

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

На правах рукописи

Романова Елена Викторовна

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

3.3.3. Патологическая физиология

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

д-р мед. наук,
Ю.В. Колобовникова

д-р мед. наук, профессор,
член-корреспондент РАН О.И. Уразова

Томск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Эпидемиология, этиология и патогенез рака толстого кишечника.....	15
1.2 Опухолеассоциированная эозинофилия крови и тканей (общие сведения).....	21
1.3 Механизмы рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в опухолевую ткань.....	27
1.4 Роль эозинофила в патогенезе опухолевых заболеваний	33
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1 Клиническая характеристика обследованных лиц.....	43
2.2 Материал исследования.....	47
2.3 Методы исследования.....	47
2.3.1 Оценка эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани толстого кишечника.....	47
2.3.2 Оценка экспрессии CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани толстого кишечника.....	48
2.3.3 Оценка экспрессии галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани толстого кишечника.....	49
2.3.4 Оценка экспрессии EGFR и VEGFR в опухолевой ткани толстого кишечника.....	50
2.3.5 Оценка экспрессии эозинофильной пероксидазы в опухолевой ткани толстого кишечника.....	51
2.3.6 Выделение и культивирование эозинофилов периферической крови.....	51
2.3.7 Определение концентрации цитокинов в супернатантах суспензионной культуры эозинофилов крови.....	53

2.3.8	Оценка экспрессии м-РНК гена <i>LGALS3</i> в эозинофилах периферической крови.....	56
2.3.9	Статистическая обработка результатов исследования.....	56
Глава 3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	58
3.1	Экспрессия <i>CCL11</i> и <i>CCR3</i> в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника.....	59
3.2	Экспрессия галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника.....	62
3.3	Экспрессия м-РНК гена галектина-3 в эозинофилах крови у больных раком толстого кишечника.....	64
3.4	Экспрессия эозинофильной пероксидазы в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника.....	65
3.5	Показатели <i>in vitro</i> секреции цитокинов $TNF\alpha$, $TGF\beta1$, $VEGF$ и EGF эозинофилами крови у больных раком толстого кишечника.....	67
3.6	Экспрессия рецепторов к $VEGF$ и EGF в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника.....	71
3.7	Взаимосвязь <i>TATE</i> с клинико-морфологическими характеристиками опухоли у больных раком толстого кишечника.....	73
Глава 4.	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	78
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
	ВЫВОДЫ.....	104
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	106
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

Эффективность эотаксин-зависимой миграции эозинофилов в ткани может зависеть от действия других медиаторов, выделяемых опухолевыми клетками. К таким факторам относят галектины – β -галактозид-связывающие белки, которые опосредуют перекрестное взаимодействие гликан-содержащих структур в составе цитокиновых и хемокиновых рецепторов, и, тем самым, модулируют ответ клеток на действие соответствующих лигандов [Fortuna-Costa A. et al., 2014]. По данным X. N. Ge et al. (2013), высокая экспрессия

галектина-3 усиливает эотаксин-1-опосредованный хемотаксис эозинофилов [Ge X. N. et al., 2013]. В отношении галектина-1 сведения литературы малочисленные и противоречивые, одни авторы указывают на способность данного лектина к привлечению и активации эозинофилов [Ge X. N. et al., 2016], другие – приводят данные о негативной регуляции галектин-1-опосредованного рекрутирования эозинофилов в ткани [Rao S. P. et al., 2017]. Эозинофилы способны экспрессировать галектин-3, связывающийся с молекулами VCAM (vascular cell adhesion molecule) 1 и галектином-3 на поверхности эндотелиоцитов, что обеспечивает их адгезию и миграцию в ткани с последующей реализацией функций [Ge X. N. et al., 2013].

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

Наряду с этим, эозинофилы (полифункциональные лейкоциты) являются источником цитокинов и ростовых факторов, что позволяет им влиять на пролиферацию опухолевых клеток и образование в опухоли новых кровеносных и лимфатических сосудов (неоангиогенез) [Duffy M. J. et al., 2011; Hirohito K. et al., 2011]. Эозинофилы секретируют трансформирующий фактор роста (TGF – transforming growth factor) β , проявляющий в процессе канцерогенеза дуализм свойств: действует как супрессор или промотор опухолевого роста в зависимости от типа опухоли и ее стадии [Шевченко В. Е. и соавт., 2017; Lin S. Y., Elledge S. J., 2003]. Вместе с тем, TGF β индуцирует

секрецию клетками сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF – vascular endothelial growth factor) и эпидермального ростового фактора (EGF – epidermal growth factor) [Lee S. H. et al., 2015]. Доказана роль VEGF и EGF в механизмах озлокачествления и прогрессии опухоли [Miller S. S. et al., 2016]. Взаимодействие EGF со своим рецептором активирует непосредственно пролиферацию опухолевых клеток [Tiash S., Chowdhury E. H., 2015]. Под влиянием VEGF происходит образование новых сосудов (кровеносных и лимфатических), участвующих в формировании метастазов опухоли [Rapisarda A., Melillo G., 2012]. Новообразования различных гистологических типов характеризуются высокой экспрессией в опухолевой ткани рецепторов VEGFR и EGFR, что может быть негативным фактором прогноза их клинического течения [Niyaz M. et al., 2015].

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

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

Инфильтрация опухолевой ткани эозинофилами – опухолиассоциированная тканевая эозинофилия (TATE – Tumor-Associated Tissue Eosinophilia) регистрируется при раке кожи, раке носоглотки, раке мочевого пузыря, раке шейки матки, колоректальном раке и др. [Saraiva A. L., Carneiro F., 2018; Hu G. et al., 2020; Choudhary N. et al., 2021]. В России

проблемой TATE практически не занимаются, при том, что эозинофильная инфильтрация опухоли (доступный легко верифицируемый гистологический параметр) может быть значимой в контексте прогноза опухолевых заболеваний.

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

Таким образом, роль эозинофила – компонента опухолевого микроокружения на сегодняшний день окончательно не определена. Механизмы кооперации эозинофилов и опухолевых клеток в патогенезе рака толстого кишечника требуют детального рассмотрения, учитывая

перспективность использования TATE в качестве фактора прогноза клинического течения болезни.

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

Задачи исследования:

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

Научная новизна. Впервые определены факторы взаимодействия эозинофилов и опухолевых клеток в патогенезе опухолеассоциированной тканевой эозинофилии и механизмах прогрессии опухоли при раке толстого кишечника. Установлена отрицательная связь между экспрессией опухолевыми клетками CCL11 и галектина-1, что обосновывает способность

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные фундаментальные данные об особенностях кооперации эозинофилов и опухолевых клеток при раке толстого кишечника существенно расширяют современные представления о роли опухолеассоциированной тканевой эозинофилии (TATE) в механизмах канцерогенеза. Установлено, что

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

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

Методология и методы исследования. Исследование выполнено в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий кафедрой – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН О. И. Уразова), патологоанатомическом отделении (заведующий – Л. Э. Ерендеева) ОГАУЗ

«Томский областной онкологический диспансер» («ТООД») (главный врач – канд. мед. наук М. Ю. Грищенко) и лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий инновационного парка Балтийского федерального университета им. И. Канта (г. Калининград) (заведующий – д-р мед. наук Л. С. Литвинова).

Для реализации поставленных задач были обследованы пациенты с диагнозом рака толстого кишечника (код по МКБ С18-С20) до проведения лечения. Группы исследования были сформированы в зависимости от присутствия/отсутствия эозинофилов в составе опухолевой ткани (Tumor-Associated Tissue Eosinophilia – TATE). Материалом исследования были образцы тканей толстого кишечника, полученные при операционном вмешательстве у больных раком толстого кишечника, и эозинофилы, выделенные из периферической крови у больных раком толстого кишечника и здоровых доноров, а также супернатанты культуральной суспензии эозинофильных гранулоцитов крови.

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

1. Оценка тканевой эозинофилии гистологическим методом.
2. Подсчет содержания (относительного и абсолютного) эозинофилов в периферической крови с помощью гематологического анализатора.
3. Оценка экспрессии галектинов (типов 1 и 3), CCL11, CCR3, EPX, VEGFR и EGFR методом иммуногистохимии.
4. Выделение эозинофилов (градиентное центрифугирование с иммуномагнитной сепарацией CD2, CD14, CD16, C19, CD56, CD123 и CD235a-негативных клеток) из цельной крови.
5. Культивирование эозинофилов крови без добавления и с добавлением рекомбинантного (r) интерлейкина-5.
6. Анализ экспрессии м-РНК гена *LGALS3* в эозинофилах крови методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

7. Измерение концентрации цитокинов $TNF\alpha$, $TGF\beta 1$, VEGF и EGF в супернатантах культуры эозинофилов периферической крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

8. Методы статистического анализа результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. При раке толстого кишечника галектин-1, экспрессируемый опухолевыми клетками, модулирует CCL11-опосредованное рекрутирование эозинофильных гранулоцитов в опухолевую ткань. Экспрессия галектина-3 опухолевыми клетками и эозинофилами крови не влияет на миграцию (зависимую от эотаксина-1) эозинофилов в ткань новообразования.

2. Тканевая эозинофилия (ТАТЕ) при раке толстого кишечника ассоциирована с высокой экспрессией эозинофильными гранулоцитами пероксидазы (ЕРХ) и *in vitro* гиперсекрецией цитокинов с противоопухолевыми свойствами – $TNF\alpha$ и $TGF\beta 1$.

3. Разобщение EGF/VEGF-опосредованной кооперации эозинофилов и опухолевых клеток в патогенезе рака толстого кишечника с ТАТЕ подтверждается отсутствием взаимосвязи *in vitro* секреции ростовых факторов EGF и VEGF эозинофилами крови с экспрессией EGFR и VEGFR в опухолевой ткани.

4. Связь тканевой эозинофилии с высокой цитотоксической (ЕРХ) и цитокинсекреторной ($TNF\alpha$ и $TGF\beta 1$) активностью эозинофилов, а также с низкой степенью инвазии опухоли и отсутствием лимфогенных метастазов свидетельствует о противоопухолевой роли эозинофильных гранулоцитов и ТАТЕ в механизме прогрессии рака толстого кишечника.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом клинико-лабораторного материала, использованием актуальных методов исследования и статистического анализа, адекватных поставленным цели и задачам. Формирование групп исследования проводили с соблюдением критериев

включения/исключения больных раком толстого кишечника и здоровых доноров. Основные положения научной работы докладывались и обсуждались на Объединенном иммунологическом форуме-2019 (Новосибирск, 24-29 июня 2019 г.), Всероссийской научной конференции «Патофизиология и фармакология системы крови», посвященной 35-летию НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (Томск, 10-11 октября 2019 г.), V Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, 16-18 декабря 2019 г.), VI Петербургском международном форуме «Белые ночи 2020» (Санкт-Петербург, 25-28 июня 2020 г.), научно-практической конференции с международным участием, посвященной 110-летию кафедры патологической физиологии им. академика А. А. Богомольца и памяти профессора Н. П. Чесноковой (Саратов, 25 ноября 2021 г.).

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

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

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 12 рисунками и 16 таблицами. Библиографический указатель включает 159 источников (12 отечественных и 147 иностранных).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования, подготовке публикаций по теме диссертационной работы. Результаты получены, проанализированы и

обобщены в выводах и положениях автором лично. Оформление диссертации, ее иллюстративного материала и автореферата выполнены соискателем самостоятельно.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиология, этиология и патогенез рака толстого кишечника

Злокачественные опухоли толстого кишечника характеризуются широкой распространенностью, трудностью ранней диагностики и высоким показателем летальности пациентов [Bray F. et al., 2018; Rawla P. et al., 2019; Каприн А. Д. и соавт., 2019].

Согласно эпидемиологическим данным международного агентства по изучению рака, в 2020 году выявлено более миллиона новых случаев рака толстого кишечника, который традиционно удерживает второе место (9,2 %) среди причин смерти от онкологических заболеваний и четвертое место (6,1 %) по числу вновь зарегистрированных случаев [Bray F. et al., 2018; Rawla P. et al., 2019].

Заболеваемость колоректальным раком значительно варьирует в разных странах. Самый высокий показатель заболеваемости раком толстого кишечника отмечается в Европе, Северной Америке и Австралии, особенно среди экономически обеспеченных групп населения и рассматривается как болезнь западного образа жизни. Соотношение показателя заболеваемости раком ободочной кишки у мужчин и женщин составляет 1:1, при этом рак прямой кишки достоверно чаще регистрируется у лиц мужского пола. Следует отметить, что рак ободочной кишки встречается в 2 раза чаще, чем новообразования прямой кишки [Calonge N. et al., 2008].

Общемировые тенденции эпидемиологии злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) находят отражение в статистических показателях и для населения России. В структуре онкологической заболеваемости мужского населения Российской Федерации опухоли ободочной кишки занимают пятое место (6,4 %), прямой кишки, ректосигмоидного соединения и ануса – шестое (5,3 %). У лиц женского пола

на четвертом месте располагаются новообразования ободочной кишки (7,2 %), на шестом – опухоли желудка (4,7 %), на седьмом – рак прямой кишки, ректосигмоидного соединения и ануса (4,4 %) [Каприн А. Д. и соавт., 2020].

В России более десяти лет подряд в рамках национальной программы осуществляются проекты, направленные на модификацию первичной и специализированной высокотехнологичной медицинской помощи онкологическим больным. Однако, несмотря на прилагаемые усилия, статистически значимого изменения абсолютного числа погибших от опухолевых заболеваний за последние 5 лет установлено не было. Проблема злокачественных новообразований ЖКТ актуальна также ввиду высокой смертности: рак толстого кишечника занимает второе место (15,3 %) по показателю смертности в структуре онкопатологии [Каприн А. Д. и соавт., 2020].

Врачи-онкологи обращают внимание также на показатель запущенности, отражающий долю опухолевых заболеваний, впервые выявленных лишь на IV стадии (согласно TNM классификации) опухолевого процесса. При раке желудка в 2020 году этот показатель оказался равным 39,9 %, при раке прямой кишки, который относится также к новообразованиям визуальной локализации, более 46,4 % [Каприн А. Д. и соавт., 2020].

Показатели онкологической заболеваемости и смертности населения Томской области сопоставимы со среднероссийскими [Каприн А.Д. и соавт., 2019, 2020]. В Томской области в 2019 году летальность на первом году с момента установления диагноза рака желудка составила 49 %, рака ободочной кишки – 31,8 %, рака прямой кишки, ректосигмоидного соединения и ануса – 25,5 % [Каприн А. Д. и соавт., 2020].

В целом, высокая заболеваемость и летальность рака органов ЖКТ, а также несвоевременность установления диагноза, обосновывают актуальность внедрения новых способов профилактики и разработки лечебно-диагностических подходов к онкологическим пациентам.

Злокачественные опухоли относятся к группе мультифакторных заболеваний, этиология возникновения которых включает факторы внешней среды и внутренние предрасполагающие факторы (особенности организма).

Распространенность колоректального рака зависит от географического региона, миграционных влияний, образа жизни, экологического неблагополучия, что свидетельствует о колоссальном вкладе экзогенных факторов в заболеваемость.

Согласно результатам эпидемиологических исследований, в этиологии злокачественных новообразований ЖКТ существенную роль играют особенности питания [Cheng X. J. et al., 2016; Sierra M. S. et al., 2016]. В исследованиях приводятся данные о взаимосвязи высокой заболеваемости раком толстого кишечника с употреблением острых, консервированных, копченых и жареных продуктов [Wiseman M., 2008; Cueva P. et al., 2016]. По мнению авторов, канцерогены пищи способны непосредственно взаимодействовать с эпителиальными клетками кишечника и инициировать мутации в генах, ответственных за клеточную пролиферацию. На моделях лабораторных животных показано, что высокий уровень хлорида натрия повреждает слизистую оболочку желудка, вызывает гибель клеток и регенеративную пролиферацию эпителия, что опосредует формирование воспаления и диффузной эрозии [Cheng X. J. et al., 2016]. Диета с высоким содержанием поваренной соли также ассоциирована с колонизацией слизистой оболочки желудка *H. pylori*, усиливая воспаление и повышая риск канцерогенеза [Crew K. D. et al., 2006; Cheng X. J. et al., 2016]. Многие мясные продукты содержат большое количество хлорида натрия и нитритов, при употреблении последних в организме образуются канцерогенные N-нитрозосоединения [Wiseman M., 2008; Loh Y. H. et al., 2011]. Полициклические ароматические углеводороды, образующиеся в процессе термической обработки мясных продуктов, также реализуют свои

канцерогенные эффекты и повышают риск возникновения злокачественных новообразований ЖКТ [Sierra M. S., Forman D., 2016].

Канцерогенный эффект предполагается также у алкоголя. Риск опухолевой трансформации связывают с прямым мутагенным действием ацетальдегида (метаболита этанола) на клетки слизистой оболочки пищевода, желудка и толстого кишечника, а также с дефицитом фолиевой кислоты (за счет уменьшения абсорбции фолата и выключения ферментов) и как следствие нарушением репарации ДНК в клетках эпителия, ослаблением системы антиоксидантной защиты организма [Cheng X. J. et al., 2016; Sierra M. S., Forman D., 2016; Cueva P. et al., 2016].

Еще один способствующий фактор – курение опосредует формирование аденоматозных полипов (предраковое состояние) в ободочной и прямой кишках [Cueva P. et al., 2016; Sierra M. S., Forman D., 2016]. Канцерогены, содержащиеся в табаке (нитрозамины) и табачном дыме (ариламины, полициклические ароматические углеводороды), способны инициировать мутационные или эпигенетические изменения в генах *KRAS* (*kirsten rat sarcoma virus*) и *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*), выявляемые в большинстве случаев рака толстого кишечника у человека [Sierra M. S., Forman D., 2016]. Профессиональные вредности, ассоциированные с занятостью человека в угольной отрасли, также повышают риск возникновения злокачественных новообразований ЖКТ [Crew K. D., Neugut A. I., 2006].

Ключевыми предрасполагающими факторами развития рака толстого кишечника являются хроническое воспаление и полипы толстого кишечника, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, метаплазия кишечника, семейный аденоматозный полипоз [Leung W. K. et al., 2008; Cheng X. J. et al., 2016; Sierra M. S., Forman D., 2016]. В канцерогенезе принимают участие генетические факторы, определяя особенности воспалительных и иммунных реакций макроорганизма. Известны гены, полиморфные варианты которых

напрямую участвуют в процессе трансформации клеток (за счет нарушения деления, репарация ДНК и т.д.) [Cheng X. J. et al., 2016]. Наследственную форму рака (встречается в 8-15 % случаев) предполагают, если у нескольких родственников выявлены злокачественные новообразования одной локализации, причем у одного из членов семьи опухоль обнаружена в возрасте до 50 лет [Cheng X. J. et al., 2016; Sierra M. S., Forman D., 2016]. Наиболее распространенной наследственной формой рака толстого кишечника является синдром Линча, в основе патогенеза которого лежат мутации в генах *MSH2* и *MLH1*, опосредующие нарушения репаративных процессов в клетке и ошибки репликации ДНК [Saif M. W., Chu E., 2010]. Мутация в гене *APC* (*adenomatous polyposis coli*) через сложные сигнальные пути приводит к потере гена-супрессора опухолевого роста *p53* и определяет развитие семейного аденоматозного полипоза [Saif M. W., Chu E., 2010; Mishra J. et al., 2013]. Инактивирующие мутации гена *APC* приводят к гиперактивации сигнального Wnt/ β -катенин пути, в результате чего β -катенин накапливается в клеточном ядре, где активирует транскрипцию протоонкогена *MYC* и ряда других генов, что приводит к нарушению регуляции деления и дифференцировки клеток кишечного эпителия [Armaghany T. et al., 2012, Dow L.E. et al., 2015]. Мутация протоонкогена *KRAS* и, напротив, инактивация гена-супрессора *TP53* еще больше стимулируют рост аденомы и способствуют ее злокачественной трансформации [Muller M. F. et al., 2015]. Все наследственные формы опухолей характеризуются ранним возрастом начала заболевания и быстрой его прогрессией [Mishra J. et al., 2013].

Подавляющее большинство спорадических злокачественных новообразований толстого кишечника развивается из аденоматозных и зубчатых полипов. Риск злокачественного перерождения полипа толстой кишки размером менее 1 см составляет 1,1 %, размером 1-2 см – 7,7 % и более 2 см – свыше 40 % [Conteduca V. et al., 2013]. При аденоматозном (наиболее распространенном) варианте из-за постепенного накопления генетических и

эпигенетических изменений новообразование проходит последовательно стадии аденомы (малой и крупной) и аденокарциномы. В патогенезе колоректального рака, развивающегося из зубчатых полипов, центральную роль играет мутация онкогена *BRAF*, возникающая на ранних этапах злокачественной трансформации эпителиоцитов толстого кишечника. Белковый продукт этого гена, аналогично гену *KRAS*, участвует в работе сигнального пути RAS/RAF/MAPK. Результатом инактивации гена *BRAF* является конститутивная активация механизмов сигнальной трансдукции, что сопровождается увеличением интенсивности пролиферации и злокачественным перерождением клеток полипа [Felipe D. S. et al., 2013; Croci D. O. et al., 2016]. В целом, рак толстого кишечника является результатом постепенного перехода от нормальной ткани к диспластическому эпителию, а далее к карциноме.

Воздействие комплекса этиологических факторов вызывает мутации генов, регулирующих клеточное деление с активацией протоонкогенов и угнетением генов-супрессоров [Zhou Y. et al., 2016]. К протоонкогенам относятся гены, контролирующие пролиферацию клетки путем положительной регуляции клеточного цикла. Так, протоонкоген *erbB* кодирует рецептор эпидермального фактора роста (EGF – epidermal growth factor receptor), высокая экспрессия которого выявляется в опухолевых клетках в большей части эпителиальных новообразований. Под генами-супрессорами опухолевого роста подразумеваются гены системы репарации ДНК, индукторов апоптоза и ингибиторов клеточного деления (*TP53* и *CDKN1A*). Нарушение работы вышеописанных генов приводит к неконтролируемой пролиферации опухолевых клеток, ускользанию от запрограммированной гибели, выживанию наиболее агрессивных клеточных клонов и прогрессии заболевания [Заридзе Д. Г., 2004].

В механизмах опухолевой прогрессии ключевую роль играет кооперативное взаимодействие злокачественно трансформированных клеток с

элементами опухолевого микроокружения (включающего иммунокомпетентные клетки, кровеносные и лимфатические сосуды, строму) [Nissim B., Efraim A. H. et al., 2010; Duffy M. J., 2011; Yellapurkar S. et al., 2016]. Известно, что опухолевые клетки могут высвобождать во внеклеточную среду различные ростовые факторы и влиять тем самым 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 оказывать влияние на все этапы развития новообразования, включая инициацию, промоцию, прогрессию, инвазию и метастазирование [Ciardiello F. et al., 2006]. В литературе описаны особенности клеточной инфильтрации опухолей различных гистологических типов, а также подчеркивается необходимость изучения иммунокомпетентных клеток внутри опухоли. Среди клеток опухолевого инфильтрата наиболее часто рассматривают макрофаги, лимфоциты и нейтрофилы [Saraiva A. L., Carneiro F., 2018].

В состав опухолевого микроокружения могут входить эозинофильные гранулоциты – клетки со сложным рецепторным и гранулярным аппаратом [Caruso R. A. et al., 2004; Said M. et al., 2005; Davis B. P., 2014; Peurala E. et al., 2018]. Этот факт явился основой активного изучения эозинофилов крови и тканей в патогенезе опухолевого процесса.

1.2 Опухлеассоциированная эозинофилия крови и тканей (общие сведения)

При злокачественных новообразованиях различной локализации обнаруживается ассоциированная с опухолевым процессом эозинофилия крови (ТАВЕ – Tumour-Associated Blood Eosinophilia) и тканевая эозинофилия (ТАТЕ – Tumor-Associated Tissue Eosinophilia), причем эти реакции могут развиваться независимо друг от друга и иметь различное прогностическое

значение. Еще в 1981 г. D. Lowe et al. указывали на наличие корреляции между высоким содержанием эозинофилов в периферической крови и неблагоприятным исходом опухолевого процесса, в то время как тканевая эозинофилия рассматривалась авторами в качестве положительного признака болезни [Lowe D. et al., 1981].

Опухолеассоциированная тканевая эозинофилия (ТАТЕ) представляет собой инфильтрацию эозинофильными гранулоцитами опухоли, не связанную с некрозом или изъязвлением новообразования [Moezzi J. et al., 2000; Dorta R. G. et al., 2002; Jain M. et al., 2014; Peurala E. et al., 2018]. Впервые ТАТЕ была описана при раке шейки матки и характеризовалась наличием эозинофилов в качестве компонента внутри- и околоопухолевого инфильтрата, эозинофильные клетки при этом располагались небольшими группами. В некоторых областях гистологических препаратов опухолевые клетки, окруженные эозинофильными гранулоцитами, потеряли контакт с соседними элементами и располагались обособленно [Pearson E. J., Mennel R., 2013; Takeda H. et al., 2014]. Позднее ТАТЕ была описана при раке влагалища, раке кожи, раке носоглотки, раке тела матки, а также аденокарциноме желудка и толстого кишечника [Saraiva A. L., Carneiro F., 2018]. До настоящего времени ТАТЕ вызывает большой интерес ученых и врачей с позиции прогностического значения при опухолевом процессе ввиду того, что эозинофильная инфильтрация является легко верифицируемым гистологическим параметром. Оценка ТАТЕ реализуется при рутинном исследовании препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, что доступно специалистам любой лаборатории.

В исследованиях, направленных на установление значения ТАТЕ при онкопатологии, представлены весьма противоречивые сведения [Moezzi J. et al., 2000; Dorta R. G. et al., 2002; Jain M. et al., 2014; Peurala E. et al., 2018]. Одни авторы ассоциируют тканевую эозинофилию с благоприятным прогнозом заболевания, отсутствием сосудистой инвазии и высокой

дифференцированностью клеток опухоли [Harbaum L. et al., 2015; Peurala E. et al., 2018], другие исследователи показывают, напротив, корреляцию TATE с неблагоприятным прогнозом клинического течения болезни, низкой пятилетней выживаемостью пациентов и усилением неоангиогенеза [Said M. et al., 2005; Jain M. et al., 2014].

Следует отметить, что большинство ученых сходится во мнении о положительном значении присутствия эозинофилов в составе опухоли. Так, при раке шейки матки и раке желудка, сопровождающихся эозинофильной инфильтрацией, прогноз болезни оказался лучше, чем при опухолях той же локализации и клинической стадии без TATE [Nagtegaal I.D. et al., 2001]. Больные раком толстого кишечника с тканевой эозинофилией имели значительно более высокий показатель безрецидивной выживаемости, чем пациенты в отсутствие эозинофилов [Harbaum L. et al., 2015; Saraiva A. L., Carneiro F., 2018]. Однако по данным С. Н. Richards et al. (2012), связи между выживаемостью больных колоректальным раком и наличием эозинофилии не выявлено [Richards C. H. et al., 2012]. В ряде независимых исследований показана достоверная взаимосвязь между эозинофильной инфильтрацией опухоли и отсутствием очагов отдаленного метастазирования при раке толстого кишечника [Nagtegaal I. D. et al., 2001]. Другие авторы, оценивая количество эозинофилов в опухолевой ткани толстого кишечника, констатировали избыток изучаемых лейкоцитов в составе новообразований без метастазов [Saraiva A. L., Carneiro F., 2018]. Примечательно, что эозинофилы могут определяться во вторичных очагах опухолевого роста (метастазах) независимо от присутствия/отсутствия этих клеток в первичном опухолевом узле. По мнению I. D. Nagtegaal et al. (2001), существует обратная зависимость между количеством перитуморальных эозинофилов и частотой возникновения местных рецидивов рака толстого кишечника [Nagtegaal I. D. et al., 2001]. В свою очередь R. G. Dorta et al. (2002) оценивали связь TATE с выживаемостью больных плоскоклеточным раком полости рта и установили

наличие выраженной тканевой эозинофилии у 72 % пациентов, проживших более 5 лет без рецидива болезни [Dorta R. G. et al., 2002]. Продемонстрировано также, что опухоли данной локализации, ассоциированные с ТАТЕ, имели менее агрессивное клиническое течение [Falconieri G. et al., 2008].

В литературе представлены данные, касающиеся связи ТАТЕ с другими характеристиками опухолевого процесса, а именно с наличием воспаления, лимфатической, венозной и периневральной инвазии опухоли, а также со стадией болезни [Harbaum L. et al., 2015; Prizment A. E. et al., 2016; Saraiva A. L., Carneiro F., 2018]. Больные раком толстого кишечника, сопровождающимся тканевой эозинофилией, достоверно чаще находились на одной из начальных стадий болезни [Saraiva A. L., Carneiro F., 2018], а клетки, составляющие опухоль, характеризовались более высокой степенью дифференцированности с сохранением чувствительности к проводимой химиотерапии [Harbaum L. et al., 2015]. Тканевая эозинофилия часто сопряжена с присутствием в опухолевом инфильтрате других иммунокомпетентных клеток: лимфоцитов (CD8⁺, CD4⁺), нейтрофилов, макрофагов, тучных клеток и др. Последнее обосновывает участие эозинофильных гранулоцитов в локальном противоопухолевом иммунном ответе макроорганизма [Кузнецова И. А. и соавт., 2012; Harbaum L. et al., 2015]. Связь ТАТЕ с отсутствием сосудистой инвазии новообразования толстого кишечника также обосновывает эозинофилию как благоприятный прогностический фактор [Harbaum L. et al., 2015]. В ряде исследований продемонстрирована отрицательная динамика числа тканевых эозинофилов по мере прогрессирования новообразований [Kiziltas S. et al., 2008; Cho H. et al., 2016]. По мнению авторов, высокая степень ТАТЕ обнаруживается при дисплазиях, в то время как в ткани аденокарцином эозинофилы выявляются в значительно меньшем количестве. J. Moezzi et al. (2000) описали более высокий уровень ТАТЕ при аденокарциноме толстого кишечника по сравнению с инвазивной формой колоректального рака [Moezzi

J. et al., 2000]. Положительное влияние ТАТЕ подтверждается в экспериментальных исследованиях на лабораторных животных. Установлено, что рост имплантированных опухолей у мышей ингибируется в присутствии тканевой эозинофилии, при этом опухолевые клетки в окружении эозинофилов демонстрировали признаки деструкции [Lowe D. et al., 1981].

Зарубежные авторы публикуют также данные о том, что присутствие эозинофилов в опухоли либо не оказывает существенного влияния на опухолевый процесс, либо является признаком неблагоприятного прогноза заболевания [Alrawi S. J. et al., 2005; Said M. et al., 2005; Oliveira D. T. et al., 2012]. Так, M. Jain et al. (2014) описывают участие эозинофильных гранулоцитов в механизмах инвазии новообразования при раке полости рта [Jain M. et al., 2014]. Сходный вывод делают S. J. Alrawi et al. (2005) при локализации опухоли в области головы и шеи [Alrawi S.J. et al., 2005]. У больных раком полости рта с ТАТЕ регистрировалась более низкая выживаемость по сравнению с таковой у пациентов без эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани [Alrawi S.J. et al., 2005]. Метастазирование при плоскоклеточном раке полости рта также было ассоциировано с выраженной эозинофильной инфильтрацией ткани опухоли [Oliveira D. T. et al., 2012].

Следует отметить, что злокачественные новообразования на поздних стадиях могут сопровождаться не только ТАТЕ, но и значительным увеличением содержания эозинофилов в периферической крови [Lowe D. et al., 1981]. По мнению авторов, опухолеассоциированная гемическая эозинофилия (ТАВЕ) выявляется при рецидиве заболевания и может использоваться в качестве неблагоприятного прогностического критерия онкопатологии [Prizment A. E. et al., 2016; Lang M. et al., 2017]. Однако доказательств того, что эозинофилы, циркулирующие в крови, опосредуют опухолевую прогрессию в настоящее время нет.

Эозинофилия крови описана при опухолях тех же локализаций, что ТАТЕ, однако исследователи не обнаружили причинно-следственной связи в развитии указанных реакций. ТАВЕ регистрируется при раке почки, раке надпочечников, раке щитовидной железы, раке печени и желчного пузыря, липосаркоме и др. [Prizment A. E. et al., 2016; Lang M. et al., 2017].

Патогенез ТАВЕ до конца не понятен и, по-видимому, может реализоваться посредством разных путей. В большинстве случаев опухолеассоциированную гемическую эозинофилию рассматривают как ответ макроорганизма на проводимую противоопухолевую терапию. ТАВЕ описана как маркер устойчивости опухоли к лучевому воздействию и как реакция на применение химиотерапевтических препаратов [Vaibhav S.L. et al., 2018; Jain S. et al., 2018]. Приводятся данные о связи ТАВЕ с некрозом первичной опухоли и/или метастазов, а в случае рака поджелудочной железы – с диссеминированным некрозом жировой ткани. Метастатический рак может инициировать активацию кроветворения в костном мозге и, как следствие, усиление эозинофилопоэза. По мнению D. Lowe et al. (1981), развитие ТАВЕ при раке легкого может быть опосредовано дыхательной гипоксией, развивающейся в результате опухолевого поражения легочной ткани, а также вследствие курения [Lowe D. et al., 1981].

В целом, несогласованность выводов по поводу значения эозинофильной реакции в патогенезе опухолевого процесса обусловлено отчасти отождествлением тканевой и гемической эозинофилии. Детальное исследование ТАТЕ и ТАВЕ позволит выявить отличительные особенности в механизмах формирования этих реакций и их роль в опухолевом процессе. Примечательно, что изучение тканевых эозинофилов представляется особо информативным и перспективным ввиду того, что основные функции эозинофилов реализуются после их рекрутирования в ткани.

1.3 Механизмы рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в опухолевую ткань

Эозинофильные гранулоциты отличаются разнообразием внутриклеточных и поверхностных структур, особенностями биохимических процессов и адаптационных возможностей. В норме эозинофилы реализуют свои гомеостатические функции, главным образом, в слизистой оболочке дыхательного и желудочно-кишечного трактов [Rothenberg M. E., Hogan S. P., 2006; Saif M. W., Chu E., 2010; Rosenberg, H. F. et al., 2013]. Несмотря на то, что окончательное понимание роли эозинофилов в физиологических условиях в настоящее время не сформировано, очевидно, что эозинофилы способствуют дифференцировке и ремоделированию тканей, а также поддерживают эпителиальный барьер слизистых оболочек [Shamri R. et al., 2011].

Эозинофилы образуются в костном мозге, однако для реализации основных функций клетки должны мигрировать в орган-мишень. Эозинофилы циркулируют в кровотоке в среднем около 10 ч, затем под влиянием различных сигналов происходит их выход из кровеносных сосудов в ткани. Средняя продолжительность жизни тканевых эозинофилов составляет 48 часов, поврежденные и старые клетки подвергаются апоптозу в печени, селезенке и других паренхиматозных органах [Rothenberg M. E., 2006; Jain M. et al., 2014; Cho H. et al., 2016]. При различных заболеваниях (паразитарных, аллергических, онкологических) количество эозинофилов может значительно возрастать как в крови, так и в очаге воспаления [Park Y. M., Vochnner B. S., 2010].

Рекрутирование эозинофилов в ткань (в том числе, опухолевую) является многофакторным и многоэтапным процессом, включающим эозинофил-эндотелиальные взаимодействия через молекулы адгезии и локальную генерацию хемотаксических агентов, которые направляют движение клеток [Elsner J. et al., 2000].

Наиболее значимыми хемокинами для эозинофилов являются эотаксин-1 (CCL (C-C motif chemokine ligand) 11), эотаксин-2 (CCL24), эотаксин-3 (CCL26), интерлейкин (IL) 5 и RANTES (Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted) [Jain M. et al., 2014; Wang T. et al., 2016]. Эозинофилы конститутивно экспрессируют рецепторы CCR (C-C Chemokine Receptor type) 1 и CCR3 [Pope S. M. et al., 2005; Shamri R. et al., 2011]. CCR3 является β -хемокиновым рецептором, специфичным для эозинофилов, но впоследствии идентифицированным и на других группах клеток. CCR3 способен взаимодействовать с рядом хемокинов, включая основной специфичный CCL11, а также CCL24 и CCL26. На модели лабораторных животных показано, что эотаксин-1 и RANTES индуцируют миграцию эозинофилов в тканевые компартменты [Pope S. M. et al., 2005; Shamri R. et al., 2011]. Считается, что CCR3 значим для базального перехода эозинофилов в слизистую оболочку толстого кишечника. В исследованиях на линии мышей, дефицитных по гену *CCR3* (гомозиготы *CCR3*^{-/-}), было продемонстрировано семикратное снижение содержания эозинофильных гранулоцитов в слизистой оболочке толстого кишечника, при этом большинство эозинофилов задерживалось в субэндотелиальном пространстве [Humbles A. A. et al., 2002; Shamri R. et al., 2011]. Известно, что субэндотелий включает гладкомышечные клетки и фибробласты (источник эотаксина-1), которые обеспечивают градиент хемокинов, опосредующий миграцию клеток через стенку сосуда. Однако в отсутствие CCR3 эозинофилы остаются внутри субэндотелиального сосудистого пространства. В целом, CCR3 является необходимым для заключительного этапа рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в ткани [Humbles A. A. et al., 2002; Lee, J.-H. et al., 2007].

CCL11 является мощным и селективным эозинофильным хемоаттрактантом [Tian M. et al., 2016], о чем свидетельствует значительный дефицит эозинофилов в тканях у *CCL11*-дефицитной линии мышей [Rothenberg M. E. et al., 1999]. В норме CCL11 экспрессируется различными

типами клеток, а именно Т-лимфоцитами, эпителиальными клетками, эозинофилами, эндотелиальными клетками, фибробластами и др. [Cho H. et al., 2015]. Наиболее выраженная экспрессия CCL11 регистрируется в клетках эпителия желудочно-кишечного тракта, где располагается основной пул гомеостатических тканевых эозинофилов [Cho H. et al., 2016]. Эотаксин-1, помимо участия в рекрутировании эозинофилов, индуцирует их дегрануляцию в тканях, а также продукцию этими клетками активных форм кислорода [Rothenberg M. E. et al., 1999].

В группу С-С-хемокинов с множественными функциями относится также CCL5/RANTES, способный привлекать в очаг воспаления несколько подтипов лейкоцитов, включая эозинофилы [Elsner J. et al., 2000]. RANTES является хемокином, ответственным за селективный эозинофильный рекрутинг. Действие IL-5 на эозинофилы приводит к синергетическому увеличению их трансэндотелиальной миграции в ответ на RANTES и эотаксин-1. В свою очередь, IL-5 обуславливает дифференцировку лейкоцитов эозинофильного ряда, их миграцию в ткани и реализацию эффекторных функций. В очаге воспаления IL-5 способствует дегрануляции эозинофилов с высвобождением провоспалительных медиаторов [Brussino L. et al., 2018, Tashkin D. P. et al., 2018]. Хемотаксический эффект IL-5 продемонстрирован в экспериментальных исследованиях на лабораторных животных. У IL5-дефицитных мышей было зарегистрировано незначительное содержание тканевых эозинофилов и снижение абсолютного количества эозинофильных гранулоцитов в периферической крови [Rothenberg M. E., 2007; Blanchard C., Rothenberg M. E., 2009]. Специфическим рецептором для IL-5 является IL-5R, который состоит из уникальной IL-5-связывающей α -субъединицы и сигнальной β -цепи, необходимой для внутриклеточного проведения сигнала [Brussino L. et al., 2018; Tashkin D. P. et al., 2018]. Уровень экспрессии IL-5R на мембране эозинофилов определяет интенсивность миграции и функционирования этих клеток [Takatsu K., 2011; Rosenberg H. F. et al., 2013].

Влияние IL-5, CCL11 и RANTES усиливает сродство интегрина VLA (very late antigen) 4 (конститутивно экспрессируется эозинофилами) к соответствующему лиганду на эндотелии сосудов. VLA-4 также принимает участие в дегрануляции эозинофилов и выработке ими супероксид-анионов. По мнению L. Lintomen et al. (2008), данный интегрин может связываться с компонентами внеклеточного матрикса (фибриногеном и фибронектином), что пролонгирует выживаемость эозинофилов [Lintomen L. et al., 2008].

Следует подчеркнуть, что эффективность хемокин-зависимого механизма привлечения эозинофилов в ткани может зависеть от действия других факторов. В контексте опухолевой патологии такими факторами выступают галектины – β -галактозид-связывающие белки, участвующие в регуляции клеточной пролиферации, адгезии, миграции и др. [Rabinovich G. A. et al., 2007; Rao S. P. et al., 2007].

Известно, что галектины взаимодействуют с гликопротеинами в составе молекул адгезии, рецепторов для цитокинов и факторов роста. За счет перекрестного связывания гликан-содержащих структур галектины опосредуют формирование мембранных «сеток», изменяя тем самым распределение рецепторных структур в мембране. Галектин-опосредованная кластеризация рецепторов мембраны модулирует ответ клеток на действие различных цитокинов [Fortuna-Costa A. et al., 2014]. Галектины регулируют также образование контактов между клетками и элементами внеклеточного матрикса [Yang R. et al., 2008].

Среди всех лектинов при опухолевых заболеваниях наиболее хорошо изучены галектины 1-го и 3-го типов [Bartolazzi A. et al., 2018; Girotti M. et al., 2020]. Для галектина-1 характерна локализация на поверхности опухолевых и неопухолевых клеток, тогда как галектин-3 располагается преимущественно внутри клетки и участвует в механизмах сигнальной трансдукции [Liu F. et al., 2005]. Опухолевые клетки и компоненты микроокружения характеризуются дисбалансом экспрессии данных лектинов, что определяет степень

агрессивности опухоли и приобретение ею метастатического фенотипа [Ebrahim A. H. et al., 2014]. По сведениям X. J. He et al. (2014), изменение экспрессии галектинов-1,3 может не только усиливать пролиферативный потенциал опухолевых клеток, но и влиять на миграционную активность эозинофилов [He X. J. et al., 2014].

Механизм действия галектина-1 в отношении эозинофилов связан с тем, что этот лектин усиливает экспрессию адгезивных молекул [Ge X. N. et al., 2016]. По данным P. Savita et al. (2017) и S. P. Rao et al. (2017), делеция гена *галектина-1* у мышей сопровождалась угнетением рекрутирования эозинофилов в очаг воспаления [Rao S. P. et al., 2017; Savita P. et al., 2017]. В свою очередь, X. N. Ge et al. (2016) обнаружили, напротив, усиление миграции эозинофильных гранулоцитов и Т-лимфоцитов в слизистую оболочку дыхательного тракта, а также повышение количества эозинофилов в крови и костном мозге у мышей с бронхиальной астмой в условиях делеции гена *галектина-1* [Ge X. N. et al., 2016]. Вместе с тем, исследователи обнаружили различия эффектов внеклеточного галектина-1 в зависимости от его концентрации. В условиях низкой концентрации галектин-1 усиливал VCAM-1-опосредованную адгезию эозинофилов, повышал экспрессию CD49d на мембране эозинофильных гранулоцитов и не влиял на CCL11-зависимый механизм хемотаксиса эозинофилов в ткани. Галектин-1 в высокой концентрации, напротив, снижал экспрессию эозинофилами интегрина CD49d и CCR3, и инициировал апоптоз эозинофилов [Delbrouck C. et al., 2002].

Что касается галектина-3, то высокая его экспрессия обуславливает усиление миграции эозинофилов в опухоль при участии CCL11 [Ge X.N. et al., 2013]. При этом галектин-3 экспрессируется самими эозинофилами, и при взаимодействии с VCAM (vascular cell adhesion molecule) 1 и галектином-3 эндотелиоцитов обеспечивает адгезию клеток. Возможно также взаимодействие эндотелиального галектина-3 с $\alpha 4\beta 1$ -интегринами на поверхности эозинофилов, что наделяет данный лектин свойствами

адгезивной молекулы [Ge X.N. et al., 2013]. В механизмах рекрутирования эозинофильных гранулоцитов существенную роль играет не только мембранный, но и внутриклеточный галектин-3. По сведениям X. N. Ge et al. (2010), у мышей с бронхиальной астмой делеция гена галектина-3 сопровождалась существенным сокращением числа тканевых эозинофилов, угнетением показателей гуморального звена иммунного ответа и подавлением ремоделирования бронхов [Ge X. N. et al., 2010]. На адгезивные свойства галектина-3 модулирующее влияние оказывают и другие факторы хемотаксиса эозинофилов.

Наряду с вышеизложенным существуют альтернативные хемокин-независимые варианты привлечения эозинофильных гранулоцитов в ткани. По мнению С. Blanchard et al. (2009), некроз эпителиальных клеток является мощным хемоаттрактантом для эозинофилов и индуцирует секрецию трансформирующего фактора роста (TGF – transforming growth factor) β эозинофилами, способного вызывать ремоделирование эпителия [Blanchard С. et al., 2009]. Учитывая то, что эозинофилы мигрируют в направлении некротически измененных участков, некоторые ученые рассматривают присутствие эозинофилов в ткани злокачественных новообразований как результат гибели опухолевых клеток [Shamri R. et al., 2011]. Подтверждением этому явилось исследование, выполненное на модели меланомных клеток линии В16-F10, в котором продемонстрировано независимое от CD4⁺-Т-лимфоцитов раннее рекрутирование эозинофилов в некротические области новообразования. По сведениям S. A. Cormier et al. (2006), накопление эозинофилов независимо от активности Т-лимфоцитов, предполагает реализацию скорее механизмов врожденной резистентности, при которых миграция эозинофилов определяется хемотаксическим эффектом самой некротической ткани [Cormier S. A. et al., 2006]. Эозинофилы также могут реагировать на активированные компоненты системы комплемента посредством связывания его фрагментов (C3a, C5a и C3b) со специфическими

рецепторами. Кроме этого, эозинофилы экспрессируют Fc-рецепторы для иммуноглобулинов классов E, M, G и A. Особое значение для эозинофилов, ассоциированных с тканями слизистых оболочек дыхательного тракта и ЖКТ, играет взаимодействие с IgA, который инициирует дегрануляцию эозинофилов и способствует выживанию эозинофилов в ткани антиген-независимым способом [Shamri R. et al., 2011].

В целом, механизмы хемотаксиса эозинофилов в ткани весьма разнообразны и требуют дальнейшего изучения ввиду актуальности определения роли эозинофильных гранулоцитов в патогенезе заболеваний опухолевой природы.

1.4 Роль эозинофила в патогенезе опухолевых заболеваний

В строме любого новообразования помимо трансформированных клеток присутствуют нормальные клетки (фибробласты, эндотелиоциты, иммунокомпетентные клетки и др.), формирующие опухолевое микроокружение [Xing Y. et al., 2016]. Модулирующее действие элементов микроокружения может пролонгировать равновесное состояние между чувствительными и резистентными клонами клеток, обеспечивать условия для «дремлющего» состояния опухоли. Роль эозинофила в составе опухолевого микроокружения до сих пор не определена.

Начиная с 1879 года и в течение многих десятков лет эозинофил считался эффекторной клеткой, ассоциированной преимущественно с гельминтными инвазиями и аллергическими заболеваниями. За последние годы исследователям удалось констатировать более сложный набор функций эозинофилов, в литературе встречается все больше данных о значимости данной клетки в норме. Открытие функциональных возможностей эозинофилов привело к появлению исследований, направленных на изучение роли этих клеток в защитных реакциях организма против возбудителей

бактериальных и вирусных инфекций [Yousefi S. et al., 2008; Колобовникова Ю. В. и соавт., 2014]. Однако по-прежнему мало работ посвящено изучению опухолеассоциированной тканевой эозинофилии (ТАТЕ), а имеющиеся в литературе данные противоречивые [Moezzi J. et al., 2000; Dorta R. G. et al., 2002; Kiziltas S. et al., 2008; Gatault S. et al., 2012; Jain M. et al., 2014; Peurala E. et al., 2018].

Противоопухолевые эффекты эозинофилов обоснованы данными эпидемиологических исследований: у больных плоскоклеточным раком пищевода, раком желудка, раком головы и шеи, а также колоректальным раком с ТАТЕ было зарегистрировано увеличение выживаемости [Fernandez-Ascenero M. J. et al., 2000; Ellyard J. I. et al., 2007; Shamri R. et al., 2011]. При раке прямой кишки показатель пятилетней безрецидивной выживаемости ассоциировался с ТАТЕ в 72 % случаев [Dorta R. G. et al., 2002]. L. Harbaum et al. (2015), E. Peurala et al. (2018) связывают тканевую эозинофилию с такими благоприятными прогностическими критериями, как отсутствие сосудистой инвазии и высокая степень дифференцированности опухолевых клеток [Harbaum L. et al., 2015, Peurala E. et al., 2018]. По данным J. Moezzi et al. (2000), количество тканевых эозинофилов уменьшается по мере прогрессирования новообразования ободочной кишки [Moezzi J. et al., 2000]. В образцах тканей аденомы ободочной кишки авторы наблюдали выраженную ТАТЕ, тогда как аденокарцинома той же локализации не сопровождалась существенной инфильтрацией эозинофилов [Moezzi J. et al., 2000]. В другом исследовании представлены сходные результаты для опухолей толстого кишечника разной степени злокачественности [Kiziltas S. et al., 2008]. Метастатический плоскоклеточный рак полости рта имел также менее агрессивное течение при наличии ТАТЕ [Falconieri G. et al., 2008]. Имеются данные о снижении риска возникновения злокачественных опухолей у лиц, имеющих в анамнезе эозинофилию крови и аллергопатологию, что косвенно указывает на позитивную роль эозинофилов в опухолевом процессе [Gatault S. et al., 2012;

Сао С. et al., 2014]. Однако существуют противоречивые сведения относительно экспрессии эозинофилами поверхностных IgE-рецепторов. В отдельных работах продемонстрирована их экспрессия как с высоким, так и с низким сродством к IgE [Shamri R. et al., 2011].

В экспериментальных исследованиях установлено снижение заболеваемости фибросаркомой, индуцированной метилхолантреном, у линии трансгенных мышей с гиперэкспрессией IL-5 и TATE по сравнению с таковой у мышей дикого типа [Simson L. et al., 2007]. По мнению авторов, регрессия опухолей была связана с массивной внутри- и перитуморальной инфильтрацией эозинофилами. Более высокая частота развития опухолей наблюдалась, напротив, у мышей с дефицитом CCL11, сочетанном снижении концентрации IL-5 и CCL11, а также у мышей с отсутствием эозинофилов (линия dblGATA). Последующие *in vitro* исследования показали, что эозинофилы могут непосредственно уничтожать клетки фибросаркомы, что позволяет предполагать потенциальную роль этих клеток в качестве эффекторных в борьбе с опухолью [Сао С. et al., 2014].

Противоопухолевый механизм эозинофилов заключается в прямом цитотоксическом действии эозинофильных катионных белков, содержащихся в специфических гранулах этих клеток [Legrand F. et al., 2010]. Эозинофильные гранулы содержат главный щелочной протеин (МВР – major basic protein), эозинофильный катионный протеин (ЕСР – eosinophil cationic protein), эозинофильную пероксидазу (ЕРХ – eosinophil peroxidase) и эозинофильный нейротоксин (EDN – eosinophil-derived neurotoxin), доступные для очень быстрого высвобождения [Yousefi S. et al., 2012; Al-Muhsen S. et al., 2013; Esnault S. et al., 2013]. Типовой механизм действия эозинофильных белков заключается в изменении поверхностного заряда клеток, нарушении целостности липидного бислоя клеточной мембраны и, как следствие, повышении проницаемости последней. Отдельные протеины эозинофилов способны проявлять также нейротоксические свойства, функции РНКаз и

участвовать в образовании активных форм кислорода [Feng Y.H., Mao H., 2012; Fulkerson P.C., Rothenberg M.E., 2013; Ueki S. et al., 2016].

Так, F. Legrand et al. (2010) наблюдали высвобождение ECP, EDN и фактора некроза опухоли (TNF – tumor necrosis factor) α при совместном культивировании эозинофилов с клеточной линией рака толстого кишечника COLO 205 [Legrand F. et al., 2010]. Примечательно, что TNF α является одним из основных цитокинов, действие которого направлено на подавление опухолевого роста. TNF α способствует экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках и действует как мощный хемоаттрактант для клеток, стимулирует их фагоцитарную активность. Данный провоспалительный цитокин является белком острой фазы и эндогенным пирогеном, способным ингибировать онкогенез [Legrand F. et al., 2010; Shamri R. et al., 2011]. При сокультивировании эозинофилов с опухолевыми клетками желудка в присутствии другого цитокина (IL-4) ученые наблюдали гибель опухоли [Furbert-Harris P. M. et al., 2003]. В исследованиях *in vitro* показано, что эозинофилы, выделенные из периферической крови больных бронхиальной астмой, ингибировали рост злокачественных клеток простаты [Furbert-Harris P. M. et al., 2003]. Цитотоксичность эозинофилов в отношении опухолевых и эндотелиальных клеток была продемонстрирована на модели клеточной линии остеосаркомы мышей LM8 [Xing Y. et al., 2016]. Клетки LM8 не экспрессируют ген CCL11, в связи с чем исследователи создали CCL11-сверхэкспрессирующий клон клеток LM8-CCL11, который был инъецирован мышам подкожно для подтверждения функций эотаксина-1/CCL11 и самих эозинофилов при данном виде опухолей. В результате избыточной экспрессии CCL11 в опухолевой ткани LM8-CCL11 регистрировалась выраженная эозинофилия, при этом масса опухоли была снижена, а образование кровеносных сосудов замедлилось. При введении антагониста CCR3 миграция эозинофилов прекращалась и кровеносные сосуды восстанавливались. Авторы заключили, что именно тканевые эозинофилы эффективно повреждают

злокачественно-трансформированные клетки и эндотелиоциты, угнетают ангиогенез; CCL11 играет при этом значимую роль в модуляции опухолевого микроокружения, привлекая эозинофильные лейкоциты [Xing Y. et al., 2016].

Противоопухолевые эффекты эозинофилов связывают с особенностями рецепторного аппарата этих клеток. В *in vitro* исследовании клеточной культуры COLO 205 показана адгезия эозинофильных гранулоцитов к клеткам опухоли и активация эозинофилов путем CD11a/CD18-опосредованных контактов. Добавление анти-CD11a- и анти-CD18 блокирующих антител приводило к снижению цитотоксической активности эозинофилов [Legrand F. et al., 2010]. Кроме этого, в 2009 году F. Legrand et al. обнаружили на поверхности эозинофилов рецепторы, присущие $\gamma\delta$ T-клеткам [Legrand F. et al., 2009]. Активация рецепторов $\gamma\delta$ TCR/CD3 на эозинофилах приводила к высвобождению активных форм кислорода и эозинофильных катионных протеинов (EPX и EDN), и была вовлечена в эозинофил-опосредованную цитотоксичность и апоптоз опухолевых клеток *in vitro* [Legrand F. et al., 2009].

Еще одна противоопухолевая стратегия эозинофилов основана на способности этих клеток к иммуномодуляции. Эозинофилы традиционно ассоциируют с Th2-зависимым гуморальным иммунным ответом, предполагая их участие в IL-4-опосредованных противоопухолевых реакциях. Так, J. Mattes et al. (2003) показали, что регрессия висцеральных метастазов при T-лимфоцит-резистентной меланоме связана с эозинофилами, проникающими в опухолевую ткань. Напротив, CD8⁺-цитотоксические T-лимфоциты, привлекающие в опухоль макрофаги, не оказывали значимого влияния на рост новообразования в данной модели [Mattes J. et al., 2003].

Однако некоторые экспериментальные работы не подтверждают защитную роль эозинофилов против опухоли. В исследованиях, проводимых R. Shamri et al. (2011), мышам производили инъекцию клеток плазмоцитомы (линия J558L) и аденокарциномы молочной железы в сочетании с клетками, секретирующими IL-5. Несмотря на достижение значительной локальной

концентрации этого цитокина и быстрой инфильтрации ткани эозинофильными гранулоцитами, интенсивность роста опухоли не изменялась [Shamri R. et al., 2011]. По данным D. T. Wong et al. (1999), применение моноклональных антител, блокирующих IL-5, в модели плоскоклеточного рака полости рта у хомяков приводило к снижению опухолевой нагрузки [Wong D. T. et al., 1999].

Существует несколько предполагаемых механизмов, посредством которых эозинофилы участвуют в опухолевой прогрессии. Наиболее значимой является способность эозинофилов секретировать цитокины и факторы роста, опосредующие ремоделирование тканей и неоангиогенез [Shamri R. et al., 2011].

Известно, что эозинофилы взаимодействуют с тканевыми компонентами и, тем самым, поддерживают гомеостаз и восстановление/ремоделирование этой ткани. Однако следствием чрезмерной эозинофильной инфильтрации может быть явление фиброзирование, на что указывает ремоделирование и фиброз дыхательных путей у пациентов с тяжелой формой эозинофильной бронхиальной астмы. Эозинофилы могут взаимодействовать с фибробластами, эпителиальными и эндотелиальными клетками, инициируя их гиперплазию, влиять на дифференцировку миофибробластов и неоангиогенез. Описаны медиаторы, которые экспрессируются в том числе эозинофилами и участвуют в реакциях ремоделирования и пролиферации: трансформирующий фактор роста (TGF – transforming growth factor) β 1, эпидермальный фактор роста (EGF – epidermal growth factor), основной фактор роста фибробластов (bFGF – *basic fibroblast growth factor*), цитокины IL-4, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13 и IL-17, матриксные металлопротеиназы (MMPs – matrix metalloproteinases) и тканевые ингибиторы MMPs (TIMPs – tissue inhibitors of metalloproteinases) [Munitz A. et al., 2005; Ciardiello F. et al., 2006; Galizia G. et al., 2006; Duffy M. J. et al., 2011; Hirohito K. et al., 2011; Shamri R. et al., 2011].

Эозинофилы секретируют TGF β 1 – ключевой иммуносупрессорный цитокин, свойством которого является регуляция дифференцировки и пролиферации фибробластов и эпителиальных клеток [Hirohito K. et al., 2011]. Установлено, что эозинофилы экспрессируют TGF β 1 в носовых полипах, в результате чего формируются структурные аномалии в виде утолщения базальной мембраны и фиброзирование стромы. Нарботка эозинофилами TGF β 1 активирует пролиферацию фибробластов кожи и повышает синтез коллагена в легочной ткани [Hirohito K. et al., 2011]. По другим данным, в биоптатах ткани пищевода у больных эозинофильным эзофагитом обнаруживаются эозинофилы в состоянии дегрануляции, доказано их участие в ремоделировании стенки пищевода [Rosenberg H. F. et al., 2013]. По мнению S. S. Aceves et al. (2007), TGF β 1, секретируемый эозинофилами, и его сигнальная молекула SMAD2/3 опосредуют процесс фиброирования в эзофагальной субэпителиальной области [Aceves S. S. et al., 2007].

Примечательно, что в процессе канцерогенеза TGF β 1 реализует дуализм свойств: действует как промотор или супрессор опухолевого роста в зависимости от типа опухоли и ее стадии. Антипролиферативные свойства TGF β 1 связаны с активацией ингибиторов циклинзависимых киназ Cip/Kip и Ink4, опосредующей остановку клеточного цикла. Показана способность TGF β 1 стимулировать апоптоз эпителиальных и эндотелиальных клеток через модуляцию баланса про- (Bax) и антиапоптотических факторов (Bcl-2, Bcl-x1) [Inman G.J., Allday M.J., 2000]. Кроме этого TGF β 1, предположительно, может угнетать экспрессию гена hTERT, кодирующего активность теломеразы [Lin S.Y., Elledge S.J., 2003]. Проонкогенная активность TGF β 1 связана с его участием в реализации эпителиально-мезенхимального перехода, ангиогенеза и развитии иммуносупрессии [Бабышкина Н.Н. и соавт., 2010; Шевченко В. Е. и соавт., 2016, 2017]. При добавлении TGF β 1 в культуру эпителиальных клеток молочной железы (NmuMG) у мышей клетки приобретали мезенхимальный миграционный фенотип за счет снижения экспрессии E-кадгерина и

увеличения экспрессии $\alpha 3\beta 1$ интегринов [Schiemann W. P. et al., 2002; Dumont N. et al., 2003]. TGF β 1 способен также повышать экспрессию ферментов деградации внеклеточного матрикса, что в сочетании с изменением морфологии злокачественно трансформированных клеток и усилением их миграционной активности опосредует инфильтративный рост и метастазирование [Wahl S.M., Wen J., 2006]. Вместе с тем, TGF β 1 индуцирует экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor) – медиатора, регулирующего формирование новых сосудов (кровеносных и лимфатических) [Lee S. H. et al., 2015]. По сведениям В. Е. Шевченко и соавт. (2017), TGF β 1 является один из наиболее важных цитокинов, секретируемых в процессе формирования эпителиальных опухолей [Шевченко В. Е. и соавт., 2017].

Фактором, способствующим пролиферации эпителиальных и опухолевых клеток, является эпидермальный ростовой фактор (EGF), действие которого реализуется при связи с одноименным рецептором [Ciardiello F. et al., 2006; Duffy M. J. et al., 2011]. Последний экспрессируют многие клетки, в том числе, эпителиоциты, гладкомышечные и эндотелиальные клетки, макрофаги. Данный рецептор относится к семейству ErbB (receptor tyrosine kinases), взаимодействие EGFR с лигандом в физиологических условиях определяет формирование гомо- или гетеродимерных комплексов с другими членами этого семейства. В опухолевых клетках при гиперэкспрессии EGFR происходит лиганд-независимая димеризация этого рецептора и внутриклеточная трансдукция сигнала [Mendelsohn J., Baselga J., 2003]. Проведение сигнала внутрь клетки приводит к активации ряда протоонкогенов и синтезу онкогенных белков [Mendelsohn J. et al., 2003; Duffy, M. J. et al., 2011]. Опухоли с высокой экспрессией EGFR имеют неблагоприятный прогноз и характеризуются образованием очагов метастазирования [Lieto E. et al., 2008; Niyaz M. et al., 2015]. По мнению G. Galizia et al. (2006), экспрессия EGFR может рассматриваться как показатель прогноза возникновения

рецидива колоректального рака и низкой выживаемости пациентов после лечения [Galizia G. et al., 2006].

Еще одна способность эозинофилов, определяющая выживание и рост опухоли, это стимуляция ангиогенеза. Формирование новых капилляров из уже существующих контролируется балансом проангиогенных факторов и ингибиторов ангиогенеза. Неопластическим сосудам свойственна высокая проницаемость и отсутствие четкой организации сосудистой сети, что сопровождается формированием очагов гипоксии. Эозинофилы в условиях гипоксии демонстрируют высокую выживаемость и активную секрецию проангиогенных медиаторов, а именно, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) [Nissim Ben Efraim A. H. et al., 2010]. Эозинофилы способствуют пролиферации эндотелиальных клеток (прямой проангиогенный эффект) за счет активации рецепторов к VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) [Nissim Ben Efraim A. H. et al., 2010; Shibuya M., 2011]. I. Puxeddu et al. (2005) на модели хорион-аллантаисных мембран куриных эмбрионов показали, что эозинофилы *in vitro* стимулируют пролиферацию эндотелиальных клеток и образование новых кровеносных сосудов [Puxeddu I. et al., 2005]. По данным M. Shibuya (2011), у мышей с дефицитом лиганд-связывающего домена VEGFR новообразования толстого кишечника характеризовались более медленным ростом и низким уровнем метастазирования [Shibuya M., 2011]. Показано, что VEGFR могут экспрессировать не только эндотелиоциты, но и злокачественно трансформированные клетки простаты, щитовидной железы и матки [Rodriguez-Antona C. et al., 2010; Takatsu K., 2011], что обосновывает способность VEGF регулировать в том числе пролиферацию опухолевых клеток. Предполагается, что данный ангиогенный фактор, высвобождаемый опухолевыми клетками и элементами микроокружения, через VEGFR может выступать в роли промотора деления как эндотелиоцитов, так и самих опухолевых клеток [Pallares J. et al., 2006; Rodriguez-Antona C. et al., 2010]. В

целом, эозинофилы могут способствовать неоангиогенезу и опухолевой прогрессии, с одной стороны, за счет прямого пролиферативного влияния на опухолевые клетки, а с другой, – посредством доставки им кислорода и питательных веществ из вновь образованных сосудов [Ferrara N., 2004; Ciardiello F. et al., 2006; Nissim Ben Efraim A. H. et al., 2010; Shamri R. et al., 2011].

Таким образом, эозинофилы в составе опухолевого микроокружения могут оказывать влияние на злокачественно трансформированные клетки и, тем самым, активировать или подавлять пролиферацию и инвазивный рост опухоли, модулировать формирование в ней локальной сосудистой сети, обеспечивающей пути метастатического распространения опухоли. Изучение молекулярных механизмов межклеточной кооперации эозинофильных гранулоцитов и опухолевых клеток позволит сформировать представление о роли опухолеассоциированной тканевой эозинофилии (ТАТЕ) в патогенезе онкологических заболеваний.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Клиническая характеристика обследованных лиц

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

В исследование были включены 98 пациентов с диагнозом рака толстого кишечника (код по МКБ С18-С20) – 55 женщин и 43 мужчины (средний возраст $65,4 \pm 4,6$ лет). Согласно международной TNM-классификации (8 Edition AJCC, 2009 г.) среди больных колоректальным раком у 42 человек была установлена I стадия заболевания (T1N0M0, T2N0M0, T3N0M0), у 19 больных – II стадия (T4N0M0), у 28 – III стадия (T4N1M0) и у 9 – IV стадия болезни (T3N1M1, T4N1M1). Все пациенты проживали на территории г. Томска и Томской области, и находились на лечении в ОГАУЗ «ТООД» (г. Томск) в период с 2018 по 2020 годы. Включение пациентов в диссертационное исследование осуществляли при непосредственном участии врачей В. Г. Круглова и Д. А. Шкатова. Контрольная группа была сформирована на базе клинико-диагностической лаборатории ОГАУЗ «ТООД» (заведующий – д-р мед. наук А. И. Дмитриева). В контрольную группу вошли 17 условно здоровых доноров (9 женщин и 8 мужчин, средний возраст $63,0 \pm 5,9$ лет, II-IIIa группа здоровья).

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

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

Описание анатомического распространения опухолевого процесса у пациентов с раком толстого кишечника проводили в соответствии с международной TNM классификации (8 Edition AJCC, 2009 г.). Гистологический тип рака толстого кишечника определяли согласно «Международной гистологической классификации» (ВОЗ, 2010), степень дифференцированности клеток опухоли – согласно клиническим рекомендациям по диагностике и лечению опухолей («Ассоциация онкологов России», 2018). Новообразования разделяли на высокодифференцированные (более 95 % опухолевых клеток образуют железистые структуры), умереннодифференцированные (50 – 95 % опухолевых клеток формируют железистые структуры), низкодифференцированные (5 – 49 % вовлечены в формирование железистых структур) и недифференцированные (менее 5 % злокачественных клеток образовывали железистые структуры). У 74 (75,5 %) человек с диагнозом рака толстого кишечника была идентифицирована высоко- и умереннодифференцированная аденокарцинома, у 24 (24,5 %) пациентов – низкодифференцированная аденокарцинома.

Оценку морфологических характеристик опухоли и отнесение ее к соответствующему гистологическому типу проводили при участии врачей-патологоанатомов – д-р мед. наук И. Л. Пурлика и Г. Г. Шимончук.

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

Для решения поставленных задач были сформированы группы исследования в зависимости от присутствия/отсутствия эозинофилов в составе опухолевой ткани (Tumor-Associated Tissue Eosinophilia – TATE). Основную группу исследования составили больные раком толстого кишечника с TATE, группу сравнения – больные колоректальным раком без TATE, контрольную группу – условно здоровые доноры (Рисунок 1).

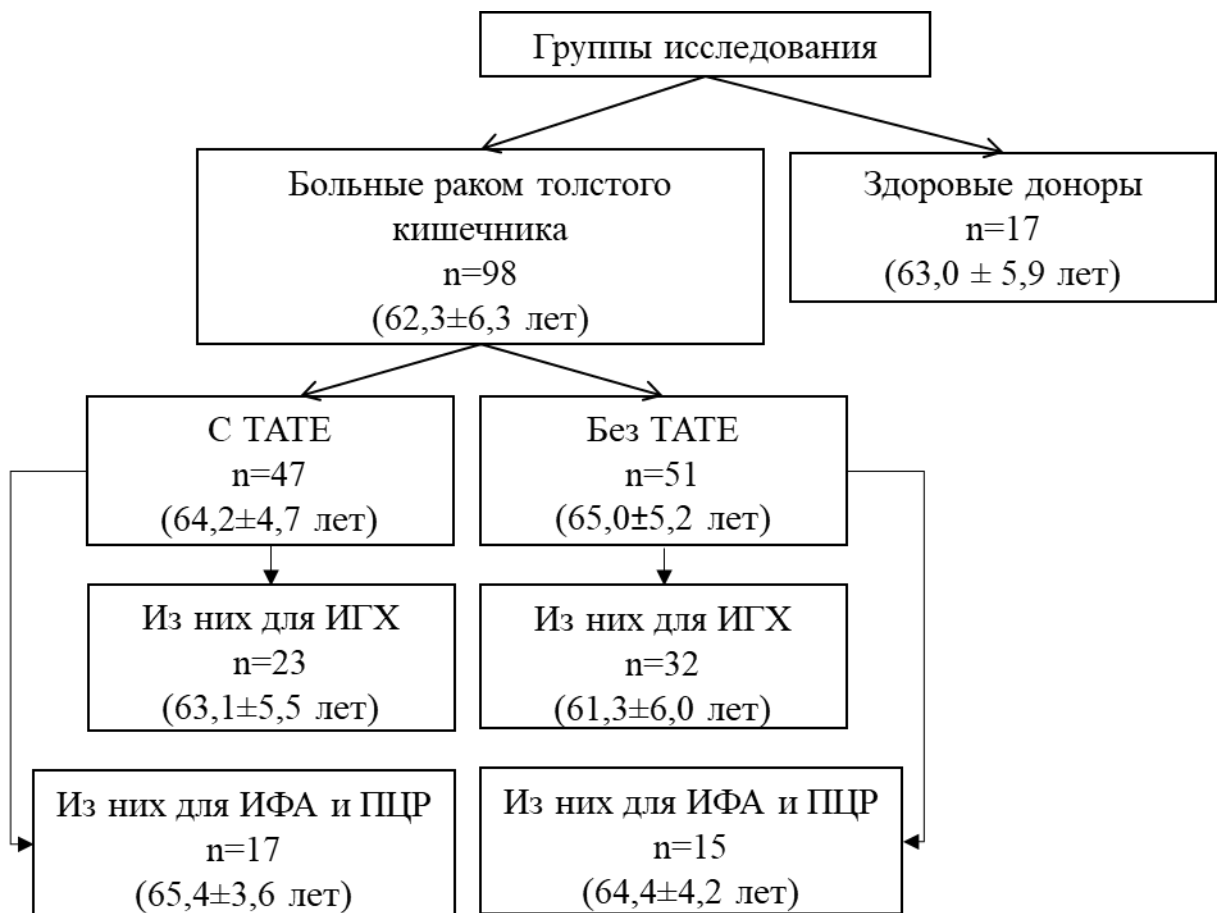


Рисунок 1 – Группы исследования.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии в опухолевой ткани эотаксина-1 – CCL (C-C motif chemokine ligand) 11 и его рецептора CCR (C-C Chemokine Receptor type) 3, галектинов 1 и 3, эозинофильной пероксидазы

(EPX – eosinophil peroxidase), рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR – Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) и рецептора эпидермального фактора роста (EGFR – Epidermal Growth Factor) было выполнено на гистологических препаратах рака толстого кишечника (всего 55 образцов), из них 23 образца опухолевой ткани с эозинофильной инфильтрацией и 32 гистологических препарата без тканевой эозинофилии. Для изучения *in vitro* секреции цитокинов: фактора некроза опухоли (TNF – tumor necrosis factor) α , трансформирующего фактора роста (TGF – Transforming Growth Factor) β 1, сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и эпидермального фактора роста (EGF) эозинофилами периферической крови и оценки экспрессии м-РНК гена галектина-3 в эозинофильных гранулоцитах в основную группу вошли 17 больных колоректальным раком, сопровождающимся ТАТЕ, (средний возраст $65,4 \pm 3,6$ лет), в группу сравнения – 15 пациентов без эозинофилии (средний возраст $64,4 \pm 4,2$ лет). Изучение клинико-морфологических характеристик рака толстого кишечника (степень инвазии и дифференцированности, присутствие регионарных и отдаленных метастазов) во взаимосвязи с ТАТЕ осуществляли на выборке объемом 98 человек, включая 51 больного раком толстого кишечника с ТАТЕ (средний возраст $64,2 \pm 4,7$ лет) и 47 пациентов с раком толстого кишечника без тканевой эозинофилии (средний возраст $65,0 \pm 5,2$ лет).

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

2.2 Материал исследования

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

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

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

2.3 Методы исследования

2.3.1 Оценка эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани толстого кишечника

Оценку тканевой эозинофилии проводили на гистологических препаратах рака толстого кишечника, предварительно окрашенных гематоксилином и эозином, полуколичественным способом с использованием светового микроскопа Leica DM2000 («Leica Microsystems», Германия). Тканевые эозинофилы подсчитывали в участках максимального скопления данных

клеток, т.е. в «горячих точках», оценивали не менее 20 полей зрения ($\times 400$). Если среднее содержание тканевых эозинофилов превышало 10 клеток в одном поле зрения, то констатировали опухолеассоциированную тканевую эозинофилию (ТАТЕ) (Рисунок 2). Наличие единичных эозинофилов (среднее число 0 – 10 клеток в поле зрения) рассматривали как отсутствие ТАТЕ [Cho H. et al., 2016; Pehlivanoglu B. et al., 2016].

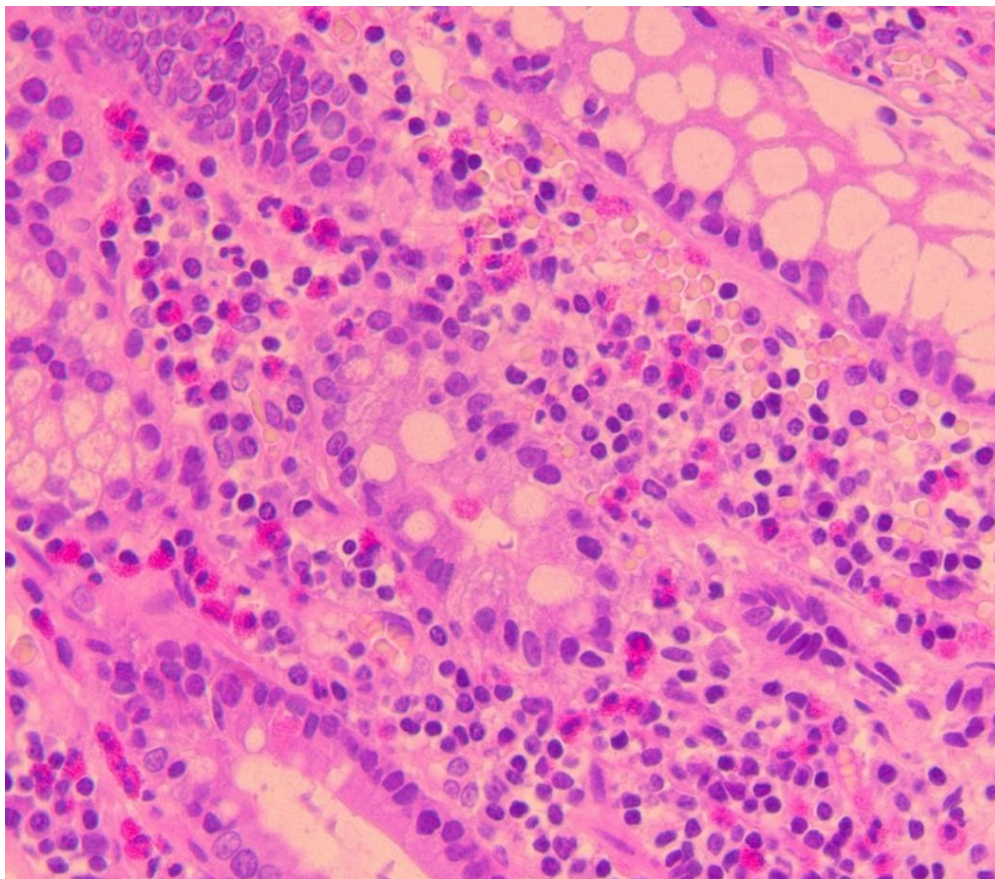


Рисунок 2 – Рак ободочной кишки с ТАТЕ. Окрашено гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 400$.

2.3.2 Оценка экспрессии CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани толстого кишечника

Экспрессию CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани толстого кишечника оценивали методом иммуногистохимии на парафиновых срезах в соответствии со стандартной методикой [Петров С. В., Райхлин Н. Т., 2004]

при использовании автоматического иммуногистостейнера «Bond-maX» («Leica Biosystems», Германия).

Принцип метода. Основу метода составляет реакция «антиген-антитело». Первичные немаркированные антитела соединяются с регистрируемым антигеном, которые далее идентифицируются при помощи вторичных антител, меченных флуорохромом. Последующее внесение фермента и буферных растворов обуславливает накопление окрашенного продукта реакции.

Ход работы. Экспрессию CCL11 и CCR3 в опухолевой ткани толстого кишечника оценивали в «горячих точках» – участках максимальной экспрессии изучаемого параметра, что является более воспроизводимым в сравнении со случайным выбором полей зрения. При анализе экспрессии CCL11 подсчитывали относительное содержание положительно окрашенных опухолевых клеток (выражали в %), учитывая цитоплазматическую локализацию данного хемокина. Экспрессию комплементарного рецептора CCR3 регистрировали на мембране «неопухолевых клеток» (клетках опухолевого микроокружения) и вычисляли процентное содержание позитивно окрашенных клеток [Cho H. et al., 2016; Gong D. H. et al., 2016]. Выполняли подсчет не менее 300 клеток. В исследовании применяли моноклональные антитела к CCL11 (клон EPR5825, рабочее разведение 1:100, кроличьи) и CCR3 (клон Y31, рабочее разведение 1:100, кроличьи) фирмы «Abcam» (Великобритания).

2.3.3 Оценка экспрессии галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани толстого кишечника

Экспрессию галектинов (типов 1 и 3) в опухолевой ткани толстого кишечника оценивали методом иммуногистохимии на парафиновых срезах в соответствии со стандартной методикой [Петров С. В., Райхлин Н. Т., 2004]

при использовании автоматического иммуногистостейнера «Bond-maX» («Leica Biosystems», Германия), принцип метода описан в п. 2.3.2.

Ход работы. Экспрессию галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани толстого кишечника оценивали в «горячих точках». Определяли процентное содержание положительно окрашенных опухолевых клеток с учетом мембранной и цитоплазматической локализации галектинов-1,3. Выполняли подсчет не менее 300 клеток. В исследовании использовали антитела к галектину-1 (поликлональные, рабочее разведение 1:500, кроличьи) фирмы «GeneTex» (Канада) и галектину-3 (клон 9C4, RTU, мышинные) фирмы «Cell Marque» (США).

2.3.4 Оценка экспрессии EGFR и VEGFR в опухолевой ткани толстого кишечника

Экспрессию рецепторов эпидермального ростового фактора (EGFR) и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR) в опухолевой ткани толстого кишечника оценивали методом иммуногистохимии на парафиновых срезах в соответствии со стандартной методикой [Петров С. В., Райхлин Н. Т., 2004] при использовании автоматического иммуногистостейнера «Bond-maX» («Leica Biosystems», Германия), принцип метода описан в п. 2.3.2.

Ход работы. При анализе экспрессии в опухолевой ткани EGFR и VEGFR оценивали относительное количество положительно окрашенных опухолевых клеток, несущих на мембране указанные рецепторы [Туманский В. А., Евсеев А. В., 2014; Niyaz M. et al., 2015]. Проводили подсчет не менее 300 клеток в областях с максимальной экспрессией данных рецепторов. В исследовании использовали антитела к EGFR (клон EGFR.25, RTU, мышинные) и VEGFR (клон KLT9, рабочее разведение 1:100, мышинные) фирмы «Novocastra» (Leica Biosystems, Германия).

2.3.5 Оценка экспрессии эозинофильной пероксидазы в опухолевой ткани толстого кишечника

Экспрессию эозинофильной пероксидазы (ЕРХ – маркерного фермента эозинофилов) в опухолевой ткани толстого кишечника оценивали методом иммуногистохимии на парафиновых срезах в соответствии со стандартной методикой [Петров С. В., Райхлин Н. Т., 2004] при использовании автоматического иммуногистостейнера «Bond-maX» («Leica Biosystems», Германия), принцип метода описан в п. 2.3.2.

Ход работы. Экспрессию ЕРХ оценивали в цитоплазме «неопухолевых клеток» в зависимости от интенсивности окрашивания по 3-х бальной шкале – слабая (1 балл), средняя (2 балла) и выраженная (3 балла). Подсчитывали относительное количество положительно окрашенных клеток опухолевого микроокружения (выражали в %). Анализировали не менее 300 клеток в областях с максимальной экспрессией данного фермента. Для оценки степени выраженности экспрессии ЕРХ рассчитывали показатель экспрессии (ПЭ) – сумму произведений баллов интенсивности окрашивания (1-3) и количества клеток (%) с соответствующей интенсивностью окрашивания (А – с интенсивной, В – с умеренной, С – со слабой) по формуле [Петров С. В., Райхлин Н. Т., 2004]: $ПЭ = 3 \times A + 2 \times B + 1 \times C$ (%).

В исследовании использовали антитела к ЕРХ (клон АНЕ-1, рабочее разведение 1:200, мышинные) фирмы «eBiosciences» (США).

2.3.6 Выделение и культивирование эозинофилов периферической крови

Выделение эозинофилов из цельной крови проводили методом иммуномагнитной сепарации с использованием набора реагентов Eosinophilisolationkit (MiltenyiBiotecGmbH, Германия).

Принцип метода. Гранулоциты крови осаждаются в соответствии с их плотностью в определенном градиенте. Технология биомагнитного сепарирования клеток основана на применении магнитных полистирольных микрогранул, покрытых моноклональными антителами, специфичными к поверхностному маркеру целевой клеточной популяции. Под действием магнитного поля клетки одной популяции, ассоциированные с магнитными микрочастицами, удерживаются в сепараторе, тогда как супернатант содержит клетки, не связанные с магнитными микрогранулами.

Ход работы. Выделение эозинофилов из цельной крови (взятой в количестве 20 мл) выполняли методом иммуномагнитной сепарации согласно инструкции коммерческого набора «Eosinophil isolation kit» фирмы «Miltenyi Biotec GmbH» (Германия). Сначала венозную кровь наслаивали на градиент плотности фиколла ($\rho=1,077$ г/мл) и центрифугировали при 600 g в течение 30 мин. Плазму и мононуклеарные лейкоциты отбирали, к оставшейся части добавляли лизирующий раствор (Red Blood Cell Lysis Solution), инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 300g 8 мин при 20 °C и полностью удаляли супернатант. Клетки промывали буфером и переходили к этапу пробоподготовки магнитного мечения. Количество клеток в суспензии стандартизировали до 1×10^6 /мл. Идентификацию эозинофилов проводили путем удаления клеток, не относящихся к эозинофильной популяции. «Неэозинофилы» помечали коктейлем из биотин-конъюгированных антител к CD2, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123 и CD235a (добавляли Biotin-Antibody Cocktail в объеме 10 мкл на 10^6 клеток) в качестве основного реагента-метки, а также антибиотиновыми моноклональными антителами (добавляли Anti-Biotin MicroBeads в объеме 20 мкл на 10^6 клеток), конъюгированными с микрогранулами (вторая метка). Меченные клетки, не относящиеся к эозинофилам, удаляли из раствора за счет удерживания их в магнитном поле MACS-колонки MACS-сепаратора, в то время как немеченые CD16-негативные эозинофилы вымывали из колонки. Собирали весь

вышедший из колонки элюент, содержащий обогащенную фракцию эозинофилов. Выделенные эозинофилы культивировали с целью оценки их цитокинсекреторной функции, а также использовали для проведения метода ПЦР (п. 2.3.8).

Культивировали эозинофилы в полной питательной среде RPMI-1640 в CO₂-инкубаторе в газовой смеси, содержащей 5 % углекислого газа при температуре 37 °С в течение 48 ч без добавления и с добавлением рекомбинантного (r) интерлейкина-5 (r-IL-5) («Biosource», Бельгия) в дозе 10⁻⁸ г/мл. Супернатанты культуральной суспензии эозинофилов отбирали в эппендорфы и хранили при температуре -80 °С. Далее супернатанты использовали для количественного определения цитокинов (п. 2.3.7).

2.3.7 Определение концентрации цитокинов в супернатантах суспензионной культуры эозинофилов крови

Для оценки содержания цитокинов TNF α , TGF β 1, VEGF и EGF в супернатантах культуральных суспензий эозинофилов крови использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа.

Принцип метода основан на конъюгации одного из эпитопов молекулы исследуемого цитокина с моноклональными антителами, сорбированными на твердой фазе микропланшета, с формированием комплекса «антиген – антитело». Добавление биотинилированных моноклональных антител, распознающих другой независимый эпитоп цитокина, опосредует образование «сэндвича». Идентификация комплекса проводится после внесения субстрата фермента, определяющего цветную реакцию, интенсивность которой пропорциональна концентрации цитокина в анализируемой пробе.

Ход работы. Исследование содержания TNF α в культуральной жидкости проводили по инструкции, предлагаемой производителем коммерческого набора «Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). Во все лунки планшета вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов. Далее в

соответствующие лунки добавляли по 100 мкл калибровочного, контрольного и анализируемого образцов, инкубировали 120 мин, встряхивая на шейкере при температуре 37 °С. По окончании инкубации планшет промывали пять раз, далее во все лунки добавляли по 100 мкл биотинилированных поликлональных антител к TNF α с последующей инкубацией в течение 60 мин при соблюдении тех же условий. Далее проводили пятикратную промывку лунок с последующим внесением раствора стрептавидин-пероксидазы хрена и повторной тридцатиминутной инкубацией. Снова промывали планшет 5 раз, вносили в лунки по 100 мкл тетраметилбензидина плюс и инкубировали 25 мин при комнатной температуре. По завершении инкубации в лунки вносили стоп-реагент. Измеряли оптическую плотность содержимого лунок планшета на фотометре-анализаторе «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию TNF α определяли по калибровочной кривой, результат выражали в пг/мл.

Исследование содержания TGF β 1 в супернатантах культуральных суспензий эозинофилов крови проводили в соответствии с протоколом коммерческого набора «DRG® TGF β 1 ELISA» («DRG International, Inc.», США). Растворы стандартов, контролей и анализируемых образцов (предварительно разведенных) вносили в соответствующие ячейки планшета в объеме 100 мкл и инкубировали 180 мин при комнатной температуре. Далее лунки планшета промывали 3 раза промывочным буфером (по 300 мкл на лунку), после чего в лунки вносили по 100 мкл раствора моноклональных анти-TGF β 1-антител и инкубировали 120 мин с последующей троекратной отмывкой. В лунки добавляли по 100 мкл раствора антител, конъюгированных с биотином, и оставляли при комнатной температуре на 45 мин. Вновь промывали планшет и вносили по 100 мкл раствора стрептавидин-пероксидазы. После инкубации (45 мин) лунки планшета трижды промывали и добавляли по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Повторная 15-минутная инкубация завершалась внесением 50 мкл стоп-реагента.

Оптическую плотность содержимого ячеек планшета измеряли при длине волны 450 нм с применением фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия). Концентрацию TGF β 1 определяли по калибровочной кривой, результат выражали в пг/мл.

Определение содержания VEGF (общего, включающего VEGF A, B, C, D) и EGF в супернатантах культур эозинофильных гранулоцитов крови проводили по инструкциям коммерческих наборов «RayBio® Human VEGF ELISA Kit» и «RayBio® Human EGF ELISA Kit» («RayBiotech», США). Для исследования способности эозинофильных гранулоцитов секретировать VEGF и EGF во все лунки планшета вносили по 100 мкл стандартов и образцов, инкубировали 2,5 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °С. После инкубации лунки планшета промывали 4 раза, путем внесения 300 мкл буфера «Wash Solution». Далее в каждую лунку добавляли по 100 мкл приготовленного раствора биотинилированных антител и инкубировали 1 ч при комнатной температуре, аккуратно встряхивая. После этого повторяли 4-х кратную промывку планшета. Затем добавляли 100 мкл приготовленного раствора стрептавидина и инкубировали 45 мин при комнатной температуре, встряхивая. После отмывки в каждую лунку добавляли 100 мкл тетраметилбензида и инкубировали 30 мин при комнатной температуре с аккуратным встряхиванием. Вносили в лунки 50 мкл стоп-реагента и сразу после этого измеряли оптическую плотность содержимого ячеек планшета при длине волны 450 нм с применением фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия). Концентрацию VEGF и EGF определяли по калибровочной кривой, результат выражали в пг/мл.

2.3.8 Оценка экспрессии м-РНК гена *LGALS3* в эозинофилах периферической крови

Принцип метода. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени направлена на определение ДНК (и ее количества) в образце. Метод

ПЦР с обратной транскрипцией включает амплификацию специфического фрагмента рибонуклеиновой кислоты (РНК), далее молекула РНК в реакции обратной транскрипции преобразуется в комплементарную ДНК (кДНК) с последующей ее амплификацией.

Ход работы. Выделение РНК из эозинофильных гранулоцитов выполняли сорбентно-колоночным методом (RNeasyPlusMiniKit, QIAGEN, Германия). На матрице м-РНК с использованием обратной транскриптазы синтезировали ДНК, полученный фрагмент которой далее амплифицировали методом ПЦР в режиме реального времени с применением SYBR Green I (MolecularProbe, США) на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Использовали праймеры, посредством которых специфично амплифицировали фрагменты кДНК гена *LGALS3* – F: TCCACTTTAACCCACGCTTC; R: CAAATGGGAAAACCGACTGT.

Относительный уровень экспрессии м-РНК *LGALS3* рассчитывали по формуле Пфаффла: $(E_{targ} + E_{ref})^{Ct(ref) - Ct(targ)}$, где E – эффективность праймеров, Ct – значение порогового цикла амплификации, *targ* – целевой ген *галектина-3*, *ref* – ген «домашнего хозяйства» $\beta 2$ -микроглобулина [Pfaffl M.W., 2001].

2.3.9 Статистическая обработка результатов исследования

Статистический анализ полученных результатов исследования осуществляли с использованием программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences, США) и программы «Microsoft Excel» компании «Microsoft». Для выявления соответствия выборочных данных нормальному закону распределения применяли тест Шапиро-Уилка. В качестве средневыборочных характеристик использовали среднее значение (M) и стандартное квадратическое отклонение (Standard Deviation - S.D.), а также медиану (Me), 25-ый и 75-ый процентиля (1-ый и 3-ий квартили: $Q1$ и $Q3$). При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых

выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (F-критерий). Для оценки статистической достоверности различия количественных показателей, не подчиняющихся критерию нормального распределения, между исследуемыми выборками использовали непараметрический критерий Манна-Уитни с введением поправки Бенджамини-Хохберга. Для выявления взаимосвязей между двумя количественными показателями рассчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Тесноту связи определяли по абсолютной величине коэффициента корреляции r : очень сильная при $r > 0,9$; сильная при $0,7 < r < 0,9$; заметная при $0,5 < r < 0,7$; умеренная при $0,3 < r < 0,5$ и слабая при $r < 0,3$. Для определения достоверности различий между группами сравнения по качественным признакам проводили анализ таблиц сопряженности с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона. Если хотя бы в одной ячейке ожидаемая частота принимала значение от 5 до 9, критерий Хи-квадрат рассчитывался с поправкой Йейтса. Силу связи между переменными оценивали по величине критерия ϕ : очень сильная при $\phi = 0,8 - 1,0$; сильная при $0,6 < \phi < 0,8$; относительно сильная при $0,4 < \phi < 0,6$; слабая при $r < 0,2$. Для оценки взаимосвязи качественных признаков использовали бисериальный коэффициент корреляции и коэффициент ассоциации [Сергиенко В. И., Бондарева И. Б., 2006; Гржибовский А. М., 2008]. Результаты статистической обработки считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно цели и задачам исследования больные раком толстого кишечника были разделены на две группы в зависимости от наличия/отсутствия опухолеассоциированной тканевой эозинофилии (ТАТЕ). В основную группу исследования вошли пациенты с раком толстого кишечника, у которых в опухолевой ткани были обнаружены эозинофилы (10 клеток и более в поле зрения). Группу сравнения составили больные раком толстого кишечника без ТАТЕ, у которых в опухолевой ткани эозинофилы не определялись либо регистрировались единичные клетки.

В ходе исследования анализировали роль внутриопухолевых галектинов 1 и 3 и галектина-3 эозинофилов крови в механизмах хемокинзависимого рекрутирования эозинофилов в ткань новообразования с учетом способности опухолевых клеток экспрессировать факторы, модулирующие хемотаксис эозинофильных гранулоцитов. Оценивали основные параметры, характеризующие цитотоксические и проангиогенные свойства эозинофилов во взаимосвязи с экспрессией в опухолевой ткани рецепторов ростовых факторов (VEGFR и EGFR) и клинико-морфологическими характеристиками рака толстого кишечника, сопровождающегося ТАТЕ.

При исследовании связи между количеством эозинофилов в периферической крови (в % и абсолютных числах) и наличием ТАТЕ установлено, что у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ и без нее относительное и абсолютное количество эозинофилов в периферической крови было сопоставимым (Таблица 2). Это указывает на отсутствие прямой связи между гемической и тканевой эозинофилией ввиду действия различных факторов на клетки, циркулирующие в крови и мигрирующие в ткани организма.

Таблица 2 – Содержание эозинофилов в периферической крови у больных раком толстого кишечника, Me (Q1; Q3)

Эозинофилы крови	Рак толстого кишечника	
	с TATE (n = 25)	без TATE (n = 30)
Относительное количество, %	2 (1; 5)	3 (2; 4)
Абсолютное количество, $\times 10^9/\text{л}$	0,12 (0,06; 0,41)	0,23 (0,13; 0,36)

Примечание. Здесь и в таблицах 3, 4: p – уровень статистической значимости различий между показателями у пациентов с TATE и без TATE.

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

Ключевым фактором рекрутирования эозинофилов из кровотока в ткани считается CCL11. Источником эотаксинов могут быть не только резидентные тканевые клетки, такие как макрофаги, лейкоциты и эозинофилы, но и клетки некоторых эпителиальных опухолей.

По результатам проведенного исследования экспрессия CCL11 регистрировалась в цитоплазме опухолевых клеток во всех образцах рака толстого кишечника. Методом иммуногистохимии подсчитывали процентное содержание опухолевых CCL11-позитивных клеток у больных раком толстого кишечника в зависимости от наличия TATE. Установлена более выраженная экспрессия CCL11 опухолевыми клетками при раке толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией. У пациентов с колоректальным раком, сопровождающимся TATE, относительное содержание опухолевых CCL11⁺-клеток в 3,2 раза превышало соответствующий параметр у пациентов без TATE (Рисунок 3, Таблица 3).

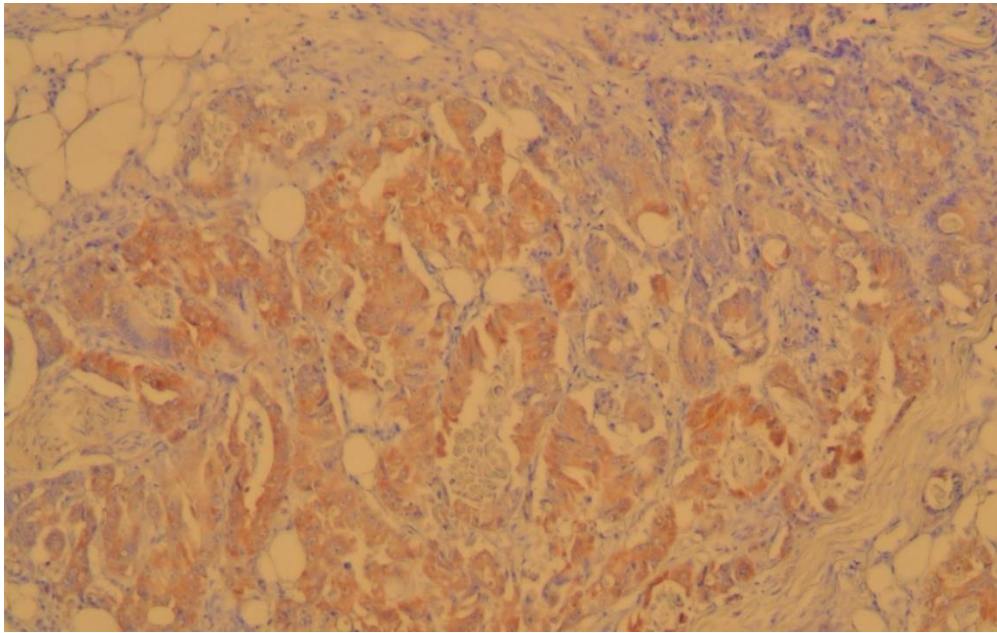


Рисунок 3 – Рак ободочной кишки с ТАТЕ. Экспрессия ССL11 в опухолевых клетках. Иммуногистохимическая окраска. Окрашено гематоксилином. Увеличение $\times 200$.

Таблица 3 – Экспрессия ССL11 и ССR3 в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника, Ме (Q1; Q3)

Относительное количество клеток в опухоли, %	Рак толстого кишечника	
	с ТАТЕ (n = 23)	без ТАТЕ (n = 32)
Опухолевые ССL11 ⁺ -клетки	69 (36; 80)	21,5 (18; 28) p = 0,021
ССР3 ⁺ -клетки опухолевого микроокружения	11 (9; 13)	9 (6; 11)

Для установления взаимосвязи экспрессии в опухолевой ткани ССL11 с ТАТЕ при раке толстого кишечника вычисляли бисериальный коэффициент корреляции (r). По результатам данного анализа у пациентов с раком толстого кишечника была установлена достоверная взаимосвязь между содержанием опухолевых ССL11⁺-клеток и ТАТЕ (r = 0,9).

При исследовании в образцах рака толстого кишечника экспрессии рецептора для эотаксина-1 (CCR3) было показано его присутствие в клетках опухолевого микроокружения. Методом иммуногистохимии CCR3 обнаруживался во всех анализируемых образцах колоректального рака (Рисунок 4).

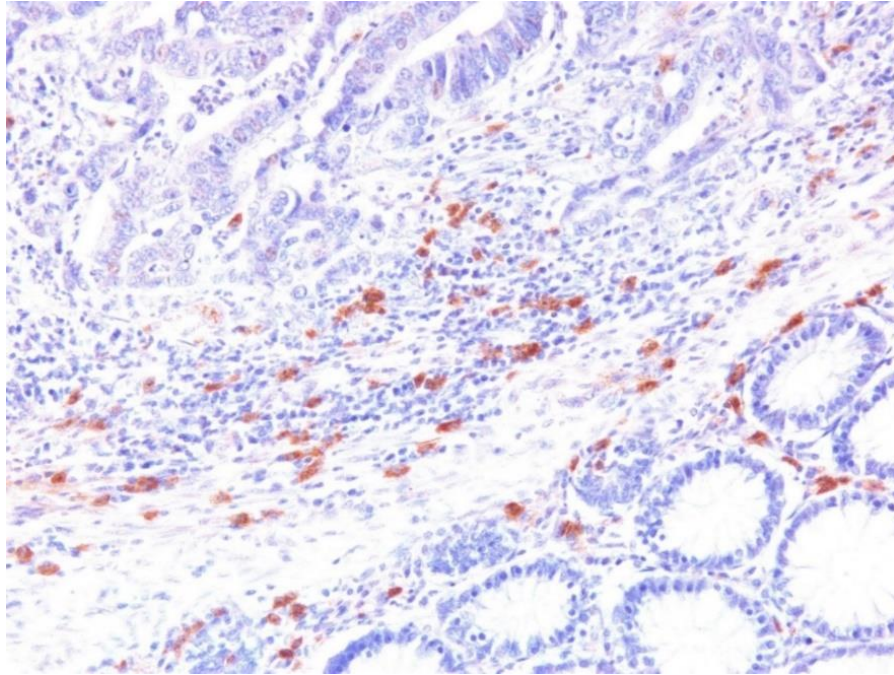


Рисунок 4 – Рак ободочной кишки с ТАТЕ. Экспрессия CCR3 на мембране клеток опухолевого микроокружения. Иммуногистохимическая окраска. Окрашено гематоксилином. Увеличение $\times 200$.

Относительное содержание клеток опухолевого инфильтрата, экспрессирующих CCR3, у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ статистически значимо не отличалось от такового у пациентов без тканевой эозинофилии (Таблица 3).

В целом, при раке толстого кишечника с ТАТЕ установлена гиперэкспрессия в опухоли SCL11, привлекающего в состав микроокружения эозинофильные гранулоциты. Клетки опухолевого микроокружения, в том числе эозинофилы, экспрессируют CCR3, необходимый для реализации SCL11/CCR3-зависимого механизма рекрутирования эозинофилов в опухоль.

На эффективность хемокин-опосредованного перехода эозинофилов в ткани могут влиять и другие факторы, в частности, галектины.

3.2 Экспрессия галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника

Галектины (β -галактозид-связывающие белки) вступают во взаимодействие с гликопротеинами рецепторов для цитокинов, хемокинов и факторов роста. Перекрестное связывание гликан-содержащих структур галектинами изменяет распределение рецепторных мембранных структур и, тем самым, модулирует ответ клеток на действие различных факторов.

У больных раком толстого кишечника мы оценивали экспрессию галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани методом иммуногистохимии (подсчитывали % позитивных клеток) в зависимости от наличия ТАТЕ.

По результатам исследования было зарегистрировано присутствие этих лектинов на мембране и в цитоплазме опухолевых клеток во всех исследуемых образцах рака толстого кишечника (Рисунок 5).

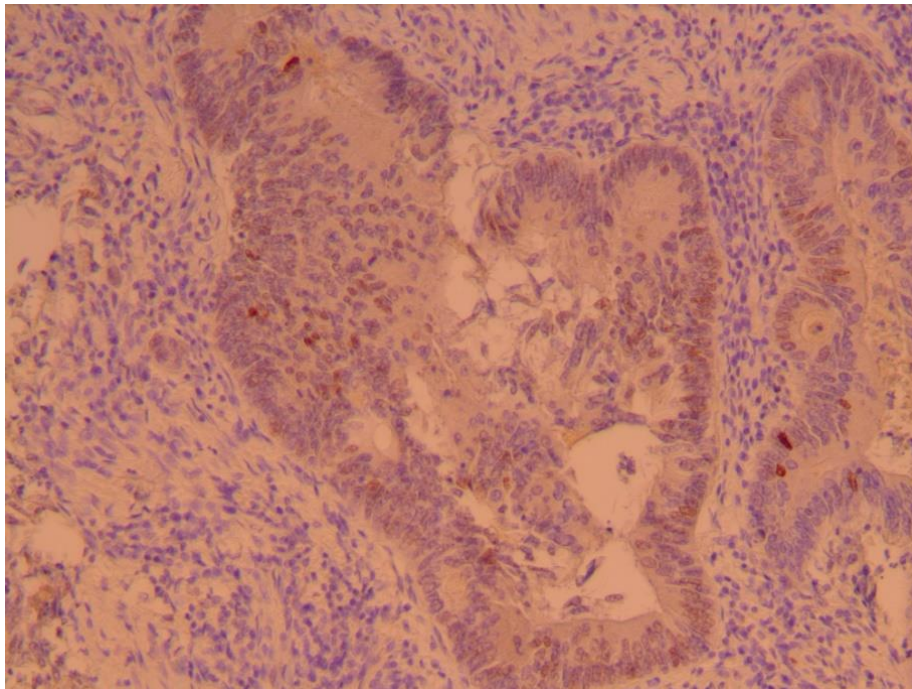


Рисунок 5 – Рак ободочной кишки с ТАТЕ. Экспрессия галектина-1 на мембране и в цитоплазме опухолевых клеток. Иммуногистохимическая окраска. Окрашено гематоксилином. Увеличение $\times 200$.

Относительное количество опухолевых галектин-1⁺-клеток при раке толстого кишечника с ТАТЕ оказалось в 3,2 раза ниже соответствующего показателя у пациентов без ТАТЕ (Таблица 4).

Таблица 4 – Экспрессия галектина-1 и галектина-3 опухолевыми клетками у больных раком толстого кишечника, Me (Q1; Q3)

Относительное содержание, %	Рак толстого кишечника	
	с ТАТЕ (n = 23)	без ТАТЕ (n = 32)
Опухолевые галектин-1 ⁺ -клетки	11 (6; 27)	35 (21; 69) p = 0,013
Опухолевые галектин-3 ⁺ -клетки	12 (7; 31)	18 (13; 37)

У больных раком толстого кишечника зарегистрирована связь средней силы между гипоэкспрессией галектина-1 в опухоли и присутствием эозинофильных гранулоцитов в опухолевой ткани ($r = 0,6$). Вместе с тем, по результатам корреляционного анализа, проведенного на общей группе больных колоректальным раком (с ТАТЕ и без нее), установлена отрицательная корреляционная зависимость между экспрессией галектина-1 и количеством опухолевых ССL11-позитивных клеток ($r = - 0,76$, $p = 0,035$). Выявленная взаимосвязь, по-видимому, обосновывает способность опухолевого галектина-1 оказывать негативное влияние на процесс рекрутирования эозинофилов в ткань новообразования.

При исследовании относительного содержания галектин-3-позитивных опухолевых клеток в гистологических образцах у больных колоректальным раком в зависимости от наличия/отсутствия ТАТЕ статистически значимых различий выявлено не было. Внутриопухолевая экспрессия галектина-3 при раке толстого кишечника с ТАТЕ и без нее была сопоставимой (Таблица 4). Последнее свидетельствует об отсутствии значимого влияния опухолевого

галектина-3 на эотаксин-1-зависимый хемотаксис эозинофилов в ткань новообразования при раке толстого кишечника.

3.3 Экспрессия м-РНК гена галектина-3 в эозинофилах крови у больных раком толстого кишечника

Известно, что эозинофилы могут экспрессировать галектин-3, опосредующий взаимодействие с VCAM-1 и галектином-3 эндотелиоцитов. В исследовании методом ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией была изучена экспрессия м-РНК гена галектина-3 (*LGALS3*) в эозинофилах периферической крови у больных раком толстого кишечника и здоровых доноров.

Показано значительное увеличение экспрессии м-РНК гена *LGALS3* в эозинофилах крови у всех больных раком толстого кишечника (как с TATE, так и без нее) по сравнению с соответствующим параметром у здоровых доноров (Таблица 5).

Таблица 5 – Экспрессия м-РНК гена галектина-3 в эозинофилах крови у больных раком толстого кишечника (отн. ед.), Me (Q1; Q3)

Уровень экспрессии, отн. ед.	Здоровые доноры (n = 17)	Рак толстого кишечника	
		с TATE (n = 17)	без TATE (n = 15)
<i>LGALS3</i>	0,015 (0,013; 0,023)	1,373 (0,373; 2,706) p = 0,045	0,482 (0,413; 0,668) p = 0,002

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующим параметром у здоровых доноров.

Установленные различия экспрессии м-РНК гена *LGALS3* в эозинофилах крови при раке толстого кишечника с TATE и без нее не достигали статистически значимого уровня, хотя отмечалась выраженная тенденция к

увеличению экспрессии галектина-3 эозинофилами периферической крови при колоректальном раке с ТАТЕ. Полученные результаты указывают на способность галектина-3, экспрессируемого гемическими эозинофилами, участвовать в реализации начальных этапов кооперации эозинофилов с эндотелиоцитами.

3.4 Экспрессия эозинофильной пероксидазы в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника

В состав специфических гранул эозинофилов входит эозинофильная пероксидаза (ЕРХ – eosinophil peroxidase) – маркерный фермент эозинофилов, опосредующий образование активных форм кислорода, которые повреждают опухолевые клетки.

В ходе оценки экспрессии ЕРХ в опухолевой ткани методом иммуногистохимии подсчитывали % позитивных клеток и показатель экспрессии в зависимости от наличия ТАТЕ (Рисунок 6).

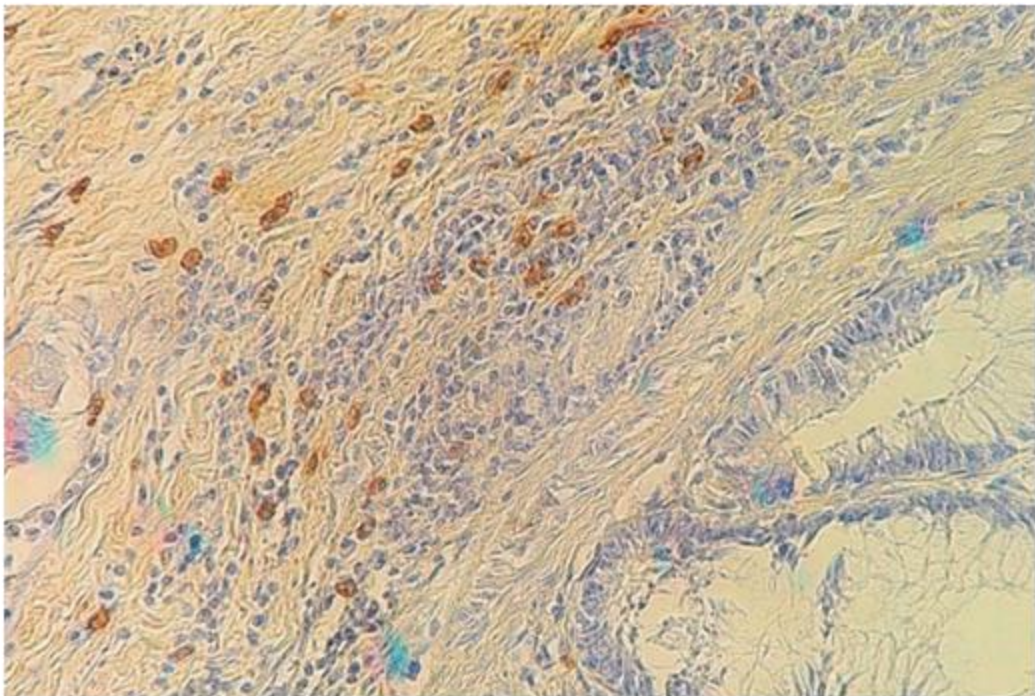


Рисунок 6 – Рак сигмовидной кишки с ТАТЕ. Экспрессия ЕРХ в цитоплазме клеток микроокружения. Иммуногистохимическая окраска. Окрашено гематоксилином. Увеличение $\times 200$.

У больных раком толстого кишечника относительное количество ЕРХ-позитивных «неопухолевых» клеток в образцах с ТАТЕ было выше, чем в образцах без ТАТЕ. При колоректальном раке с ТАТЕ показатель экспрессии ЕРХ в 7,2 раза превышал аналогичный параметр у пациентов с раком толстого кишечника без эозинофилии (Таблица 6).

Таблица 6 – Экспрессия эозинофильной пероксидазы (ЕРХ) в клетках опухолевого микроокружения у больных раком толстого кишечника (%), $M \pm S.D.$

Показатель экспрессии	Рак толстого кишечника	
	с ТАТЕ (n = 23)	без ТАТЕ (n = 32)
ЕРХ	43,61 ± 17,14	6,28 ± 3,04
	F = 142,3, p = 0,006	

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

Высокий показатель экспрессии ЕРХ, зарегистрированный в образцах колоректального рака с ТАТЕ, отражает повышение активности данного фермента в составе специфических эозинофильных гранул.

У больных раком толстого кишечника с ТАТЕ установлена положительная корреляционная зависимость между показателем экспрессии ЕРХ и количеством опухолевых ССL11⁺-клеток в ткани новообразования ($r = 0,89$; $p = 0,025$). Последнее обуславливает способность эотаксина-1 влиять не только на хемотаксис эозинофилов, но и активировать цитотоксические свойства этих клеток.

3.5 Показатели *in vitro* секреции цитокинов TNF α , TGF β 1, VEGF и EGF эозинофилами крови у больных раком толстого кишечника

Эозинофилы секретируют многие цитокины и факторы роста, которые могут влиять на пролиферацию опухолевых клеток, образование в опухоли новых сосудов, а также модулировать опухолевое микроокружение.

Для оценки функциональной активности эозинофильных гранулоцитов мы проанализировали *in vitro* секрецию цитокинов TNF α , TGF β 1, VEGF и EGF эозинофилами, выделенными из периферической крови, у больных раком толстого кишечника и здоровых доноров. Исследование содержания цитокинов проводили в *in vitro* интактной культуре клеток (определяли функциональную активность клеток) и при добавлении в культуральную среду индуктора – рекомбинантного (r) IL-5 (оценивали реактивность клеток в ответ на стимуляцию).

Исследование содержания TNF α в *in vitro* супернатантах культуральных суспензий эозинофилов крови позволило выявить статистически значимое повышение базальной и r-IL-5-индуцированной его секреции эозинофилами крови у больных раком толстого кишечника с TATE по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров и больных колоректальным раком без TATE. На фоне индукции эозинофилов r-IL-5 *in vitro* секреция TNF α эозинофилами крови оказалась также в 1,2 раза выше ее базального уровня у больных раком толстого кишечника с TATE (Таблица 7). Это может указывать на повышение функционального резерва эозинофилов и, как следствие, усиление реактивности клеток в отношении выработки фактора с цитотоксической активностью.

При исследовании *in vitro* секреции TGF β 1 эозинофилами периферической крови у больных колоректальным раком с TATE ее базальный уровень оказался в 1,6 и 1,7 раза соответственно выше аналогичных

показателей у здоровых доноров и пациентов с раком толстого кишечника без эозинофилии.

Таблица 7 – Концентрация $TNF\alpha$ в *in vitro* культуре эозинофилов периферической крови у больных раком толстого кишечника (пг/мл), Me (Q1; Q3)

Группы обследованных лиц		$TNF\alpha$	
		Базальная секреция	Секреция, индуцированная $r-IL-5$
Здоровые доноры		5,87 (3,43; 7,45)	10,05 (8,52; 14,22) $p_3 = 0,035$
Больные раком толстого кишечника	с TATE (n = 17)	13,81 (8,27; 14,40) $p_1 = 0,013$	16,65 (15,62; 24,35) $p_1 = 0,023$ $p_3 = 0,042$
	без TATE (n = 15)	6,41 (3,47; 10,28) $p_2 = 0,010$	8,33 (4,32; 17,94) $p_2 = 0,002$

Примечание. Здесь и в таблицах 8, 9: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующим параметром у здоровых доноров; p_2 – у пациентов с TATE; p_3 – с интактной культурой клеток, $r-IL-5$ – рекомбинантный $IL-5$.

В группе больных колоректальным раком с TATE отсутствовали достоверные различия показателей спонтанной и $r-IL-5$ -индуцированной *in vitro* секреции $TGF\beta 1$ эозинофилами периферической крови (Таблица 8).

Таблица 8 – Концентрация TGFβ1 в *in vitro* культуре эозинофилов периферической крови у больных раком толстого кишечника (пг/мл), Me (Q1; Q3)

Группы обследованных лиц		TGFβ1	
		Базальная секреция	Секреция, индуцированная r-IL-5
Здоровые доноры		28,42 (24,21; 32,13)	44,95 (34,86; 48,01)
Больные раком толстого кишечника	с TATE (n = 17)	44,85 (39,73; 46,71) p ₁ = 0,041	48,00 (39,85; 53,14)
	без TATE (n = 15)	26,67 (19,44; 28,36) p ₂ = 0,019	30,71 (23,44; 33,16)

Что касается продукции гемическими эозинофилами эндотелиального фактора роста (VEGF), то у всех больных раком толстого кишечника независимо от присутствия TATE содержание данного цитокина в *in vitro* супернатантах культуральных суспензий эозинофилов крови (без индуктора) было сопоставимым с нормой.

Добавление в культуральную суспензию клеток r-IL-5 у больных раком толстого кишечника с TATE характеризовалось статистически значимым снижением (относительно контрольной группы) *in vitro* секреции VEGF эозинофилами крови (Таблица 9).

Таблица 9 – Концентрация VEGF и EGF в *in vitro* культуре эозинофилов периферической крови у больных раком толстого кишечника (пг/мл), Me (Q1; Q3)

Группы обследованных лиц		VEGF		EGF	
		Базальная секреция	Секреция, индуцированная r-IL-5	Базальная секреция	Секреция, индуцированная r-IL-5
Здоровые доноры		1,83 (0,40; 2,35)	3,76 (1,81; 5,10)	0,52 (0,20; 0,93)	0,19 (0,08; 0,21) p ₃ = 0,020
Больные раком толстого кишечника	с TATE (n = 17)	3,43 (1,35; 5,74)	0,71 (0,29; 1,17) p ₁ = 0,032	0,98 (0,34; 1,00)	0,88 (0,65; 1,33) p ₁ = 0,039
	без TATE (n = 15)	3,83 (2,62; 5,04)	0,68 (0,58; 1,21) p ₁ = 0,023 p ₃ = 0,011	0,68 (0,58; 1,21)	0,86 (0,45; 1,35)

У больных колоректальным раком без TATE *in vitro* секреция эозинофилами VEGF в условиях стимуляции r-IL-5 оказалась достоверно ниже базального уровня и по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров.

Измерение содержания эпидермального ростового фактора (EGF) в *in vitro* интактной культуре эозинофилов периферической крови не выявило статистически значимых его различий у больных раком толстого кишечника (с TATE и без нее) и здоровых доноров (Таблица 9). Секреция EGF при индукции клеток *in vitro* r-IL-5 у больных раком толстого кишечника с TATE достоверно превышала соответствующий параметр у здоровых доноров, но при этом соответствовала таковой в базальной культуре клеток. Данный факт свидетельствует о сниженной реактивности эозинофилов периферической

крови в отношении наработки EGF у больных колоректальным раком, сопровождающимся TATE.

В целом, при раке толстого кишечника с TATE эозинофилы периферической крови характеризуются *in vitro* гиперсекрецией TNF α (цитокина с противоопухолевыми свойствами) и TGF β 1 (проявляющего дуализм эффектов в отношении опухолевого роста) на фоне сопоставимой с контролем базальной продукции VEGF и EGF – ростовых факторов с проангиогенной активностью.

3.6 Экспрессия рецепторов к VEGF и EGF в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника

Известно, что рецептор VEGFR представлен на мембране эндотелиоцитов и клеток некоторых эпителиальных опухолей, что определяет двойственность функций эндотелиального ростового фактора VEGF, способного модулировать не только ангиогенез, но и пролиферацию опухолевых клеток. Рецептор к эпидермальному ростовому фактору EGFR экспрессируют также эпителиоциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки, макрофаги. EGFR-опосредованная трансдукция сигнала внутрь клетки приводит к активации протоонкогенов, синтезу онкогенных белков и, как следствие, неконтролируемому делению трансформированной клетки.

В нашем исследовании мы проанализировали экспрессию рецепторов VEGFR и EGFR опухолевыми клетками рака толстого кишечника методом иммуногистохимии с подсчетом % позитивных клеток. По результатам исследования, в образцах рака толстого кишечника вне зависимости от наличия TATE зарегистрирована положительная реакция на VEGFR и EGFR в опухолевых клетках. При этом процентное содержание опухолевых VEGFR⁺-клеток у больных раком толстого кишечника с TATE не отличалось от аналогичного показателя при колоректальном раке без эозинофилии (Таблица 11).

Таблица 11 – Экспрессия VEGFR и EGFR опухолевыми клетками при раке толстого кишечника (%), $M \pm S.D.$

Относительное содержание, %	Рак толстого кишечника (n=55)	
	с TATE (n = 23)	без TATE (n = 32)
Опухолевые VEGFR ⁺ -клетки	15,22±9,34	14,87±12,37
	F = 0,01; p > 0,05	
Опухолевые EGFR ⁺ -клетки	12,65±9,92	20,19±11,42
	F = 6,49; p = 0,018	

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

При анализе результатов иммуногистохимического исследования экспрессии EGFR установлено статистически значимое снижение относительного содержания EGFR-позитивных опухолевых клеток в образцах рака толстого кишечника с TATE (Рисунок 7).

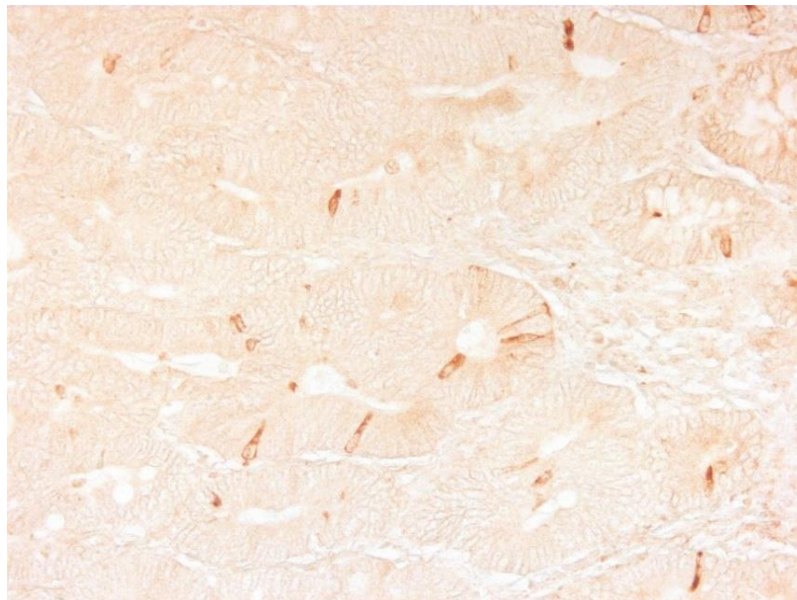


Рисунок 7 – Рак ободочной кишки с TATE. Методом иммуногистохимии на мембране опухолевых клеток выявлен EGFR. Докрашено гематоксилином. Увеличение $\times 200$

По результатам корреляционного анализа нам не удалось выявить взаимосвязь экспрессии опухолевыми клетками рецепторов EGFR и VEGFR с секрецией эозинофилами крови одноименных цитокинов EGF и VEGF, а также наличием TATE у пациентов с раком толстого кишечника. Это может свидетельствовать об отсутствии существенного влияния эозинофилов на EGF- и VEGF-опосредованный механизм регуляции пролиферации опухолевых клеток и неоангиогенез опухоли при раке толстого кишечника с TATE.

3.7 Взаимосвязь TATE с клинико-морфологическими характеристиками опухоли у больных раком толстого кишечника

Клеточный состав опухолевого микроокружения может влиять на прогноз клинического течения злокачественных новообразований. В исследовании мы попытались установить взаимосвязь TATE, сопровождающей рак толстого кишечника, с основными характеристиками опухолевой прогрессии, в частности, со способностью опухоли к инвазивному росту и метастазированию, а также степенью ее дифференцированности.

Степень инвазии (распространения) первичного опухолевого узла определяли в соответствии с международной TNM классификацией (8 Edition AJCC, 2009 г.). У пациентов с раком толстого кишечника в 23,5 % случаев первичная опухоль прорастала слизистую и подслизистую оболочки толстого кишечника (T1), а также мышечный слой кишки (T2), в 76,5 % – инвазия первичного опухолевого узла происходила в субсерозный слой или перитонизированные участки ободочной кишки (T3) и висцеральную брюшину (или соседние органы) (T4). По результатам сравнительного исследования наличия эозинофилов в составе опухолевого микроокружения у пациентов с разной степенью прорастания первичной опухоли нами были установлены статистически значимые различия (Таблица 12).

Таблица 12 – Распределение больных раком толстого кишечника по степени инвазии первичной опухоли (в абсолютных числах и %)

Распространение первичной опухоли	Рак толстого кишечника	
	с ТАТЕ (n = 51)	без ТАТЕ (n = 47)
T1, T2	18 (35,3 %)	5 (10,6 %)
T3, T4	33 (64,7 %)	42 (89,4 %)
$\chi^2 = 16,10; p = 0,029; \phi = 0,438$		

Примечание. Здесь и в таблицах 14, 15, 16: p – уровень статистической значимости различий между группами сравнения; χ^2 – критерий Хи-квадрат Пирсона; ϕ – критерий для оценки силы взаимосвязи между номинальными переменными.

Так, у больных колоректальным раком с ТАТЕ распространение первичной опухоли соответствовало символам T1, T2 в 35,3 % случаев, тогда как при раке толстого кишечника без ТАТЕ низкая степень инвазии опухоли (T1, T2) выявлялась лишь у 10,6 % пациентов (Таблица 12). Установлена связь средней силы между низкой степенью инвазии опухоли и наличием ТАТЕ у пациентов с раком толстого кишечника ($\phi = 0,438$).

Примечательно, что у больных колоректальным раком с ТАТЕ и низкой степенью распространения опухоли (T1, T2) показатель экспрессии эозинофильной пероксидазы (ЕРХ) в опухолевой ткани в 1,9 раза превышал соответствующий параметр в группе больных с ТАТЕ и выраженной инвазией опухоли (T3, T4) (Таблица 13).

Таблица 13 – Экспрессия EPX в клетках опухолевого микроокружения у больных раком толстого кишечника в зависимости от степени инвазии первичной опухоли (%), $M \pm S.D.$

Степень инвазии опухоли	Рак толстого кишечника			
	с TATE (n = 51)		без TATE (n = 47)	
	T1, T2	T3, T4	T1, T2	T3, T4
Показатель экспрессии EPX	35,11 ± 10,03	19,01 ± 5,34	6,61 ± 3,17	4,28 ± 2,65
	F = 22,8; p = 0,031		F = 0,07; p = 0,059	

Примечание: p – уровень статистической значимости различий между показателями у пациентов с низкой (T1, T2) и высокой (T3, T4) степенью инвазии опухоли; F – значение F-статистики по результатам дисперсионного анализа.

Выявленные изменения указывают на возможное вовлечение эозинофилов с высокой цитотоксической активностью в формирование менее инвазивного роста опухоли при раке толстого кишечника. Последнее не противоречит результатам, полученным при сравнительной оценке степени дифференцированности опухоли у больных раком толстого кишечника с TATE.

По результатам исследования гистологических образцов опухолевой ткани в 84,3 % случаях колоректального рака с TATE опухоли характеризовались высокой и умеренной степенью дифференцированности. При этом сходная тенденция отмечалась у больных раком толстого кишечника без эозинофилии. У пациентов данной группы преобладали также высоко- и умереннодифференцированные опухоли (Таблица 14).

Таблица 14 – Распределение больных раком толстого кишечника по степени дифференцированности опухоли (в абсолютных числах и %)

Степень дифференцированности опухоли	Рак толстого кишечника	
	с ТАТЕ (n = 51)	без ТАТЕ (n = 47)
Высокая и умеренная	43 (84,3 %)	36 (76,6 %)
Низкая	8 (15,7 %)	11 (23,4 %)
$\chi^2 = 0,63; p > 0,05$		

Еще одним критерием прогрессии опухоли является метастазирование, заключающееся в формировании вторичных опухолевых очагов, удаленных от первичного новообразования. При раке толстого кишечника метастазы регистрируются первоначально в регионарных лимфоузлах (N1, N2). Метастазы в лимфатических узлах, локализованных по ходу аорты и наружных подвздошных артерий, обозначают как отдаленные (M1).

При анализе состояния регионарных лимфоузлов у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ лишь в 9,8 % случаев удалось зарегистрировать очаги их метастатического поражения в сравнении с таковым у пациентов без эозинофилии (лимфогенные метастазы обнаруживались в 48,9 % случаев) (Таблица 15).

Таблица 15 – Частота встречаемости метастазов в регионарных лимфатических узлах при раке толстого кишечника (в абсолютных числах и % случаев)

Регионарные метастазы	Рак толстого кишечника	
	с ТАТЕ (n = 51)	без ТАТЕ (n = 47)
N0	46 (90,2 %)	24 (51,1 %)
N1,2	5 (9,8 %)	23 (48,9 %)
$\chi^2 = 7,11; p = 0,031; \phi = 0,314$		

У больных раком толстого кишечника установлена связь средней силы между ТАТЕ и отсутствием регионарных метастазов ($\phi = 0,314$). Примечательно, что частота встречаемости отдаленных метастазов у всех больных раком толстого кишечника была сопоставимой. Гематогенные метастазы регистрировались в 5,9 % случаев колоректального рака с ТАТЕ и 12,8 % случаев рака толстого кишечника без эозинофилии (Таблица 16).

Таблица 16 – Частота встречаемости отдаленных метастазов при раке толстого кишечника (в абсолютных числах и % случаев)

Отдаленные метастазы	Рак толстого кишечника	
	с ТАТЕ (n = 51)	без ТАТЕ (n = 47)
M0	48 (94,1 %)	41 (87,2 %)
M1	3 (5,9 %)	6 (12,8 %)
$\chi^2 = 1,01; p > 0,05$		

Отсутствие очагов регионарного и отдаленного метастазирования у больных раком толстого кишечника, сопровождающимся ТАТЕ, обосновывает ее взаимосвязь с низким метастатическим потенциалом опухоли.

В целом, рак толстого кишечника с ТАТЕ сопряжен с благоприятными клинико-морфологическими характеристиками опухолевого процесса, а именно с менее инвазивным ростом новообразования, отсутствием очагов регионарного метастазирования, высокой и умеренной степенью дифференцированности опухолевых клеток.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Резидентные тканевые эозинофилы локализуются преимущественно в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), за исключением пищевода, обеспечивая гомеостаз путем регуляции эпителиального барьера, взаимодействия с другими иммунокомпетентными клетками и компонентами микробиоты [Albert-Bayo M. et al., 2019; Loktionov A., 2019; Nguyen W. N. T. et al., 2020]. Значительный прирост пула тканевых эозинофилов отмечается при воспалительных и опухолевых заболеваниях ЖКТ [Richards C. H. et al., 2012; Harbaum L. et al., 2015; Saraiva A. L., Carneiro F., 2018]. Опухолевые клетки могут привлекать эозинофилы и использовать в целях собственного выживания и развития [Jain M. et al., 2014; Peurala E. et al., 2018]. Однако сведения литературы, касающиеся особенностей взаимного влияния эозинофильных гранулоцитов и опухолевых клеток в патогенезе колоректального рака малочисленные и неоднозначные.

Эозинофильная инфильтрация опухоли (Tumor-Associated Tissue Eosinophilia – TATE) является доступным легко верифицируемым гистологическим показателем, выявляемым при рутинном исследовании препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином.

В исследовании, проведенном нами ранее, было проанализировано 650 гистологических препаратов рака толстого кишечника, среди которых TATE была выявлена в 29,2 % случаев (до лечения пациентов). Полученные нами результаты согласуются с данными S. Kiziltas et al. (2008), которые регистрировали эозинофильную инфильтрацию опухоли в 24,4 % случаев колоректального рака [Kiziltas S. et al., 2008]. По сведениям других авторов, TATE обнаруживалась в 75 % гистологических образцов рака толстого кишечника [Harbaum L. et al., 2015]. Столь высокую частоту TATE при колоректальном раке авторы связывают с проведением пациентам химиотерапии. По мнению S. Jain et al. (2018), ответом организма на

проводимое противоопухолевое лечение может быть также увеличение эозинофилов в периферической крови – ТАВЕ (Tumour-Associated Blood Eosinophilia) [Jain S. et al., 2018]. Примечательно, что ТАВЕ может развиваться независимо от присутствия эозинофилов в составе опухолевого инфильтрата и иметь иное прогностическое значение [Prizment A. E. et al., 2016; Lang M. et al., 2017].

В нашем исследовании у больных раком толстого кишечника гемическая эозинофилия регистрировалась лишь в 11 % случаев, при этом прямой зависимости между ТАТЕ и ТАВЕ выявлено не было. У больных колоректальным раком с ТАТЕ относительное и абсолютное содержание эозинофилов в периферической крови не превышало норму (Таблица 2). Это может свидетельствовать, с одной стороны, об активном рекрутировании эозинофилов в опухолевую ткань, а с другой – о различных патогенетических факторах, определяющих пролонгированное пребывание эозинофилов в периферической крови и опухолевой ткани.

Известно, что миграция эозинофилов в ткань новообразования, за исключением неопластической трансформации лейкоцитов эозинофильного ряда, опосредована факторами, секретируемыми опухолевыми клетками [Jain M. et al., 2014; Tian M. et al., 2016; Wang T. et al., 2016].

Главным фактором рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в ткань считается эотаксин-1 (CCL11), реализующий свои эффекты через специфический рецептор CCR3 [Pope S. M. et al., 2005; Shamri R. et al., 2011]. При взаимодействии с рецептором CCL11 активирует G-белок-опосредованные механизмы сигнальной трансдукции внутри эозинофилов, усиливая хемотаксис этих клеток. Наряду с выраженными хемоаттрактантными свойствами, CCL11/эотаксин способен также инициировать усиление функциональной активности эозинофилов. По мнению T. G. Uhm et al. (2012), CCL11 обуславливает развитие ТАТЕ при многих заболеваниях, в том числе, опухолевых [Uhm T. G. et al., 2012].

Методом иммуногистохимии мы проанализировали экспрессию CCL11 и его рецептора CCR3 в образцах рака толстого кишечника во взаимосвязи с эозинофильной инфильтрацией опухолевой ткани, а также выявили способность опухолевых клеток модулировать эффективность эотаксин-зависимого механизма рекрутирования эозинофилов в ткань новообразования.

В результате проведенного исследования экспрессия CCL11 была зарегистрирована в цитоплазме опухолевых клеток во всех образцах колоректального рака. При этом у больных раком толстого кишечника с TATE относительное содержание опухолевых CCL11⁺-клеток в 3,2 раза превышало аналогичный показатель у пациентов без эозинофилии (Таблица 3).

Гиперэкспрессия CCL11 злокачественно трансформированными клетками толстого кишечника обосновывает способность опухолевых клеток секретировать хемоаттрактанты и привлекать эозинофильные гранулоциты в опухоль [Cho H. et al., 2016]. Известно, что эотаксин-1 совместно с хемокином RANTES (Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted) усиливает IL-5-опосредованную трансэндотелиальную миграцию эозинофилов в ткани с последующей реализацией ими эффекторных функций [Brussino L. et al., 2018; Tashkin D. P. et al., 2018]. Вместе с тем, синергетическое действие CCL11, RANTES и IL-5 повышает экспрессию на мембране эозинофилов белка VLA (very late antigen) 4, способного взаимодействовать с компонентами внеклеточного матрикса и пролонгировать срок жизни эозинофилов в тканях [Lintomen L. et al., 2008].

В настоящем исследовании CCL11/эотаксин-1 у больных колоректальным раком обнаруживался также в цитоплазме отдельных клеток внутри- и околоопухолевого инфильтрата. Источником CCL11 в норме являются «здоровые клетки» эпителия желудочно-кишечного тракта, а также резидентные тучные клетки, макрофаги и сами эозинофилы [Cho H. et al., 2015]. Нарботка CCL11 эозинофилами в составе опухолевого

микроокружения указывает на факт аутокринной стимуляции рекрутирования этих клеток.

Свои функции CCL11 реализует при взаимодействии с рецептором CCR3, представленном преимущественно на мембране эозинофилов [Pope S. M. et al., 2005; Shamri R. et al., 2011]. CCR3 является значимым фактором миграции эозинофильных гранулоцитов в слизистую оболочку толстого кишечника и особенно важен на ее финальном этапе. У мышей с дефицитом гена *CCR3* (гомозиготы *CCR3*^{-/-}) хемотаксис эозинофилов в нормальную ткань кишечника существенно снижался, эозинофилы при этом обнаруживались в субэндотелиальном пространстве [Shamri R. et al., 2011]. Компоненты последнего – гладкомышечные клетки и фибробласты выделяют эотаксин-1, опосредующий миграцию эозинофилов через стенку сосуда [Humbles A. A. et al., 2002].

По результатам проведенного исследования при раке толстого кишечника CCR3 обнаруживался на мембране клеток опухолевого инфильтрата. У больных колоректальным раком с TATE относительное содержание CCR3⁺-клеток опухолевого микроокружения не отличалось от такового у больных раком толстого кишечника без эозинофилии (Таблица 3).

Считается, что экспрессия CCR3 на тканевых элементах (эозинофилах, тучных клетках, эпителиоцитах) является главным патогенетическим фактором миграции этих клеток в ткани [Gong Di-He et al., 2016]. Присутствие CCR3⁺-клеток опухолевого микроокружения при раке толстого кишечника с TATE обуславливает сохранность CCL11/CCR3-опосредованного механизма, необходимого для привлечения эозинофилов в опухолевую ткань. По-видимому, у больных раком толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией опухоли в реализации данного механизма доминирующим является избыток внутриопухолевого CCL11, способного проявлять свои хемотаксические свойства при связывании как с CCR3, так и с другими хемокиновыми рецепторами (CCR2 и CCR5). Вместе с тем, в литературе

рассматривается факт негативной регуляции экспрессии CCR3 тканевыми эозинофилами, обусловленной набором других медиаторов внутри опухоли.

Показано, что существенное влияние на хемотаксис эозинофильных гранулоцитов могут оказывать галектины 1-го и 3-го типов. Галектины – это β -галактозид-связывающие белки, экспрессируемые многими клетками организма, опосредуют перекрестное взаимодействие гликан-содержащих структур, модулируют распределение клеточных рецепторов к цитокинам, хемокинам и факторам роста, усиливают или ослабляют образование контактов между клетками и внеклеточным матриксом [Rabinovich G. A. et al., 2007; Rao S. P. et al., 2007; Yang R. et al., 2008]. При злокачественной трансформации опухолевые клетки могут нарабатывать и сохранять лектины внутри, в избытке презентировать на мембране или секретировать в межклеточное пространство [Ebrahim A. H. et al., 2014].

По результатам, полученным нами ранее, у больных аденокарциномой толстого кишечника количество опухолевых галектин-1⁺- и галектин-3⁺-клеток оказалось выше, чем при доброкачественном опухолевом процессе соответствующей локализации [Полетика В. С. и соавт., 2020]. Сходные результаты были продемонстрированы и другими авторами [Thijssen V. et al., 2015; Labrie M. et al., 2017]. В целом, опухолевые клетки и компоненты микроокружения за счет экспрессии галектинов 1 и 3 могут изменять пролиферативный и инвазивный потенциал опухоли, а также модулировать состав опухолевого микроокружения [He X. J. et al., 2014].

По данным отдельных авторов, показано, что в механизмах хемокин-зависимого рекрутирования эозинофилов принимает участие внеклеточный галектин-1 [Rao S. P. et al., 2017]. На модели лабораторных животных с делецией гена галектина-1 исследователи определили дефицит миграции эозинофильных гранулоцитов в очаг воспаления [Savita P. et al., 2017]. Другие ученые получили противоположные результаты, указывающие на усиление рекрутирования эозинофилов в слизистую оболочку бронхиального эпителия

и повышение содержания этих клеток в крови у мышей в случае делеции гена галектина-1 [Ge X. N. et al., 2016].

При количественной оценке процентного содержания опухолевых галектин-1⁺-клеток в образцах рака толстого кишечника с TATE мы зарегистрировали значительное снижение данного показателя в сравнении с таковым в образцах колоректального рака без эозинофилии (Таблица 4). Показана взаимосвязь низкой экспрессии галектина-1 опухолевыми клетками с присутствием эозинофилов в составе новообразования у больных раком толстого кишечника ($r = 0,6$). Примечательно, что в общей группе больных колоректальным раком (с TATE и без нее) мы установили отрицательную корреляционную связь между экспрессией внутриопухолевого галектина-1 и количеством опухолевых CCL11⁺-клеток (Рисунок 8).

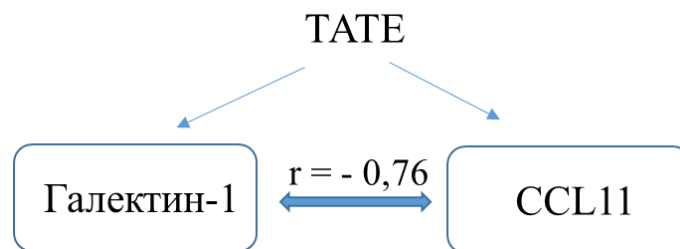


Рисунок 8 – Взаимосвязь экспрессии галектина-1 и CCL11 опухолевыми клетками у больных раком толстого кишечника.

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

Еще одним модулятором CCL11-опосредованной миграции эозинофилов в опухоль считается галектин-3 [Ge X. N. et al., 2013]. По мнению X. N. Ge et al. (2010), отсутствие гена, кодирующего галектин-3, у мышей с бронхиальной астмой характеризовалось дефицитом эозинофилов в очаге воспаления и уменьшением фиброзированием бронхов [Ge X. N. et al., 2010]. Механизм действия галектина-3 связывают с активацией адгезивных молекул [Ge X. N. et al., 2016] и инициацией внутриклеточных факторов сигнальной трансдукции [Liu F. et al., 2005].

По результатам настоящего исследования, в образцах рака толстого кишечника опухолевые клетки проявляли положительную реакцию на галектин-3. У больных раком толстого кишечника вне зависимости от наличия в ткани эозинофилов относительное содержание опухолевых галектин-3⁺-клеток было сопоставимым и не превышало 20 % (Таблица 4). Нами не было установлено корреляционных связей между экспрессией в опухоли галектина-3, CCL11 и его рецептора, что, по-видимому, указывает на отсутствие значимого влияния данного галектина-3 на хемокин-зависимую миграцию эозинофилов в опухолевую ткань. Однако не исключается роль этого лектина в кооперативном взаимодействии эозинофилов с эндотелиальными клетками.

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

Оценка экспрессии м-РНК гена галектина-3 в эозинофилах крови при раке толстого кишечника показала, что у всех пациентов (с TATE и без нее) значения данного параметра существенно превышали таковой у здоровых доноров (Таблица 5). Отсутствие взаимосвязи экспрессии м-РНК гена *LGALS3* в эозинофилах крови с наличием эозинофильных гранулоцитов в составе опухолевой ткани при раке толстого кишечника, вероятно, объясняется

способностью галектина-3 влиять преимущественно на гемические эозинофилы, опосредовать лишь начальный этап их адгезии и роллинга внутри сосудов; в свою очередь прочная фиксация и трансэндотелиальная миграция эозинофилов обеспечиваются кооперацией CCL11 и CCR3.

Таким образом, привлечение эозинофилов в опухолевую ткань при раке толстого кишечника обусловлено способностью злокачественно трансформированных клеток продуцировать ключевой эозинофил-активирующий фактор – CCL11 при условии низкой экспрессии в опухоли галектина-1. Присутствие комплементарного рецептора CCR3 на клетках опухолевого микроокружения указывает на сохранность функционирования хемокин-зависимого механизма миграции эозинофилов в опухолевую ткань. Фактором дисрегуляции рекрутирования эозинофилов в ткань новообразования является галектин-1, эффекты которого определяются уровнем его экспрессии. Избыток внутриопухолевого галектина-1 при раке толстого кишечника без TATE, по-видимому, может служить механизмом «ускользания» опухолевых клеток от агрессивного влияния эозинофилов.

Действие эозинофильных гранулоцитов на злокачественно трансформированные клетки до сих пор однозначно не определено. Превалирующим является мнение о противоопухолевом цитотоксическом влиянии эозинофилов [Legrand F. et al., 2010; Shamri R. et al., 2011; Xing Y. et al., 2016]. Однако широкий арсенал рецепторов и медиаторов, секретируемых эозинофилами, наделяет эти клетки потенциалом в содействии росту опухоли [Duffy M. J. et al., 2011; Hirohito K. et al., 2011].

При дегрануляции эозинофилов выделяются их специфические протеины с цитотоксическими свойствами, а именно, главный щелочной белок, эозинофильный катионный протеин и эозинофильная пероксидаза (EPX – eosinophil peroxidase) [Yousefi S. et al., 2012; Al-Muhsen S. et al., 2013; Esnault S. et al., 2013]. EPX – маркерный фермент эозинофилов, опосредует окислительные процессы с образованием активных форм кислорода,

повреждающих клетки новообразования [Slattery M. L. et al., 2012]. Образование радикалов кислорода происходит при функционировании NADPH-оксидазного ферментного комплекса, локализованного в плазматической мембране эозинофилов [Lacy P. et al., 2003]. По данным J. L. Bankers-Fulbright et al. (2003), экспрессия NADPH-оксидазы в мембране эозинофилов объясняет специфику эффекторных свойств этих гранулоцитов, способных осуществлять внеклеточный киллинг опухолевых клеток [Bankers-Fulbright J. L. et al., 2003]. Вместе с тем, EPX потенцирует цитотоксические свойства других эозинофильных катионных белков, нарушающих целостность мембран трансформированных клеток [Lacy P. et al., 2003]. По сведениям L. A. Spencer, P. F. Weller (2010), эозинофилы, экспрессирующие рецептор 2B4, секретируют EPX, чем проявляют цитотоксическое действие в отношении клеточных линий В-лимфомы и мастоцитомы мышей [Spencer L. A., Weller P. F., 2010]. В *in vitro* культуре опухолевых клеток показано накопление EPX, эозинофильного нейротоксина и активных форм кислорода при CD11a/CD18- и $\gamma\delta$ TCR/CD3-опосредованной активации эозинофилов [Legrand F. et al., 2009, 2010]. Цитотоксический эффект эозинофильных белков на опухолевые клетки был установлен также на модели клеточной линии остеосаркомы мышей LM8 [Xing Y. et al., 2016].

В данном исследовании оценивалась экспрессия EPX в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника в зависимости от наличия TATE. Установлено статистически значимое увеличение процентного содержания EPX-позитивных «неопухолевых» клеток в образцах рака толстого кишечника с эозинофильной инфильтрацией новообразования. Показатель экспрессии EPX у пациентов данной группы значительно превышал таковой у больных раком толстого кишечника без эозинофилии (Таблица 6). Последнее указывает на то, что гиперэкспрессия EPX, обнаруженная в образцах рака толстого кишечника с TATE, определяется не только присутствием большего числа эозинофилов, выделяющих пероксидазу, но и повышенной активностью этого

фермента в специфических эозинофильных гранулах. Полученные нами результаты не противоречат данным литературы, описывающим повышение активности ЕРХ при злокачественных новообразованиях, сопровождающихся эозинофилией [Slattery M. L. et al., 2012]. Высокая активность ЕРХ в эозинофилах крови установлена при лимфогранулематозе и миеломной болезни, сопровождающихся эозинофилией [Литвинова Л. С. и соавт., 2007]. Другие авторы зарегистрировали высокую активность эозинофильной пероксидазы в периферической крови при хроническом миелолейкозе [Mangaru Z. et al., 2016]. Сходные результаты были получены у пациентов со злокачественными новообразованиями негематологической природы [Schroeder S. et al., 2017]. Высокий уровень эозинофильных катионных белков в крови отражает усиление функциональной активности гемических и тканевых эозинофилов [Fulkerson P. C., Rothenberg M. E., 2018]. Описана способность эозинофилов нарабатывать гранулярные протеины *de novo* под влиянием эотаксинов, RANTES и IL-5 [Kim K. et al., 2017]. Установлена положительная корреляционная связь между экспрессией ЕРХ клетками микроокружения и количеством опухолевых ССL11⁺-клеток у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ (Рисунок 9).

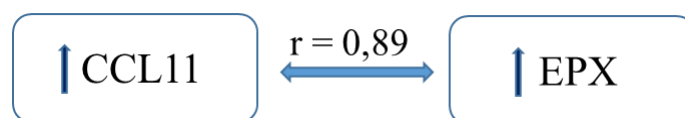


Рисунок 9 – Взаимосвязь экспрессии ССL11 и ЕРХ в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ.

Это обосновывает способность ССL11/эотаксина выполнять функцию не только хемоаттрактанта эозинофилов, но и индуктора их цитотоксической функции.

Противоопухолевая активность эозинофилов может быть опосредована также секрецией фактора некроза опухоли (TNF – tumor necrosis factor) α ,

способного инициировать деструкцию опухолевых клеток и эндотелиоцитов, а также регулировать локальные и системные иммунные реакции организма [Шевченко В. Е. и соавт., 2017]. Проапоптогенное действие TNF α реализуется через специализированные «домены смерти», экспрессированные на опухолевых клетках. Вместе с тем, цитотоксическое действие этого цитокина связывают с нарушением функции митохондрий и гибелью клеток новообразования путем некроза. Показано, что цитолитический эффект TNF α повышается при одновременном действии эндогенных интерферонов [Legrand F. et al., 2009, 2010]. Сочетанное действие данных медиаторов обусловлено повышенной экспрессией «рецепторов смерти» на опухолевых клетках. Наряду с прямым противоопухолевым действием, локальная секреция TNF α может усиливать хемотаксис резидентных макрофагов и лимфоцитов, а также смещать цитокиновое равновесие в направлении Т-хелперов 1-го типа [Shamri R. et al., 2011].

Нарушение синтеза и секреции TNF α клетками врожденного и адаптивного иммунитета наблюдается при различных опухолевых заболеваниях и является отрицательным прогностическим фактором [Legrand F. et al., 2009]. По данным литературы, влияние TNF α при опухолевом процессе зависит от его концентрации: при дефиците секреции данного цитокина усиливается пролиферативная активность опухолевых клеток; гиперпродукция TNF α резидентными тканевыми элементами, напротив, вызывает деструктивные изменения в ткани новообразования [Cavalcanti Y. V. et al., 2012]. При сокультивировании эозинофильных гранулоцитов с клеточной линией колоректального рака COLO 205 отмечалось высвобождение эозинофильных катионных протеинов, TNF α и гранзима А [Legrand F. et al., 2010]. По мнению авторов, TNF α повышает экспрессию адгезивных структур на эндотелиоцитах и стимулирует фагоцитарную активность клеток опухолевого микроокружения [Legrand F. et al., 2010; Shamri R. et al., 2011].

В данном исследовании у больных раком толстого кишечника мы оценивали секрецию TNF α эозинофильными периферической крови в *in vitro* интактной культуре клеток и при добавлении в культуральную среду рекомбинантного (r) IL-5. Установлено достоверное повышение базальной и индуцированной r-IL-5 секреции TNF α эозинофилами крови *in vitro* только у пациентов с раком толстого кишечника, сопровождающемся ГАТЕ (Таблица 7). При этом у пациентов данной группы добавление r-IL-5 в культуру эозинофилов сопровождалось повышением *in vitro* секреции TNF α по сравнению с базальным ее уровнем, что может свидетельствовать о высокой реактивности изучаемых клеток. По сведениям литературы, TNF α -опосредованная цитотоксичность осуществляется путем индукции ЕРХ, повреждающей как опухолевые, так и клетки микроокружения [Legrand F. et al., 2010]. TNF α в высокой концентрации может активировать адгезию, хемотаксис и дегрануляцию эозинофилов, усиливая тем самым функциональный потенциал изучаемых клеток.

Следует отметить, что внутриопухолевые резидентные и рекрутированные гемические эозинофилы являются источником многих цитокинов и факторов роста, что позволяет им влиять на пролиферацию трансформированных клеток, образование в опухоли новых кровеносных и лимфатических сосудов (неоангиогенез), а также регулировать локальный иммунный ответ [Duffy M. J. et al., 2011; Hirohito K. et al., 2011].

Эозинофилы секретируют TGF β 1 – цитокин, который в норме стимулирует продукцию коллагена и фибронектина, и, напротив, угнетает активность ферментов деградации внеклеточного матрикса [Puxeddu I. et al., 2005; Melo R. C. et al., 2008; Seoane J., Gomis R., 2017]. Показано, что тканевые эозинофилы носовых полипов экспрессируют TGF β 1, опосредующий развитие фиброза стромы и утолщение базальной мембраны в носовой полости [Hirohito K. et al., 2011]. Кроме этого, установлена гиперсекреция TGF β 1 эозинофилами в ткани легких и кожи, что сопровождается усилением

синтеза коллагена и пролиферации фибробластов при опухолевых заболеваниях данных органов [Hirohito K. et al., 2011]. Предполагается участие эозинофилов в ремоделировании стенки пищевода при эозинофильном эзофагите [Aceves S. S. et al., 2007; Rosenberg H. F. et al., 2013]. Что касается опухолевого процесса, то TGF β 1 может проявлять как проопухолевые, так и противоопухолевые функции, выступать в роли промоторов или ингибиторов опухолевого роста [Бабышкина Н.Н. и соавт., 2010; Шевченко В. Е. и соавт., 2016, 2017]. Супрессорные свойства TGF β 1 опосредованы его способностью угнетать пролиферацию эпителиальных клеток, индуцировать их апоптоз и снижать активность теломеразы [Miyazono K. et al., 2012]. В то же время, TGF β 1 участвует в формировании эпителиально-мезенхимального перехода, стимуляции неоангиогенеза, а также реализует иммуносупрессорные функции [Ikushima H. et al., 2009]. Доминирование проонкогенного потенциала TGF β 1 осуществляется через конверсию ранних эпителиальных опухолей в инфильтративные (инвазивные), образующие очаги вторичного опухолевого роста, что сопровождается негативным прогнозом заболевания [Dancea H. C., et al., 2009; Zhao L. et al., 2010]. По данным литературы, TGF β 1 является один из наиболее важных цитокинов в патогенезе прогрессии эпителиальных опухолей [Шевченко В. Е. и соавт., 2017].

По результатам настоящего исследования, эозинофильные гранулоциты крови в условиях *in vitro* интактной культуры клеток характеризовались избыточной секрецией TGF β 1 только у больных раком толстого кишечника с TATE (Таблица 8). При этом повышения γ -IL-5-индуцированной секреции TGF β 1 по сравнению с соответствующим показателем их базальной секреции (отражающей реактивность клеток) зарегистрировано не было.

Установленный нами высокий уровень секреции TGF β 1, с одной стороны, отражает способность эозинофилов проявлять антипролиферативные свойства, а с другой, – опосредовать инфильтративный рост и формирование метастазов. За счет гиперсекреции TGF β 1 (ключевого

иммуносупрессорного цитокина) эозинофилы могут участвовать в подавлении локального противоопухолевого иммунного ответа при участии регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) [Ikushima H. et al., 2009].

Известно, что TGF β 1 может регулировать также опухолевый ангиогенез за счет угнетения секреции ангиостатина и стимуляции выработки сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor) [Lee S. H. et al., 2015]. Последний считается ключевым проангиогенным фактором и специфическим митогеном для эндотелиальных клеток [Puxeddu I. et al., 2006; Melo R. C. et al., 2008]. По данным J. Folkman (2006), VEGF опосредует образование не только кровеносных, но и лимфатических сосудов [Folkman J., 2006]. В исследованиях, проведенных К. Wang et al. (2012), показана способность VEGF потенцировать опухолевый неоангиогенез за счет привлечения гемопоэтических и эндотелиальных прекурсоров костного мозга [Wang K. et al., 2012].

Известно, что источником VEGF могут быть как опухолевые клетки, так и элементы микроокружения [Sakkal S. M. et al., 2016; Varricchi G. et al., 2017]. Высокая экспрессия VEGF опухолевыми клетками зарегистрирована при раке легких и аденокарциноме предстательной железы [Wang K. et al., 2012]. В других исследованиях установлен высокий сывороточный уровень VEGF у больных раком молочной железы, колоректальным и почечно-клеточным раком [Niu G. et al., 2010; Lee S. H. et al., 2015]. В очагах некроза опухолевой ткани толстого кишечника показана гиперсекреция VEGF эозинофильными гранулоцитами, инфильтрирующими опухоль [Nissim Ben Efraim A. H. et al., 2010; Shamri R. et al., 2010].

В нашем исследовании у больных раком толстого кишечника проанализирована способность эозинофилов периферической крови секретировать VEGF в *in vitro* интактной культуре клеток и при стимуляции r-IL-5. У всех пациентов с раком толстого кишечника независимо от наличия TATE средние значения базальной и индуцированной r-IL-5 *in vitro* секреции

VEGF эозинофилами крови были сопоставимыми с нормой (Таблица 9). Сходные результаты были получены и при исследовании экспрессии комплементарного рецептора VEGFR в опухолевой ткани у обследованных нами пациентов с колоректальным раком (Таблица 10).

Известно, что рецепторы к VEGF локализуются преимущественно на мембране эндотелиальных клеток, однако их присутствие зарегистрировано также на злокачественно трансформированных клетках предстательной железы, щитовидной железы, рака шейки матки и др. [Pallares J. et al., 2006; Rodriguez-Antona C. et al., 2010]. Данное обстоятельство указывает на дуализм свойств сосудистого эндотелиального фактора роста, проявляющего как прямое, так и опосредованное действие на пролиферацию опухолевых клеток.

Результаты иммуногистохимического исследования позволили констатировать мембранную экспрессию VEGFR опухолевыми клетками во всех образцах рака толстого кишечника. При этом процентное содержание опухолевых VEGFR⁺-клеток у больных раком толстого кишечника с TATE достоверно не отличалось от такового у пациентов без эозинофилии. Также нам не удалось выявить взаимосвязи экспрессии внутриопухолевого VEGFR с *in vitro* секрецией VEGF эозинофилами периферической крови и наличием TATE при раке толстого кишечника. Последнее, по-видимому, указывает на отсутствие значимого влияния эозинофильных гранулоцитов на VEGF/VEGFR-опосредованный механизм регуляции пролиферации опухолевых клеток и неоангиогенез. По мнению M. Shibuya (2011), дефицит лиганд-связывающего домена VEGFR в опухолевой ткани толстого кишечника сопряжен с медленным ростом новообразования и низким уровнем метастазирования [Shibuya M., 2011].

Показателем благоприятного прогноза течения рака желудка, рака молочной железы и рака яичников является низкая экспрессия в опухолевой ткани рецептора эпидермального ростового фактора (EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor) [Lieto E. et al., 2008; Niyaz M. et al., 2015]. По

сведениям G. Galizia et al. (2006), экспрессию EGFR в опухоли при колоректальном раке можно рассматривать как прогностический фактор возникновения рецидива и одногодичной летальности больных после лечения [Galizia G. et al., 2006]. При взаимодействии EGF со своим рецептором происходит активация репликации ДНК, наработка онкогенных белков и, как следствие, растормаживание пролиферации опухолевой клетки [Niyaz M. et al., 2015]. Повышенная продукция EGF клеткой является результатом мутационных событий и чрезмерной экспрессии кодирующих генов, составляющих основу патогенеза и прогрессии злокачественных новообразований эпителиального происхождения [Пивень Н. В. и соавт., 2014].

В нашем исследовании у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ и без нее мы проанализировали *in vitro* секрецию EGF эозинофилами периферической крови и экспрессию в опухолевой ткани комплементарного рецептора EGFR. У всех пациентов независимо от присутствия эозинофилов в составе опухолевого микроокружения базальная *in vitro* секреция EGF эозинофилами крови не отличалась от таковой у здоровых доноров (Таблица 9). При добавлении в *in vitro* культуру клеток γ -IL-5 у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ содержание EGF в супернатантах культуральной суспензии эозинофилов достоверно превышало аналогичный контрольный параметр, однако при этом соответствовало его базальному уровню. Последнее обосновывает дефицит функционального резерва эозинофильных гранулоцитов в отношении наработки EGF.

Анализ экспрессии EGFR в образцах рака толстого кишечника позволил выявить статистически значимое снижение (в 1,5 раза) относительного содержания опухолевых EGFR⁺-клеток у больных колоректальным раком с ТАТЕ в сравнении с таковым у пациентов без эозинофилии (Таблица 10). Дефицит экспрессии EGFR в опухолевой ткани существенно снижает

вероятность пролиферации опухолевых клеток под влиянием EGF ввиду дисрегуляции механизмов рецепции и сигнальной трансдукции.

В целом, эозинофилы не вносят существенного вклада в механизм EGF- и VEGF-опосредованной дисрегуляции пролиферации злокачественно трансформированных клеток при колоректальном раке. Секреция EGF и VEGF эозинофилами периферической крови (соответствующая норме) и сниженная экспрессия их рецепторов в опухолевой ткани свидетельствует о нарушении кооперативного взаимодействия эозинофилов и опухолевых клеток, и о потенциальной невовлеченности эозинофильных гранулоцитов в данный механизм прогрессии рака толстого кишечника.

Примечательно, что клеточный состав и функциональная поляризация опухолевого микроокружения могут служить фактором прогноза клинического течения онкологических заболеваний. Многие исследователи сосредоточены на определении влияния интра- и перитуморальных эозинофилов на прогноз злокачественных новообразований различной локализации [Dorta R. G. et al., 2002; Jain M. et al., 2014; Peurala E. et al., 2018]. Одни авторы рассматривают TATE как благоприятный прогностический признак и показатель отсутствия сосудистой инвазии [Harbaum L. et al., 2015; Peurala E. et al., 2018], другие, – указывают на связь эозинофильной инфильтрации опухоли с отрицательным прогнозом течения онкопатологии, низкой выживаемостью больных и усилением неоангиогенеза [Said M. et al., 2005; Jain M. et al., 2014].

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

По результатам исследования среди всех больных колоректальным раком лишь у 24 (24,5 %) человек первичный опухолевый узел распространялся на слизистую и подслизистую оболочки толстого кишечника (T1), и его

мышечный слой (T2), тогда как у 74 (75,5 %) пациентов с диагнозом рака толстого кишечника первичная опухоль инфильтрировала субсерозный слой или перитонизированные участки ободочной кишки (T3) и висцеральную брюшину (или соседние органы) (T4). Сравнительный анализ присутствия эозинофилов в составе опухолевого микроокружения в зависимости от степени прорастания первичной опухоли показал, что среди больных колоректальным раком с TATE первичная опухоль характеризуется менее инвазивным ростом (T1, T2) (Таблица 11). У больных раком толстого кишечника показана связь средней силы между TATE и степенью распространения опухоли T1, T2 (Рисунок 10).

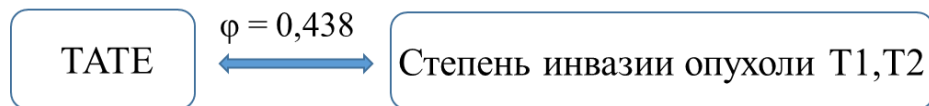


Рисунок 10 – Взаимосвязь опухолеассоциированной тканевой эозинофилии со степенью инвазии опухоли у больных раком толстого кишечника.

Меньшая степень прорастания опухоли при раке толстого кишечника в сочетании с TATE может быть опосредована высокой цитотоксической активностью клеток микроокружения (эозинофилов). Среди всех больных колоректальным раком с TATE установлено достоверное увеличение показателя экспрессии EPX в опухолевой ткани у пациентов с низкой степенью распространения опухоли (Таблица 13).

Полученные нами результаты согласуются со сведениями зарубежных исследователей, по мнению которых, опухолеассоциированная эозинофилия сопряжена с благоприятным фенотипом опухоли [Harbaum L. et al., 2015; Saraiva A. L., Carneiro F., 2018]. Н. Cho et al. (2016) продемонстрировали отрицательную динамику содержания внутриопухолевых эозинофилов по мере прогрессии новообразований [Cho H. et al., 2016]. По данным J. Moezzi et

al. (2000), высокая степень ТАТЕ выявляется при дисплазиях, тогда как в ткани злокачественных новообразований эозинофилы обнаруживаются в значительно меньшем количестве. Авторы описали более высокое содержание интратуморальных эозинофилов при неинвазивном раке толстого кишечника в сравнении с его инвазивной формой [Moezzi J. et al., 2000]. Позитивная роль ТАТЕ подтверждается в экспериментальных исследованиях, демонстрирующих угнетение роста имплантированных опухолей у мышей в присутствии тканевых эозинофилов [Lowe D. et al., 1981]. По сведениям L. Harbaum et al. (2015), наличие ТАТЕ ассоциировано с менее агрессивным характером роста опухоли и более высокой степенью дифференцированности ее клеток [Harbaum L. et al., 2015].

Небезызвестно, что в опухолевых клетках процесс пролиферации превалирует над явлением дифференцировки. При этом степень дифференцированности опухоли определяет выраженность ее агрессии и злокачественности. В клетках высокодифференцированных опухолей сохраняются показатели «здоровых клеток», такие новообразования менее агрессивные и лучше поддаются терапии. Низкодифференцированные опухоли, напротив, характеризуются большей активностью, такие клетки не реализуют специфические свойства, за исключением способности к неконтролируемой пролиферации. В исследованиях, проведенных L. Harbaum et al. (2015) и A. L. Saraiva, F. Carneiro (2018), у больных колоректальным раком с тканевой эозинофилией опухоль характеризовалась более высокой степенью дифференцированности и сохраняла чувствительность к проводимой химиотерапии [Harbaum L. et al., 2015; Saraiva A. L., Carneiro F., 2018].

По результатам настоящего исследования установлено, что у больных раком толстого кишечника с ТАТЕ в 84,3 % случаев опухоли представлены высоко- и умеренно дифференцированными клетками, при этом у больных колоректальным раком без эозинофилии отмечалась сходная тенденция

(Таблица 14). Учитывая то, что высокодифференцированные клетки новообразования неполностью утрачивают иммуногенные свойства, реакции клеток врожденного и адаптивного иммунитета на трансформированные клетки более выражены и, возможно, сопряжены с привлечением многих участников опухолевого микроокружения, в том числе эозинофилов. По данным литературы, наличие ТАТЕ при колоректальном раке может иметь важное прогностическое значение [Harbaum L. et al., 2015]. Так, R. G. Dorta et al. (2002) продемонстрировали связь эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани с умеренной и высокой степенью дифференцированности клеток опухоли и отсутствием очагов регионарного метастазирования [Dorta R. G. et al., 2002]. Полученные данные ученые объясняют непосредственным влиянием эозинофильных катионных белков на опухолевые клетки.

Маркерным критерием прогрессии опухоли также является метастазирование. Очаги вторичного опухолевого роста обнаруживаются прежде всего в регионарных лимфатических узлах. Образование метастазов весьма длительный процесс, формирующийся порой на начальной стадии опухолевого процесса; присутствие лимфогенных и гематогенных метастазов является негативным прогностическим признаком заболевания. Некоторые исследователи пытаются выявить связь между появлением очагов метастазирования в регионарных лимфатических узлах и присутствием эозинофилов в составе опухолевой ткани. По мнению D. T. Oliveira et al. (2012), у пациентов с плоскоклеточным раком полости рта ТАТЕ может служить дополнительным критерием прогноза присутствия скрытых метастазов в лимфатических узлах. G. Falconieri et al. (2008) показали, напротив, менее агрессивное клиническое течение плоскоклеточного рака полости рта, сопровождающегося выраженной ТАТЕ [Falconieri G. et al., 2008]. У пациентов с колоректальным раком установлена ассоциация эозинофильной инфильтрации опухоли с отсутствием очагов отдаленного метастазирования [Nagtegaal I. D. et al., 2001]. Аналогичный вывод сделали A. L. Saraiva,

F. Carneiro (2018), констатируя выраженную TATE при раке толстого кишечника без метастазов [Saraiva A. L., Carneiro F., 2018].

По результатам проведенного нами исследования, у больных раком толстого кишечника с TATE метастазы в регионарных лимфатических узлах регистрировались лишь в 9,8 % случаев, что существенно ниже такового у больных колоректальным раком без TATE (Таблица 15). При этом очаги отдаленного метастазирования отсутствовали у большинства больных колоректальным раком как с TATE, так и без нее (Таблица 16). У больных раком толстого кишечника установлена связь средней силы ($\phi = 0,314$) между наличием тканевой эозинофилии и отсутствием лимфогенных метастазов (Рисунок 11).

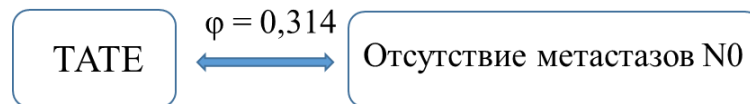


Рисунок 11 – Взаимосвязь опухолеассоциированной тканевой эозинофилии с отсутствием регионарных метастазов у больных раком толстого кишечника.

Последнее обосновывает взаимосвязь TATE с низким метастатическим потенциалом опухоли при раке толстого кишечника. Отсутствие очагов регионарного метастазирования при раке толстого кишечника в сочетании с TATE может быть обусловлено прямым влиянием на опухолевые клетки эозинофильных катионных белков, а также связано с гипоэкспрессией EGFR на опухолевых клетках. Дефицит экспрессии EGFR обуславливает неэффективное проведение сигнала внутрь клетки и как следствие, уменьшает пролиферативную активность опухолевых клеток, темпы развития и прогрессии опухоли.

Таким образом, опухолеассоциированная тканевая эозинофилия при раке толстого кишечника сопряжена с меньшей степенью инвазии новообразования, отсутствием метастазов в регионарных лимфатических

узлах и не влияет на степень дифференцированности клеток опухоли. Это обосновывает TATE при раке толстого кишечника как предиктор благоприятного клинического течения болезни (Рисунок 12).

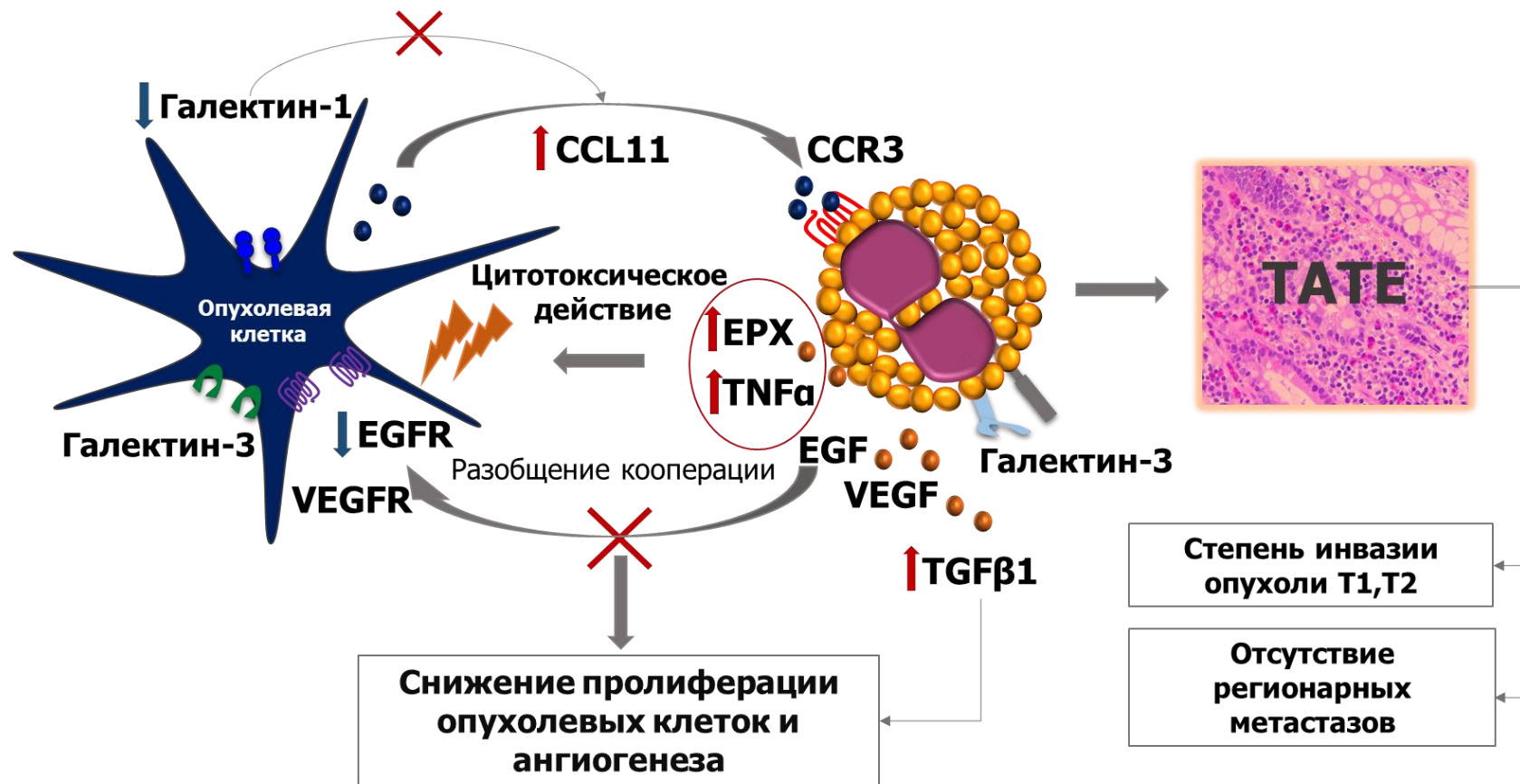


Рисунок 12. Особенности кооперации эозинофилов и опухолевых клеток при раке толстого кишечника с TATE.

Примечание: CCL11 – эотаксин-1, CCR3 – рецептор к эотаксину, EPX – эозинофильная пероксидаза, TNF – фактор некроза опухоли, TGF – трансформирующий фактор роста, EGF – эпидермальный фактор роста, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста, VEGFR – рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста, TATE – опухолеассоциированная тканевая эозинофилия. По результатам собственных исследований.

Заключение

Ключевым фактором рекрутирования эозинофилов в опухолевую ткань при раке толстого кишечника является гиперэкспрессия опухолевыми клетками SCL11/эотаксина, действующего через комплементарный рецептор SCR3. Продемонстрирована способность опухолевых клеток модулировать эотаксин-зависимый механизм миграции эозинофилов в ткань новообразования. У больных раком толстого кишечника с TATE установлена внутриопухолевая гипоекспрессия галектина-1, ассоциированная с высоким содержанием опухолевых SCL11⁺-клеток, привлекающих эозинофилы в ткань новообразования. При этом у больных колоректальным раком без TATE экспрессия галектина-1 опухолевыми клетками сопровождается, напротив, снижением (относительно такового у больных с эозинофилией) SCL11/эотаксина в опухоли. Опухолевый галектин-1, по-видимому, является фактором негативной регуляции хемотаксиса эозинофилов в ткань новообразования и может опосредовать «ускользание» опухолевых клеток от агрессивного влияния эозинофилов.

Процентное содержание опухолевых галектин-3⁺-клеток и экспрессия м-РНК гена *LGALS3* в эозинофилах крови у всех больных раком толстого кишечника (с TATE и без) были сопоставимыми. Высокая экспрессия галектина-3 в эозинофилах крови при раке толстого кишечника независимо от присутствия TATE определяет скорее адгезивные свойства данного лектина, реализующиеся на этапе фиксации эозинофилов к сосудистому эндотелию и их роллинга, тогда как дальнейшая миграция клеток в опухоль обеспечивается SCL11. Последний может влиять не только на рекрутирование эозинофилов в опухоль, но и индуцировать их цитотоксическую функцию.

У больных раком толстого кишечника с TATE установлены высокая экспрессия в опухолевой ткани EPX (ассоциированная с гиперэкспрессией SCL11) и *in vitro* гиперсекреция TNF α эозинофильными гранулоцитами

периферической крови. Избыточная экспрессия ЕРХ в образцах рака толстого кишечника с тканевой эозинофилией обусловлена не только большим числом клеток, содержащих ЕРХ, но и более высокой активностью фермента в составе эозинофильных гранул. Однонаправленные изменения показателя экспрессии ЕРХ в опухоли и *in vitro* секреции TNF α гемических эозинофилами при раке толстого кишечника с ТАТЕ отражают синергизм действия данных факторов, способных повреждать клетки опухоли.

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

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

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

ВЫВОДЫ

1. Развитие тканевой эозинофилии при раке толстого кишечника связано с повышением содержания опухолевых CCL11⁺-клеток и, напротив, снижением экспрессии галектина-1 клетками опухоли. Относительное содержание CCR3⁺-клеток опухолевого микроокружения, а также экспрессия галектина-3 опухолевыми клетками и эозинофилами крови у больных раком толстого кишечника не зависят от наличия опухолеассоциированной тканевой эозинофилии (ТАТЕ).
2. Галектин-1 препятствует рекрутированию эозинофилов в опухоль, что подтверждается отрицательной корреляцией между экспрессией галектина-1 и CCL11 опухолевыми клетками у больных раком толстого кишечника. Галектин-3 (на клетках опухоли и эозинофилах крови) не оказывает влияния на эотаксин-опосредованную миграцию эозинофилов в ткань новообразования при раке толстого кишечника.
3. Тканевая эозинофилия при раке толстого кишечника ассоциирована с высокой экспрессией эозинофильной пероксидазы в опухоли (в сочетании с повышением числа опухолевых CCL11⁺-клеток) и *in vitro* гиперсекрецией эозинофилами крови TNF α (базальной и γ -IL-5-индуцированной) и TGF β 1 (базальной). *In vitro* секреция проангиогенных факторов роста EGF и VEGF эозинофилами крови у больных с ТАТЕ и без эозинофилии не различается.
4. При раке толстого кишечника с ТАТЕ экспрессия опухолевыми клетками EGFR (ниже, чем у больных без эозинофилии) и VEGFR (сопоставимая с таковой у больных без эозинофилии) не коррелирует с секрецией эозинофилами крови комплементарных цитокинов EGF и VEGF, что свидетельствует о разобщении механизма EGF/VEGF-опосредованной кооперации эозинофилов и опухолевых клеток в патогенезе опухолевой прогрессии при раке толстого кишечника.
5. Опухлеассоциированная тканевая эозинофилия у больных раком толстого кишечника сочетается с менее выраженной степенью

распространения опухоли (T1, T2 в сочетании с высокой активностью эозинофильной пероксидазы в опухолевой ткани) и отсутствием очагов регионарного метастазирования, но не влияет на степень дифференцированности клеток опухоли и формирование гематогенных метастазов.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭ – показатель экспрессии

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

CCR (C-C chemokine receptor) – хемокиновый рецептор

CD (clusters of differentiation) – дифференцировочные антигены

COLO – клеточная линия колоректального рака

ECP (eosinophil cationic protein) – эозинофильный катионный протеин

EDN (eosinophil-derived neurotoxin) – эозинофильный нейротоксин

EPX (eosinophil peroxidase) – эозинофильная пероксидаза

EGF (Epidermal Growth Factor) – эпидермальный фактор роста

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) – рецептор эпидермального фактора роста

Ig (immunoglobulin) – иммуноглобулин

IL (interleukin) – интерлейкин

NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted) – регуляция активации, экспрессии и секреции нормальных Т-клеток

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

TCR (T-cell receptor) – Т-клеточный антиген-распознающий рецептор

TGF (transforming growth factor) – трансформирующий фактор роста

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

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

VLA (very late antigen) – антигены на поверхности клеток на поздней стадии

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гржибовский, А.М. Анализ номинальных данных (независимые наблюдения) / А.М. Гржибовский // Экология человека. – 2008. – № 6. – С. 58–68.
2. Злокачественные новообразования в России в 2019 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, 2020. – 250 с.
3. Колобовникова, Ю.В. Эозинофил в норме и при патологии / Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий. – Томск : Печатная мануфактура, 2014. – 124 с.
4. Меркулов, Г.А. Курс патологогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л. : Медицина, 1996. – 544 с.
5. Молекулярные детерминанты действия трансформирующего фактора роста бета-1 на клетки глиобластомы человека / В.Е. Шевченко, С.В. Ковалев, Н.Е. Арноцкая [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – Т. 3, № 2. – С. 50–59.
6. Роль галектина-1, -3 в механизмах дисрегуляции Т-клеточного звена иммунного ответа при раке толстого кишечника / В.С. Полетика, Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 76–82.
7. Роль трансформирующего ростового фактора TGF- β 1 в патогенезе рака молочной железы / Н.Н. Бабышкина, Е.А. Малиновская, М.Н. Стахеева [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – № 6. – С. 63–70.
8. 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.

9. Сергиенко, В.И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 306 с.
10. Трансформирующий фактор роста бета-1 в онкогенезе денокарциномы легкого человека / В.Е. Шевченко, И.С. Брюховецкий, З.Н. Никифорова [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – Т. 4, № 3. – С. 67–74.
11. 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. – Т. 3, № 32. – С. 55–59.
12. Эпидермальный фактор роста и его рецепторы как перспективные клиничко-диагностические и прогностические маркеры онкопатологии / Н.В. Пивень, А.И. Бураковский, В.И. Прохорова [и др.] // Онкологический журнал. – 2014. – № 1(29). – С. 82–92.
13. Tumor eosinophil infiltration and improved survival of colorectal cancer patients: Iowa Women's Health Study / A.E. Prizment, R.A. Vierkant, T.C. Smyrk [et al.] // Mod. Pathol. – 2016. – Vol. 29. – P. 516–527.
14. 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils / A. Munitz, I. Bachelet, S. Fraenkel [et al.] // J. Immunol. – 2005. – Vol. 174, No 1. – P. 110–118.
15. 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. – 2017. – Vol. 54, No 6. – P. 349–354.
16. A functional $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex distinct from $\gamma\delta$ T cells is expressed by human eosinophils / F. Legrand, V. Driss, G. Woerly [et al.] // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, No 6. – e5926.
17. Activated eosinophils infiltrate MCF-7 breast multicellular tumor spheroids / P. M. Furbert-Harris, I. Laniyan, D. Harris [et al.] // Anticancer Res. – 2003. – Vol. 23, No 1A. – P. 71–78.
18. Akuthota, P. Eosinophils and disease pathogenesis / P. Akuthota, P.F. Weller // Semin. Hematol. – 2012. – Vol. 49, No 2. – P. 113–119.

19. 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, No 2. – P. 147–152.
20. Allergen-induced airway remodeling is impaired in galectin-3-deficient mice / X.N. Ge, N.S. Bahaie, B.N. Kang [et al.] // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, No 2. – P. 1205–1214.
21. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer / L.E. Dow, K.P. O'Rourke, J. Simon [et al.] // *Cell.* – 2015. – Vol. 161, No 7. – P. 1539–1552.
22. Assessment of tissue eosinophilia as a prognosticator in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma – an image analysis study / M. Jain, S. Kasetty, U.S. Sudheendra [et al.]. – Text : electronic // *Patholog. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3945429/>. (date of the application 26.05.2022).
23. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors / H. Ikushima, T. Todo, Y. Ino [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2009. – Vol. 5, No 5. – P. 504–514.
24. Bartolazzi, A. Galectins in Cancer and Translational Medicine: From Bench to Bedside / A. Bartolazzi // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol, 19, No 10. – P. 2934.
25. Blanchard, C. Biology of the eosinophil / C. Blanchard, M.E. Rothenberg // *J. Adv. Immunol.* – 2009. – Vol. 101. – P. 81–121.
26. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense / S. Yousefi, J.A. Gold, N. Andina [et al.] // *Nat. Med.* – 2008. – Vol. 14, No 9. – P. 949–953.
27. C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5) levels in gastric cancer patient sera predict occult peritoneal metastasis and a poorer prognosis / T. Wang, Y. Wei, L. Tian [et al.] // *Int. J. Surg.* – 2016. – Vol. 32. – P. 136–142.
28. CCL11-induced eosinophils inhibit the formation of blood vessels and cause tumor necrosis / Y. Xing, Y. Tian, T. Kurosawa [et al.] // *Genes. Cells.* – 2016. – Vol. 21, No 6. – P. 624–638.

29. Changes of circulating transforming growth factor beta1 level during radiation therapy are correlated with the prognosis of locally advanced non-small cell lung cancer / L. Zhao, W. Ji, L. Zhang [et al.] // *J. Thorac Oncol.* – 2010. – Vol. 5, No 4. – P. 521–525.
30. 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, No 6. – P. 3696–3704.
31. Cheng, X.J. Etiology and Prevention of Gastric Cancer / X.J. Cheng, J.C. Lin, S.P. Tu // *Gastrointest. Tumors.* – 2016. – Vol. 3, No 1. – P. 25–36.
32. Chusid, M.J. Eosinophils: Friends or Foes? / M.J. Chusid // *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* – 2018. – Vol. 6, No 5. – P. 1439–1444.
33. Contextspecific effects of fibulin-5(DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades / W.P. Schiemann, G.C. Blobe, D.E. Kalume [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 27367–27377.
34. 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, No 4. – P. 268–280.
35. CTLA4 blockade promotes vessel normalization in breast tumors via the accumulation of eosinophils / X. Zheng, N. Zhang, L. Qian [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2020. – Vol. 146, No 6. – P. 1730–1740.
36. Dancea, H.C. Role of radiation-induced TGF-beta signaling in cancer therapy / H.C. Dancea, M.M. Shareef, M.M. Ahmed // *Mol. Cell Pharmacol.* – 2009. – Vol. 1, No 1. – P. 44–56
37. Davis, B.P. Eosinophils and cancer / B.P. Davis, M.E. Rothenberg // *Cancer Immunol. Res.* – 2014. – Vol. 2, No 1. – P. 1–8.
38. Davoine, F. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity / F. Davoine, P. Lacy. – Text : electronic // *Front. Immunol.* –

2014. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00570/full> (date of the application 26.05.2022).

39. 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, No 2. – P. 450–456.

40. Differential activation of CC chemokine receptors by AOP-RANTES / J. Elsner, M. Mack, H. Brühl [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, No 11. – P. 7787–7794.

41. 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, No 4. – P. 239–244.

42. Duffy, M.J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients / M.J. Duffy // *J. Cancer Treatment Reviews.* – 2011. – Vol. 37, No 2. – P. 151–159.

43. Dumont, N. Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells / N. Dumont, A.V. Bakin, C.L. Arteaga // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 3275–3285.

44. Ellyard, J.I. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? / J.I. Ellyard, L. Simson, C.R. Parish // *Tissue Antigens.* – 2007. – Vol. 70. – P. 1–11.

45. Eosinophil ablation and tumor development / D.T. Wong, S.M. Bowen, A. Elovic [et al.] // *Oral. Oncol.* – 1999. – Vol. 35. – P. 496–501.

46. Eosinophil ETosis and DNA Traps: a New Look at Eosinophilic Inflammation / S. Ueki, T. Tokunaga, S. Fujieda [et al.]. – Text : electronic // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2016. – Vol. 16. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11882-016-0634-5> (date of the application 26.05.2022).

47. Eosinophil Response Against Classical and Emerging Respiratory Viruses: COVID-19 / J.M. Rodrigo-Muñoz, B. Sastre, J.A. Cañas [et al.] // *J. Investig Allergol. Clin. Immunol.* – 2021. – Vol. 31, No 2. – P. 94–107.

48. Eosinophil tumor cellinteraction in advanced gastric carcinoma: an electron microscopic approach / R.A. Caruso, A. Bersiga, L. Rigoli, C. Infrerra // *Anticancer Res.* – 2004. – Vol. 22, No 6. – P. 3833–3836.
49. 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, No 37. – P. 1–9.
50. 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, No 10. – P. 759–761.
51. Eosinophilia is a favorable prognostic marker for oral cavity and lip squamous cell carcinoma / E. Peurala, M. Tuominen, E. Löyttyniemi [et al.] // *APMIS.* – 2018. – Vol. 126, No 3. – P. 201–207.
52. 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, No 5. – P. 322–327.
53. Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable? / S. Sakkal, S. Miller, V. Apostolopoulos, K. Nurgali // *Curr. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 23, No 7. – P. 650–666.
54. 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, No 1. – P. 45–51.
55. 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, No 6. – P. 1523–1528.
56. Eosinophils Target Therapy for Severe Asthma: Critical Points / L. Brussino, E. Heffler, C. Bucca [et al.]. – Text : electronic // *Biomed. Res. Int.* – 2018. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/7582057/> (date of the application 26.05.2022).
57. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease / S.P. Hogan, H.F. Rosenberg, R. Moqbel [et al.] // *Clin. Exp. Allergy.* – 2006. – Vol. 38, No 5. – P. 709–750.

58. Etiology of stomach cancer (C16) in Central and South America / P. Cueva, M.S. Sierra, L.E. Bravo, D. Forman. Text : electronic // Cancer in Central and South America. – Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2016. – URL: https://gco.iarc.fr/includes/CSA_Chp_4-3_Stomach.pdf (date of the application 26.05.2022).
59. Expression and prognostic significance of CCL11/CCR3 in glioblastoma / M. Tian, L. Chen, L. Ma [et al.] // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7, No 22. – P. 32617–32627.
60. Expression of galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion through upregulation of integrin β 1 / X.J. He, H.Q. Tao, Z.M. Hu [et al.] // Cancer Sci. – 2014. – Vol. 105, No 11. – P. 1402–1410.
61. 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, No 1. – P. 69–79.
62. Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis / A. Fortuna-Costa, A.M. Gomes, E.O. Kozlowski [et al.] // Front Oncol. – 2014. – Vol. 4. – P. 138.
63. Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor as a target for anticancer therapy / N. Ferrara // Oncologist. – 2004. – Vol. 9, suppl. 1. – P. 2–10.
64. Folkman, J. Angiogenesis / J. Folkman // Annu. Rev. Med. – 2006. – Vol. 57. – P. 1–18.
65. Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration / C. Delbrouck, I. Doyen, N. Belot [et al.] // Lab. Invest. – 2002. – Vol. 82, No 2. – P. 147–158.
66. Galectin-3 Functions as an Adhesion Molecule to Support Eosinophil Rolling and Adhesion under Conditions of Flow / S.P. Rao, Z. Wang, R. Zuberi [et al.] // J. Immunol. – 2007. – Vol. 179, No 11. – P. 7800–7807.
67. Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy / A.H. Ebrahim, Z. Alalawi, L. Mirandola [et al.] // Ann Transl Med. – 2014. – Vol. 2, N 9. – P. 88.

68. 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, No 2. – P. 82–90.
69. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2018. – Vol. 68, No 6. – P. 394–424.
70. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors / D.O. Croci, J.P. Cerliani, T. Dalotto-Moreno [et al.] // *Cell.* – 2014. – Vol. 156, No 4. – P. 744–758.
71. Hirohito, K. Eosinophils: multifaceted biologic properties and roles in health and disease / K. Hirohito // *Immunol. Rev.* – 2011. – Vol. 242, No 1. – P. 161–177.
72. Human eosinophil adhesion and degranulation stimulated with eotaxin and RANTES in vitro: Lack of interaction with nitric oxide / L. Lintomen, G. Franchi, A. Nowill [et al.]. – Text : electronic // *BMC Pulm. Med.* – 2008. – Vol. 8. – URL: <https://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2466-8-13> (date of the application 26.05.2022).
73. 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, No 12. – P. 7443–7451.
74. Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis / I. Puxeddu, A. Alian, A.M. Piliponsky [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 37, No 3. – P. 628–636.
75. Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis / I. Puxeddu, A. Alian, A.M. Piliponsky [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 37, No 3. – P. 628–636.
76. HuR small-molecule inhibitor elicits differential effects in adenomatous polyposis and colorectal carcinogenesis / M. Lang, D. Berry, K. Passecker [et al.] // *Cancer Res.* – 2017. – Vol. 77. – P. 2424–2438.

77. Immunohistochemical localization of galectin-3 in the pig retina during postnatal development / J. Kim, C. Moon, M. Ahn [et al.] // *Mol. Vis.* – 2009. – Vol. 15. – P. 1971–1976.
78. Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process / J. Mattes, M. Hulett, W. Xie [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 197. – P. 387–393.
79. Inman, G.J. Apoptosis induced by TGF-beta 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent / G.J. Inman, M.J. Allday // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – P. 2500–2510.
80. 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.
81. Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis / M. Albert-Bayo, I. Paracuellos, A.M. González-Castro [et al.] // *Cells.* – 2019. – Vol. 8. – P. 135.
82. 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, No 19. – P. 28570–28578.
83. Intravital imaging of eosinophils: Unwrapping the enigma / N.T. Nguyen William, E.A. Jacobsen, A.M. Finney Constance [et al.] // *J. Leukoc Biol.* – 2020. – Vol. 108, No 1, – P. 83–91.
84. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response / S. Gatault, F. Legrand, M. Delbeke [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2012. – Vol. 61, No 9. – P. 1527–1534.
85. Kita, H. Eosinophils: multifaceted biologic properties and roles in health and disease / H. Kita // *Immunol. Rev.* – 2011. – Vol. 242, No 1. – P. 161–177.
86. 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, No 5. – P. 1110–1117.

87. Lin, S.Y. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase / S.Y. Lin, S.J. Elledge // *Cell*. – 2003. – Vol. 113. – P. 881–889.
88. Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect – a histopathological and immunohistochemical study / I.D. Nagtegaal, C.A. Marijnen, E.K. Kranenbarg [et al.]. – Text : electronic // *BMC Cancer*. – 2001. – Vol. 1. – URL: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-1-7> (date of the application 26.05.2022).
89. Loktionov, A. Eosinophils in the gastrointestinal tract and their role in the pathogenesis of major colorectal disorders / A. Loktionov // *World J. Gastroenterol.* – 2019. – Vol. 25. – P. 3503–3526.
90. Lowe, D. Tumour-associated eosinophilia: A review / D. Lowe, J. Jorizzo, M.S.R. Hutt // *J. Clin. Pathol.* – 1981. – Vol. 34. – P. 1343–1348.
91. Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins / R.C. Melo, L.A. Spencer, A.M. Dvorak, P.F. Weller // *J. Leukoc. Biol.* – 2008. – Vol. 83. – P. 229–236
92. 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, No 14. – P. 2787–2799.
93. Miyazono, K. Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer / K. Miyazono, S. Ehata, D. Koinuma // *Ups. J. Med. Sci.* – 2012. – Vol. 117, No 2. – P. 143–152.
94. 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, No 2. – P. 1055–1064.
95. Muller, M.F. Molecular pathological classification of colorectal cancer / M.F. Muller, E.K. Ashraf, M.J. Ibrahim // *Virchows Arch.* – 2015. – Vol. 469. – P. 125–134.

96. Nissim Ben Efraim, A. H. Hypoxia modulates human eosinophil function / A. H. Nissim Ben Efraim, R. Eliashar, F. Levi-Schaffer. – Text : electronic // Clin. Mol. Allergy. – 2010. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2923626/> (date of the application 26.05.2022).
97. N-nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study / Y.H. Loh, P. Jakszyn, R.N. Luben [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. – 2011. – Vol. 93. – P. 1053–1061.
98. 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, No 1. – P. 7–16.
99. Park, Y.M. Eosinophil Survival and Apoptosis in Health and Disease / Y.M. Park, B.S. Bochner // J. Allergy Asthma Immunol. Res. – 2010. – Vol. 2, No 2. – P. 87–101.
100. 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, No 3. – P. 288–289.
101. Peritumoral eosinophils predict recurrence in colorectal cancer / L. Harbaum, M.J. Pollheimer, P. Kornprat [et al.] // Mod. Pathol. – 2015. – Vol. 28, No 3. – P. 403–413.
102. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / M.W. Pfaffl // Nucleic Acids Res. – 2001. – Vol. 29, No 9. – P. 45.
103. 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, No 6. – P. 1131–1139.
104. Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis / S.H. Lee, D. Jeong, Y.-S. Han, M.J. Baek // Ann. Surg. Treatment Res. – 2015. – Vol. 89, No 1. – P. 1–8.

105. 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, No 2. – P. 241–248.
106. Precancerous colorectal lesions (Review) / V. Conteduca, D. Sansonno, S. Russi, F. Dammacco // *Int J Oncol.* – 2013. Vol. 43, No 4. – P. 973–984.
107. 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, No 7. – P. 1544–1548.
108. 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, No 6. – P. 823–835.
109. 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, No 6. – P. 563–569.
110. 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, No 3. – P. 232–250.
111. Rao, S.P. Regulation of Eosinophil Recruitment and Activation by Galectins in Allergic Asthma / S.P. Rao, X.N. Ge, P. Sriramarao. – Text : electronic // *Front. Med. (Lausanne).* – 2017. – Vol. 4. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5450023/> (date of the application 26.05.2022).
112. Ravin, K.A. The Eosinophil in Infection / K.A. Ravin, M. Loy // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* – 2016. – Vol. 50, No 2. – P. 214–227.
113. Rawla, P. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention / P. Rawla, A. Barsouk // *Prz. Gastroenterol.* – 2019. – Vol. 14, No 1. – P. 26–38.
114. 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, No 7. – P. 4222–4229.

115. Regulation of eosinophilia and allergic airway inflammation by the glycan-binding protein galectin-1 / X.N. Ge, S.G. Ha, Y.G. Greenberg [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – Vol. 113, No 33. – P. E4837–E4846.
116. Resident intestinal eosinophils constitutively express antigen presentation markers and include two phenotypically distinct subsets of eosinophils / J.J. Xenakis, E.D. Howard, K.M. Smith [et al.] // *Immunology.* – 2018. – Vol. 154, No 2. – P. 298–308.
117. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis / Y.V.N. Cavalcanti, M.C.A. Brelaz, J.K. Neves [et al.] // *J. Pulm. Med.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–10.
118. 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, No 1. – P. 9–22.
119. Rothenberg, M.E. Eosinophils in the new millennium / M.E. Rothenberg // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 11. – P. 1321–1322.
120. Rothenberg, M.E. The eosinophil / M.E. Rothenberg, S.P. Hogan // *Annu. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 147–174.
121. Saif, M.W. Biology of colorectal cancer / M.W. Saif, E. Chu // *Cancer J.* – 2010. – Vol. 16, No 3. – P. 196–201.
122. Saraiva, A.L. New Insights Into the Role of Tissue Eosinophils in the Progression of Colorectal Cancer: A Literature Review / A.L. Saraiva, F. Carneiro // *Acta. Med. Port.* – 2018. – Vol. 31, No 6. – P. 329–337.
123. 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, No 9. – P. 627–637.
124. 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, No 3. – P. 279–287.

125. Seoane, J. TGF- β family signaling in tumor suppression and cancer progression / J. Seoane, R. Gomis // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2017. – Vol. 9, No 12. – P. a022277.
126. Shamri, R. Eosinophils in innate immunity: an evolving story / R. Shamri, J.J. Xenakis, L.A. Spencer // *Cell Tissue Res.* – 2011. – Vol. 343, No 1. – P. 57–83.
127. Shibuya, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis / M. Shibuya // *Genes Cancer.* – 2011. – Vol. 2, No 12. – P. 1097–1105.
128. Sierra, M.S. Etiology of colorectal cancer (C18-20) in Central and South America / M.S. Sierra, D. Forman. – Text : electronic // *Cancer in Central and South America.* – Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2016. – URL: https://gco.iarc.fr/includes/CSA_Chapter_4-4_Colon-and-Rectum.pdf (date of the application 26.05.2022).
129. 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, No 1. – P. 3–13.
130. 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, No 7. – P. 689–701.
131. Spencer, L.A. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights / L.A. Spencer, P.F. Weller // *Immunol. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 88, No 3. – P. 250–256.
132. Stenfeldt, A.L. Danger signals derived from stressed and necrotic epithelial cells activate human eosinophils / A.L. Stenfeldt, C. Wenneras // *Immunology.* – 2004. – Vol. 112. – P. 605–614.
133. Stromal eosinophilia in colonic epithelial neoplasms / J. Moezzi, N. Gopalswamy, R.J. Haas Jr. [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2000. – Vol. 95, No 2. – P. 520–523.
134. 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.* – 2006. – Vol. 21, No 8. – P. 857–865.

135. Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression / M.R. Girotti, M. Salatino, T. Dalotto-Moreno, G.A. Rabinovich // *J Exp Med.* – 2020. – Vol. 217, No 2. – P. e2018204.

136. 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, No 8. – P. 463–485.

137. Tashkin, D.P. Role of eosinophils in airway inflammation of chronic obstructive pulmonary disease / D.P. Tashkin, M.E. Wechsler // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2018. – Vol. 13. – P. 335–349.

138. 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, No 8. – P. 5341–5350.

139. 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, No 19. – P. 3882–3890.

140. The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness / A.A. Humbles, B. Lu, D.S. Friend [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, No 3. – P. 1479–1484.

141. 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, No 10. – P. 1125–1130.

142. The relationships between cellular components of the peritumoural inflammatory response, clinicopathological characteristics and survival in patients with primary operable colorectal cancer / C.H. Richards, K.M. Flegg, C.S. Roxburgh [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2012. – Vol. 106. – P. 2010–2015.

143. Tissue eosinophilia: a morphologic marker for assessing stromal invasion in laryngeal squamous neoplasms / M. Said, S. Wiseman, J. Yang [et al.]. – Text : electronic // *BMC Clin. Pathol.* – 2005. – Vol. 5, No 1. – URL: <http://www.biomedcentral.com/1472-6890/5/1> (date of the application 26.05.2022).

144. 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, No 3. – P. 217–225.
145. 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.
146. 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, No 6. – P. 21–25.
147. 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, No 2. – P. 152–157.
148. 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, No 4. – P. ZC65–ZC68.
149. Wahl, S.M. TGF-h: a mobile purveyor of immune privilege / S.M. Wahl, J. Wen, N. Moutsopoulos // *Immunol. Rev.* – 2006. – Vol. 213. – P. 213–227.
150. Wang, K. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with prostate cancer: a systematic review with meta-analysis / K. Wang, H.L. Peng, L.K. Li // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2012. – Vol. 13, No 11. – P. 5665–5669.
151. Wiseman, M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective / M. Wiseman // *Proc. Nutr. Soc.* – 2008. – Vol. 67. – P. 253–256.
152. Yang, B. Regulatory Eosinophils in Inflammation and Metabolic Disorders / B. Yang, J. Seoh, M.H. Jang // *Immune Netw.* – 2017. – Vol. 17, No 1. – P. 41–47.
153. Yang, R.Y. Galectins: structure, function and therapeutic potential / R.Y. Yang, G.A. Rabinovich, F.T. Liu // *Expert Rev Mol Med.* – 2008. – Vol. 10. – P. e17.

154. Zuo, L. Gastrointestinal eosinophilia / L. Zuo, M.E. Rothenberg // Immunol. Allergy Clin. North Am. – 2007. – Vol. 27, No 3. – P. 443–455.