyer, P. S. Foster // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 9-22.
126. Rothenberg, M. E. Eosinophils in the new millennium / M. E. Rothenberg // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 11. – P. 1321-1322.
127. Rothenberg, M. E. Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues / M. E. Rothenberg // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 21, № 3. – P. 291-295.
128. Rothenberg, M. E. The eosinophil / M. E. Rothenberg, S. P. Hogan // *Annu. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 147-174.
129. Saif, M. W. Biology of colorectal cancer / M. W. Saif, E. Chu // *Cancer J.* – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 196-201.

130. Screening for colorectal cancer: U. S. Preventive Services Task Force recommendation statement / N. Calonge, D. B. Petitti, T. G. DeWitt et al. // *Ann. Intern. Med.* – 2008. – Vol. 149, № 9. – P. 627-637.
131. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice / W. K. Leung, M. S. Wu, Y. Kakugawa et al. // *Lancet. Oncol.* – 2008. – Vol. 9, № 3. – P. 279-287.
132. Sekiguchi, T. Induction of growth arrest and cell death by overexpression of the cyclin-Cdk inhibitor p21 in hamster BHK21 cells / T. Sekiguchi, T. Hunter // *Oncogene.* – 1998. – Vol. 16, № 3. – P. 369-380.
133. Severe eosinophilic pneumonia presenting during gemcitabine adjuvant chemotherapy [Electronic resource] / T. Yakabe, K. Kitahara, K. Komiya et al. // *World J. Surg. Oncol.* – 2013. – Vol. 11. – P. 167. Available at: <http://www.wjso.com/content/11/1/167>.
134. Shamri, R. Eosinophils in innate immunity: an evolving story / R. Shamri, J. J. Xenakis, L. A. Spencer // *Cell Tissue Res.* – 2011. – Vol. 343, № 1. – P. 57-83.
135. Shibuya, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis / M. Shibuya // *Genes Cancer.* – 2011. – Vol. 2, № 12. – P. 1097-1105.
136. Significance of tumor associated tissue eosinophilia and other inflammatory cell infiltrate in early esophageal squamous cell carcinoma / Y. Ohashi, S. Ishibashi, T. Suzuki et al. // *Anticancer Res.* – 2000. – Vol. 20, № 5A. – P. 3025-3030.
137. Simon, D. Organ-specific eosinophilic disorders of the skin, lung, and gastrointestinal tract / D. Simon, A. Wardlaw, M. E. Rothenberg // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2010. – Vol. 126, № 1. – P. 3-13.
138. Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies / R. Ladeiras-Lopes, A. K. Pereira, A. Nogueira et al. // *Cancer Causes Control.* – 2008. – Vol. 19, № 7. – P. 689-701.
139. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC) / C. A. Gonzalez, G. Pera, A. Agudo et al. // *Int. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 107, № 4. – P. 629-634.

140. Spencer, L. A. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights / L. A. Spencer, P. F. Weller // *Immunol. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 88, № 3. – P. 250-256.
141. Stromal eosinophilia in colonic epithelial neoplasms / J. Moezzi, N. Gopalswamy, R. J. Haas Jr. et al. // *Am. J. Gastroenterol.* – 2000. – Vol. 95, № 2. – P. 520-523.
142. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues / J. Pallares, F. Rojo, J. Iriarte et al. // *Histol. Histopathol.* – p 2006. – Vol. 21, № 8. – P. 857-865.
143. Takatsu, K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases / K. Takatsu // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* – 2011. – Vol. 87, № 8. – P. 463-485.
144. Targeted p21^{WAF1/CIP1} Activation by RNAa Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cells / M. Kosaka, M. R. Kang, G. Yang, L.-C. Li // *Nucleic Acid Ther.* – 2012. – Vol. 22, № 5. – P. 335-343.
145. Teoh, S. C. B. Severe eosinophilia in disseminated gastric carcinoma / S. C. B. Teoh, W. Y. Siow, H. T. Tan // *Singapore Med. J.* – 2000. – Vol. 41, № 5. – P. 232-234.
146. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy / M. R. Shurin, L. Lu, P. Kalinski et al. // *Springer Semin Immunopathol.* – 1999. – Vol. 21, № 3. – P. 339-359.
147. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia / S. M. Pope, N. Zimmermann, K. F. Stringer et al. // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175, № 8. – P. 5341-5350.
148. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease / E. A. Jacobsen, R. A. Helmers, J. J. Lee, N. A. Lee // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, № 19. – P. 3882-3890.
149. The polymorphisms of Eotaxin 1 and CCR3 genes influence on serum IgE, Eotaxin levels and mild asthmatic children in Taiwan / T. N. Wang, W. Chiang, H. I. Tseng et al. // *Allergy.* – 2007. – Vol. 62, № 10. – P. 1125-1130.
150. Thymidylate synthase expression and p21^{WAF1}/p53 phenotype of colon cancers identify patients who may benefit from 5-fluorouracil based therapy / V. Sulzyc-

- Bielicka, P. Domagala, D. Bielicki et al. // *Cell Oncol (Dordr)*. – 2014. – Vol. 37, № 1. – P. 17-28.
151. Tissue eosinophilia: a morphologic marker for assessing stromal invasion in laryngeal squamous neoplasms [Electronic resource] / M. Said, S. Wiseman, J. Yang et al. // *BMC Clin. Pathol.* – 2005. – Vol. 5, № 1. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1472-6890/5/1>.
152. Tissue eosinophilic infiltration: a useful marker for assessing stromal invasion, survival and locoregional recurrence in head and neck squamous neoplasia / S. J. Alrawi, D. Tan, D. L Stoler et al. // *Cancer J.* – 2005. – Vol. 11, № 3. – P. 217-225.
153. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis / K. V. Korneev, K. N. Atretkhany, M. S. Drutskaya et al. // *Cytokine*. – 2017. – Vol. 89. – P. 127-135.
154. Tumor Associated Tissue Eosinophilia in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Histo-Chemical Analysis / P. Sahni, A. Patel, S. Md et al. // *Malays J. Med. Sci.* – 2015. – Vol. 22, № 6. – P. 21-25.
155. Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas / R. G. Dorta, G. Landman, L. P. Kowalski et al. // *Histopathology*. – 2002. – Vol. 41, № 2. – P. 152-157.
156. Tumour-Associated Tissue Eosinophilia in Oral Squamous Cell Carcinoma- A Boon or a Bane? / S. Yellapurkar, S. Natarajan, K. Boaz et al. // *J. Clin. Diagn. Res.* – 2016. – Vol. 10, № 4. – P. ZC65-ZC68.
157. Uozaki, H. Epstein-Barr Virus and Gastric Carcinoma – Viral Carcinogenesis through Epigenetic Mechanisms / H. Uozaki, M. Fukayama // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2008. – Vol. 1, № 3. – P. 198-216.
158. Viola, A. T cells and their partners: The chemokine dating agency / A. Viola, R. L. Contento, B. Molon // *Trends Immunol.* – 2006. – Vol. 27, № 9. – P. 421-427.
159. Walerych, D. Mutant p53: One, No One, and One Hundred Thousand [Electronic resource] / D. Walerych, K. Lisek, G. Del Sal // *Front. Oncol.* – 2015. – Vol. 5. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2015.00289/full>.

160. Wharton Jones, T. The blood-corpuscle considered in its different phases of development in the animal series. Memoir 1. Vertebrata / T. Wharton Jones // Philos. Trans. R. Soc. Lond. – 1846. – Vol. 136. – P. 63-87.
161. Wnt/ β -catenin, an oncogenic pathway targeted by *H. pylori* in gastric carcinogenesis // X. Song, N. Xin, W. Wang, C. Zhao // Oncotarget. – 2015. – Vol. 5, № 34. – P. 35579-35588.
162. Wroblewski, L. E. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk / L. E. Wroblewski, R. M. Peek, K. T. Wilson // Clin. Microbiol. Rev. – 2010. – Vol. 23, № 4. – P. 713-739.
163. Yang, B. Regulatory Eosinophils in Inflammation and Metabolic Disorders / B. Yang, J. Seoh, M. H. Jang // Immune Netw. – 2017. – Vol. 17, № 1. – P. 41-47.
164. Zandonai, A. P. The dietary risk factors for colorectal cancer related to meat consumption / A. P. Zandonai, H. M. Sonobe, N. O. Sawada // Rev. Esc. Enferm. USP. – 2012. – Vol. 46, № 1. – P. 234-239.
165. Zhao, C. Promoter methylation of tumor-related genes in gastric carcinogenesis / C. Zhao, X. Bu // Histol. Histopathol. – 2012. – Vol. 27, № 10. – P. 1271-1282.
166. Zimmermann, N. Polymorphisms in the human CC chemokine receptor-3 gene / N. Zimmermann, J. A. Bernstein, M. E. Rothenberg // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – Vol. 1442, № 2-3. – P. 170-176.
167. Zuo, L. Gastrointestinal eosinophilia / L. Zuo, M. E. Rothenberg // Immunol. Allergy Clin. North Am. – 2007. – Vol. 27, № 3. – P. 443-455.