

На правах рукописи

НОВИКОВА
Инна Арнольдовна

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
КЛЕТОЧНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК РАКА
ОБОДОЧНОЙ КИШКИ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН **Кит Олег Иванович**
доктор медицинских наук, профессор **Златник Елена Юрьевна**

Официальные оппоненты:

Титов Константин Сергеевич – доктор медицинских наук, доцент, Медицинский институт федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов», профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики им. В.П. Харченко (Москва)

Абакушина Елена Вячеславовна – доктор медицинских наук, ООО «Текон Медицинские приборы», руководитель отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии, заместитель генерального директора (Москва)

Раскин Григорий Александрович – доктор медицинских наук, Общество с ограниченной ответственностью «Лечебно-диагностический центр Международного института биологических систем им. Сергея Березина», заведующий патологоанатомическим отделением (Санкт-Петербург)

Ведущая организация:

Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2023 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.033.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68) и на сайте <http://www.niioncologii.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета 21.1.033.01,
доктор медицинских наук

Филатова Лариса Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Колоректальный рак (КРР) является третьим по распространенности онкологическим заболеванием в мире и второй по частоте причиной смерти от него (Siegel R.L. et al., 2017; Bray F. et al., 2018; Akimoto N. et al., 2021).

Стандартизированные по возрасту показатели заболеваемости КРР существенно различаются на различных континентах и являются самыми высокими в Австралии (36,9 случая на 100 000 человек) и Новой Зеландии (35,3 на 100 000 человек) и самыми низкими в Африке (8,2 на 100 000 человек), Южной и Центральной Азии (4,9 на 100000) (Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al., 2017; Bray F. et al., 2018; Sung H. et al., 2021). Различия в заболеваемости могут быть связаны с генетической предрасположенностью, социально-экономическим статусом, воздействием окружающей среды, питанием, образом жизни и/или методами скрининга (Keum N., Giovannucci E., 2019). В Российской Федерации в 2019 г. показатель распространенности рака ободочной и прямой кишки суммарно составил 275,7 на 100 000 населения, что выше уровня 2009 г. и 2015 г. в 1,5 и 1,2 раза соответственно (183,4 и 234,5 на 100 000 населения), при этом, удельный вес новообразований, диагностированных на III-IV стадии, из числа впервые выявленных злокачественных новообразований в России в 2019 г составил около 50% (Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова В.В., 2020). Несмотря на то, что заболеваемость КРР увеличивается с возрастом, в последние годы наблюдается тенденция к увеличению частоты выявления раннего КРР, у лиц моложе 50 лет (Siegel R.L. et al., 2019; Akimoto N. et al., 2021).

Пятилетняя общая выживаемость при КРР составляет около 50% (Wang W. et al., 2019), 20% новых случаев КРР являются метастатическими (Chiocean E.G. et al., 2020). У 50% пациентов с ранней стадией заболевания в конечном итоге развиваются метастазы, 80–90% которых из-за размера, локализации и/или степени распространения являются неоперабельными (Atreya S.E. et al., 2017; Hervieu S. et al., 2021).

Прогнозирование течения КРР в основном зависит от TNM стадирования, гистопатологических характеристик и степени дифференцировки опухолевых клеток (Pagès F. et al., 2018; Wang X. et al., 2020). Однако биологическое поведение опухоли не всегда может быть определено с использованием этих критериев, что диктует необходимость проведения исследований, направленных на поиск дополнительных маркеров опухолевой прогрессии.

Так, продемонстрирована роль статуса мутации генов, уровней экспрессии генов и изменений сигнальных путей в малигнизации и прогрессировании опухоли (Nagy Á. et al., 2018). Выявлены молекулярно-биологические подтипы КРР с различным клиническим течением (Guinney J. et al., 2015). Ряд генетических мутаций, таких как, *APC*, активирующие мутации онкогена *K-RAS* и мутации *p53*, представляют собой ключевые события в патогенезе КРР (Watson A.J., 2011).

Во многих случаях метастазирование начинается на ранней стадии опухолевого процесса, а увеличение размеров первичной опухоли не связано с метастазированием (Harper K.L. et al., 2016; Hosseini H. et al., 2016). Ключевой предпосылкой для образования метастазов является диссеминация циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в кровотоке. Метастазирование

происходит в результате эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), когда опухолевая клетка приобретает мезенхимальный фенотип, покидает первичный очаг, мигрирует, проникает в циркуляцию, затем, другие ткани, давая рост вторичным опухолям. (Bork U. et al., 2014; Haber D.A. et al., 2014). Показана клиническая ценность подсчета ЦОК (Agelaki S. et al., 2015; Bork U. et al., 2015; Maas M. et al., 2017; Tan Y. et al., 2018; Кит О.И., Колесников В.Е. и др.; 2018; Кит О., Шуликов П., Новикова И. и др., 2017; Златник Е.Ю., Бахтин А.В., Новикова И.А. и др., 2017; Кит О.И., Новикова И.А. и др., 2017). Количество остаточных ЦОК после первичного лечения может не только определять для каждого отдельного пациента риск развития рецидива или прогрессирования заболевания, но и отсутствие ЦОК будет указывать на фактическую ликвидацию заболевания, а в случае их персистенции, молекулярное профилирование этих клеток может служить мишенью для таргетных препаратов (Bork U. et al., 2014).

Опухолевые клетки на разных стадиях метастатического процесса сосуществуют и взаимодействуют с различными компонентами микроокружения, включая фибробласты, иммуно-воспалительные и эндотелиальные клетки (Acharyya S., Massague J., 2016; Wang M. et al., 2017; Zhuang X. et al., 2019). Устойчивость к химио- или лучевой терапии, а также рецидивирование процесса являются основными проблемами, препятствующими благоприятному прогнозу течения заболевания, что связано с небольшой популяцией клеток с высокой степенью онкогенности – опухолевыми стволовыми клетками (ОСК) (Nurgali K. et al., 2018; Титов К.С. и др., 2020). Было показано, что ОСК вызывают иницирование роста опухоли, развитие рецидива и метастазов, хотя связь между экспрессией маркеров и прогнозом заболевания до конца не изучена, тем более, что ОСК проявляют гетерогенность свойств в зависимости от экспрессии целого ряда маркеров (Batlle E. et al., 2017; Hervieu C. et al., 2021). Кроме того, ОСК составляют резервуар резистентных к воздействию клеток, а также, могут способствовать ангиогенезу в опухоли, секретировав ангиогенные факторы, такие как фактор роста эндотелия сосудов VEGF и CXCL12 (Najafi M. et al., 2019). Гиперэкспрессия ключевых факторов ЭМП приводит к приобретению опухолевыми клетками свойств ОСК. Подтверждением гипотезы о тесной связи ОСК и метастазирования является обнаружение ЦОК с фенотипом ОСК при КРР (Grillet F. et al., 2017).

В последнее время появились многочисленные свидетельства того, что иммунное микроокружение опухоли оказывает значительное влияние на прогноз течения заболевания и терапевтическую эффективность (Binnewies M. et al., 2018; Zhao Y. et al., 2018; Wang X., 2020; Титов К.С. и др., 2019). При КРР, как и при других опухолях, реализуется концепция «иммуноредактирования» (O'Donnell J.S. et al., 2019) и показано, что ряд факторов адаптивного иммунитета разнонаправленно коррелирует с прогрессированием опухоли и выживанием больных, а инфильтрация различными иммунными клетками может создавать среду для пролиферации и метастазирования опухолевых клеток (Zhao Y., Dong Q., Li J. et al., 2018; Wang X. et al., 2020; Никипелова Е.А. и др., 2017; Златник Е.Ю. и др., 2018). Опухолевое микроокружение является ключевым фактором роста и развития опухоли, а также важным регулятором фенотипа ОСК. В последние годы изучение взаимодействия системного и локального

микроокружения с опухолевыми клетками является центром многих исследований (Ye J. et al., 2014; Чердынцева Н.В. и соавт., 2017; Златник Е.Ю. и др., 2017; Златник Е.Ю. и др., 2020; Ситковская А.О. и др., 2020).

Получение молекулярной информации об опухолях из периферической крови стало возможным с использованием методов жидкостной биопсии на основе ЦОК и циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК), внеклеточной РНК, белков и липидов, экстрагированных из сыворотки, плазмы или цельной крови, а также экзосомальной ДНК и микроРНК (Cai X. et al., 2015; Siravegna G. et al., 2017; Germano G. et al., 2018; Yamada T. et al., 2019; Gao W. et al., 2021). Данные жидкостной биопсии могут быть использованы для раннего выявления рака, оценки риска метастатического прогрессирования или рецидивирования, оценки чувствительности к противоопухолевым агентам, мониторингу ответа на лечение и определению минимальной остаточной болезни (Cohen J.D. et al., 2018; Yamada T. et al., 2019). МикроРНК опухолевых клеток модулируют микроокружение опухоли, изменяя молекулярный профиль соседних клеток (Suzuki H.I. et al., 2015). Изменение экспрессии паттернов микроРНК в ОСК и стромальных клетках может способствовать процессам ангиогенеза, лимфоцитарной инфильтрации опухоли и опухолево-стромальным взаимодействиям (Campomenosi P. et al., 2016).

Гетерогенный ответ на терапевтические методы лечения КРР в значительной степени обусловлен различными генотипическими и фенотипическими характеристиками опухолевых клеток (Wang W. et al., 2019). Клональные, стромальные и иммунные характеристики КРР все чаще признаются важными для оценки терапевтического воздействия и прогнозирования течения заболевания, а применение данных, полученных в результате молекулярных исследований является актуальной задачей для клинической практики при персонализированном подходе к терапии (Athauda A. et al., 2019). Более точное понимание биологических свойств опухоли КРР, особенно с учетом клинических особенностей, является ключевым требованием к надежному, целенаправленному лечению и реализации персонализированного подхода к терапии. (Wang W., 2019). Следовательно, идентификация на опухолевых клетках эффективных терапевтических мишеней и прогностических/предиктивных маркеров является необходимой для оптимального подхода к лечению и наблюдению за пациентом. Исследования, касающиеся взаимоотношений между иммунной системой и опухолевыми клетками, являются новым рубежом исследований, которые в перспективе могут оказать значительное влияние на клиническую практику, особенно с учетом уже известной эффективности и перспективности дальнейшего применения ингибиторов иммунных контрольных точек. Данные, полученные в результате молекулярных исследований предоставляют исследователям огромное количество новой информации, являясь инструментом, способствующим революционному прогрессу в онкологии.

Степень разработанности темы

В последние десятилетия в целом ряде исследований были изучены различные аспекты биологических характеристик КРР. В докторской диссертации Раскина Г.А. «Морфологическая оценка прогностических и предиктивных факторов при аденокарциноме толстой кишки» (2014) проведено клинимоρφологическое исследование больных аденокарциномой толстой кишки,

исследована экспрессия и оценена прогностическая значимость экспрессии рецептора к хемокину CXCR4, маркера стволовых клеток альдегиддегидрогеназы 1 (ALDH1), Ki-67 и их сочетания в качестве показателей распространенности аденокарциномы толстой кишки и выживаемости больных. Оценена пролиферативная активность стволовых раковых клеток и определены соотношения стволовых опухолевых клеток на разных стадиях пролиферации (ALDH1+Ki-67-; ALDH1+Ki-67+). Показано, что изменение количества стволовых клеток различного фенотипа не является прогностически значимым при прогрессировании рака толстой кишки.

В докторской диссертации Никипеловой Е.А. «Локальные иммунологические и молекулярные аспекты колоканцерогенеза» (2016) проведена комплексная оценка иммунологического микроокружения при опухолях, доброкачественных и воспалительных заболеваниях толстой кишки, установлена значимость факторов пролиферации, апоптоза, межклеточной адгезии в развитии патологических процессов. На основе анализа иммунологических критериев разработан способ прогнозирования метастазирования местно-распространенного рака толстой кишки.

В 2016г. была защищена докторская диссертация Станоевич У. «Клиническое значение результатов молекулярно-генетических исследований толстой кишки при колоректальном раке» в которой проанализированы экспрессия генов, ответственных за пролиферацию, апоптоз, ангиогенез, адгезию, ремоделирование межклеточного матрикса, регуляцию врожденного и адаптивного иммунитета в образцах ткани опухоли и метастазов, слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных КРР и контрольных образцах и их взаимосвязь с клиническими характеристиками пациентов и морфологическими параметрами опухоли. Показана необходимость оценки экспрессии некоторых генов в первичной опухоли и слизистой оболочке без гистологических признаков злокачественного роста для формирования групп риска прогрессирования КРР.

В докторской диссертации Колесникова В.Е. «Лапароскопическая хирургия в лечении больных метастатическим колоректальным раком» (2019) одной из задач являлась оценка содержания ЦОК у больных метастатическим КРР в зависимости от применяемого оперативного доступа. Показано уменьшение количества ЦОК при проведении лапароскопических вмешательств и снижение уровня опухолевых клеток за счет малотравматичного доступа, что препятствовало выходу ЦОК в кровотоки и отразилось на достоверном увеличении выживаемости этих больных.

Несмотря на изученные в приведенных работах аспекты лимфоцитарного микроокружения опухоли, фенотипических характеристик опухолевых стволовых клеток, молекулярно-генетических особенностей опухоли, количественных характеристик ЦОК, а также прогностического значения этих параметров, остается ряд невыясненных и спорных вопросов, касающихся комплексной оценки факторов системного и локального иммунитета при различном качественном и количественном содержании опухолевых стволовых (ОСК) и циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК), изучения молекулярно-генетических характеристик опухоли, включая микроРНК, содержащиеся в опухоли и в ЦОК, а также их гены-

мишени, регуляция экспрессии которых реализуется в стимуляции или супрессии онкогенного потенциала опухолевых клеток, для разработки новых подходов к стратификации больных и оценке их влияния на прогноз течения КРР. Комплексным подходом к изучению данных аспектов продиктована необходимость продолжения фундаментальных исследований, что и определило выбор направления работы, а разработка клинически применимых прогностических алгоритмов риска неблагоприятного течения заболевания является ее прикладной частью.

Цель

Разработка подхода к прогнозированию течения рака ободочной кишки на основе комплексного анализа клеточных и молекулярных характеристик опухолевых клеток и их микроокружения.

Задачи

1. Оценить частоту встречаемости ЦОК у больных раком ободочной кишки в зависимости от различных клиничко-морфологических факторов (стадия заболевания, пол, возраст больных, локализация опухоли, критерии системы TNM, степень дифференцировки, степень злокачественности, гистологическая структура, лимфоваскулярная и периневральная инвазия, лимфоцитарная инфильтрация, наличие мутации *KRAS*).

2. Провести анализ показателей врожденного (CD16+56+, NK Т-лимфоциты, CD335+, CD16dim56bright, CD16+56dim, Granzyme B, Perforin, фагоцитарное звено) и адаптивного системного иммунитета (Т-хелперно-индукторного, Т-цитотоксического звеньев, Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов), сывороточных цитокинов у больных раком ободочной кишки при различном уровне ЦОК.

3. Изучить экспрессию маркеров ОСК (CD44, CD133, ALDH1) и ЭМП (ZEB1) в ткани опухоли в зависимости от различных клиничко-морфологических факторов (стадия заболевания, степень дифференцировки, степень злокачественности, гистологическая структура, лимфоваскулярная и периневральная инвазия, лимфоцитарная инфильтрация, локализация опухоли, критерии системы TNM).

4. Изучить показатели локального иммунитета (Т-, NK- лимфоциты, Т-клетки памяти, наивные Т-лимфоциты, экспрессия CD274, CD279) в ткани опухоли ободочной кишки при различных уровнях экспрессии маркеров ОСК.

5. Изучить профиль транскрипционной активности микроРНК в опухолевой ткани больных раком ободочной кишки и провести биоинформационный анализ участия микроРНК в регуляции ЭМП и стволовомклеточного опухолевого потенциала.

6. Изучить профиль транскрипционной активности микроРНК в ЦОК больных раком ободочной кишки.

7. Изучить уровень экспрессии генов-мишеней в опухолевой ткани больных раком ободочной кишки.

8. Определить значимость изученных клеточных и молекулярных характеристик опухоли и ее микроокружения для оценки общей выживаемости и риска метастазирования у больных раком ободочной кишки.

9. Разработать математические модели неблагоприятного исхода заболевания с учетом клеточных и молекулярных характеристик опухоли и ее микроокружения у больных раком ободочной кишки.

Научная новизна исследования

Впервые было проведено комплексное многоуровневое исследование биологической роли и клинической значимости ЦОК и ОСК, опухолевой ткани при раке ободочной кишки, суммирующее их молекулярно-генетические характеристики, включающие микроРНК, их гены-мишени и сигнальные пути, взаимовлияние ЦОК и ОСК на факторы системного и локального иммунитета и эпителиально-мезенхимального перехода, их оценка в связи с клинико-морфологическими особенностями и течением заболевания.

Дана комплексная оценка экспрессии микроРНК и их генов-мишеней у больных II-IV стадиями раком ободочной кишки и охарактеризована их прогностическая значимость для клинического исхода заболевания: с развитием летального исхода связано 14 генов – повышение экспрессии 11 протоонкогенов (*MMP2, CD44, SPP1, FN1, COL1A2, SPARC, CTNNB1, NANOG, MYC, OCT4, NFkB*) и снижение транскрипционной активности трех онкосупрессоров (*GSK3B, SUFU* и *APC*).

Изучен профиль экспрессии микроРНК в ЦОК и выявлены его различия для hsa-miR-26a-5p по сравнению с клетками опухоли; показано, что оценка уровня экспрессии hsa-miR-26a-5p в опухоли и в ЦОК позволяет дифференцировать опухоли с наличием и отсутствием метастазов.

У больных раком ободочной кишки при наличии ЦОК вне зависимости от стадии впервые установлены изменения, свидетельствующие об угнетении противоопухолевых свойств врожденного и адаптивного иммунитета, в НК-клеточном, моноцитарно-макрофагальном и Т-лимфоцитарном звеньях, а также цитокиновый дисбаланс.

Показано различное влияние опухолевых клеток с экспрессией разных рецепторов ОСК на иммунологическое микроокружение опухоли при раке ободочной кишки и установлена наибольшая значимость ОСК, коэкспрессирующих CD44+CD133+ рецепторы, для развития локальной иммуносупрессии в виде повышения уровня Tregs и PD-1+ лимфоцитов, снижения уровня CD4+ и НК-клеток, а также опухолевых клеток, экспрессирующих HLA-ABC; в развитие таких изменений больший вклад вносит экспрессия CD44, чем CD133.

Выявлено, что из 12 изученных клинико-морфологических характеристик опухоли наиболее часто статистически значимая связь наблюдалась с экспрессией в опухоли CD44 (по 10 параметрам).

Показана статистически значимая связь экспрессии в опухолевой ткани маркеров ОСК и ЭМП и количеством ЦОК в периферической крови.

На основании проведенного анализа ЦОК, ОСК и маркеров ЭМП в опухоли, наличия мутации гена *KRAS*, а также ряда микроРНК и факторов системного и локального иммунитета и клиническим течением заболевания впервые разработаны прогностические алгоритмы и способы прогнозирования риска летального исхода и метастазирования рака ободочной кишки (патенты RU 2613142 и RU 2772207), а также, срока развития отдаленного метастазирования

(решение о выдаче патента на изобретение по заявке № 2022108351/14 от 30.03.2022 г.).

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование вносит вклад в разработку концепции метастазирования при раке ободочной кишки и анализирует изменения, происходящие на молекулярно-генетическом, клеточном, тканевом, системном уровне и на уровне организма больных при нарастании распространенности процесса.

Проведено комплексное многоуровневое исследование биологической роли и клинической значимости ЦОК и ОСК, их иммунологического микроокружения при II-IV стадиях рака ободочной кишки.

Исследования, выполненные на молекулярно-генетическом уровне, позволили установить связь выживаемости больных с экспрессией 14 генов – с гиперэкспрессией генов *MMP2*, *CD44*, *SPP1*, *FNI*, *COL1A2*, *SPARC*, *CTNNB1*, *NANOG*, *MYC*, *OCT4*, *NFKB1* и снижением экспрессии – *GSK3B*, *SUFU* и *APC*. Показано также, что уровень экспрессии *hsa-miR-26a-5p* в ЦОК позволяет дифференцировать опухоли с наличием и отсутствием метастазов.

Исследования на клеточном и тканевом уровне позволили установить, что вне зависимости от стадии опухоли в присутствии в ее ткани различных субпопуляций клеток с фенотипом ОСК происходят неодинаковые изменения факторов локального иммунитета с максимально выраженной иммуносупрессией при наличии ОСК, коэкспрессирующих *CD44+CD133+* (снижение уровня *CD4+*, *NK*-клеток, *HLA-ABC+* опухолевых клеток, повышение уровня *Tregs* и *PD-1+* лимфоцитов); показана более высокая значимость для развития локальной иммуносупрессии *CD44+ОСК* по сравнению с *CD133+*. Установлена более выраженная связь клинико-морфологических характеристик агрессивности опухоли с фенотипом *ОСК CD44+*, чем с другими фенотипами.

Исследования, проведенные на системном уровне, позволили выявить, что при наличии ЦОК у больных раком ободочной кишки вне зависимости от стадии опухоли происходят изменения, характеризующие угнетение противоопухолевых свойств, в *NK*-клеточном и фагоцитарном звеньях врожденного иммунитета и *T*-лимфоцитарном звене адаптивного иммунитета, а также цитокиновый дисбаланс, что способствует отрицательному иммуноредактированию опухоли.

Разработан способ прогнозирования метастазирования при раке ободочной кишки III стадии, заключающийся в том, при наличии мутации гена *KRAS* и содержании ЦОК более 5 прогнозируют метастазирование в 100% случаев в течение 18-24 месяцев (патент RU 2613142).

Разработан способ прогнозирования риска неблагоприятного исхода рака ободочной кишки и ректосигмоидного отдела, включающий исследование уровня ЦОК в периферической крови до оперативного вмешательства и отличающийся тем, что в ткани опухоли определяют процент опухолевых клеток, экспрессирующих *CD44*, с помощью логистической регрессионной модели рассчитывают коэффициент прогноза летального исхода (*K*), при значениях которого выше 0,411 прогнозируют высокий риск летального исхода (патент RU 2772207).

На основании полученных результатов разработан ряд прогностических алгоритмов, объединенных в 4 математические модели, позволяющих оценить

риск летального исхода и метастазирования у больных раком ободочной кишки после операции, выполненной первым этапом лечения.

Стратификация больных по содержанию ЦОК и ОСК с учетом состояния их системного и локального иммунитета может быть использована в дальнейшем для уточнения показаний к проведению иммунотерапии ИКТ.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена на значительном клиническом материале, включающем проспективные данные о результатах исследования 351 больного раком ободочной кишки II-IV стадий, находившихся на лечении в ФГБУ НМИЦ онкологии Минздрава России с 2012 по 2016 гг. и ретроспективные данные длительного периода наблюдения за ними.

Работа содержит в себе результаты, выполненные с использованием иммунологических, иммуногистохимических, молекулярно-генетических исследований опухоли и изолированных ЦОК (проточная цитометрия, иммуноферментный анализ, детекция и сепарация ЦОК с использованием системы Veridex CellSearch, иммуногистохимический метод, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, биоинформационный анализ данных с использованием баз данных miRBase/mirGeneDB, miRecords, miRTarBase, TarBase, BioCarta и Gene Ontology).

Изучены экспрессия микро-РНК и их генов мишеней в опухолевой ткани толстой кишки, уровни циркулирующих опухолевых клеток крови и профиль транскрипционной активности микроРНК в ЦОК, экспрессия маркеров опухолевых стволовых клеток и эпителиально-мезенхимального перехода, параметры системного и локального иммунитета при различном уровне ЦОК и ОСК, проведен биоинформационный анализ участия микроРНК в регуляции ЭМП и стволовыхклеточного опухолевого потенциала.

В работе применены современные методы статистического анализа, что позволяет считать полученные данные убедительными и достоверными.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия маркеров ОСК и ЭМП в опухоли, количество ЦОК в периферической крови сопряжены с клинико-морфологическими факторами прогноза: стадией заболевания, глубиной инвазии опухоли, наличием отдаленных метастазов, степенью выраженности лимфоцитарной инфильтрации опухоли; а наличие ЦОК в кровотоке - кроме того, со статусом лимфоузлов, степенью дифференцировки, степенью злокачественности, лимфоваскулярной инвазией, наличием мутации в гене *KRAS*.

2. Опухолевые стволовые клетки ответственны за формирование иммуносупрессивного и ростостимулирующего иммунологического микроокружения при прогрессировании рака ободочной кишки, демонстрируя ряд различий в зависимости от своих количественных и качественных характеристик.

3. Циркуляция опухолевых клеток сопровождается системными иммунологическими изменениями, характеризующими супрессию врожденного и адаптивного иммунитета и способствующими дальнейшему прогрессированию рака ободочной кишки.

4. МикроРНК опухоли ассоциированы с 25 генами-мишенями, являющимися ключевыми участниками сигнальных путей эпителиально-

мезенхимального перехода и стволовых клеток опухоли. Тканевые и циркулирующие опухолевые клетки имеют различия по экспрессии hsa-miR-26a-5p.

5. Оценка клеточных (ЦОК, ОСК, иммунологическое микроокружение) и молекулярных характеристик опухоли (профиль экспрессии микроРНК опухоли и ЦОК, экспрессия генов-мишеней опухоли) может быть использована для стратификации пациентов на группы с благоприятным и неблагоприятным прогнозом.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обеспечена значительным числом больных, включенных в исследование и длительным периодом наблюдения за ними. В исследование включены данные о 351 больном раком ободочной кишки. В работе использованы перспективные и актуальные методы клинико-лабораторных и научных исследований, современные методы биоинформационного и статистического анализа данных.

Апробация результатов работы состоялась 26 июля 2022 г. на заседании ученого совета ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

Основные результаты исследования представлены на научных конференциях и съездах: Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO Annual Meeting) (May 30 – June 03, 2014; May 29-June 2, 2015; June 2-6, 2017; June 1-5, 2018; May 29-31, 2020; June 3-7, 2021), XIX Российском онкологическом конгрессе (17-19 ноября 2015 г., г. Москва), Петербургском онкологическом форуме «Белые ночи-2015» (8–10 июня 2015 г., г. Санкт-Петербург), Втором Онкологическом форуме Юга России, посвященном 85-летию РНИОИ (31.10-01.11.2016 г., г. Ростов-на-Дону), IX Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (15-17 июня 2016 г., г. Минск), XXII Объединенной Российской Гастроэнтерологической Неделе (3-5 октября 2016 г., г. Москва), II Петербургском Онкологическом форуме «Белые ночи» (22–24 июня 2016 г., г. Санкт-Петербург), XX Российском онкологическом конгрессе (15-17 ноября 2016 г., г. Москва), III Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи» (23-25 июня 2017 г., г. Санкт-Петербург), XXI Российском онкологическом конгрессе (14-16 ноября 2017 г., г. Москва), Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярно-генетические маркеры в диагностике и лечении онкологических заболеваний» (23 ноября 2018 г., г. Ростов-на-Дону), Всероссийской школе с международным участием для врачей-патологоанатомов (27-29 сентября 2018, г. Ростов-на-Дону), IV Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2018» (5-8 июля 2018, г. Санкт-Петербург), X Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии памяти акад. Н.Н. Трапезникова (23-25 апреля 2018, г. Сочи), European Society For Medical Oncology (ESMO) (27 сентября – 1 октября 2019, г. Барселона, Испания), V Петербургском Международном онкологическом форуме «Белые ночи- 2019» (20-23 июня 2019, г. Санкт-Петербург), XI Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (23-25 апреля 2020, г. Казань), Третьем международном форуме онкологии и радиологии (21-25 сентября 2020, г. Москва), VIII Петербургском Международном онкологическом форуме «Белые ночи- 2022» (27 июня-3 июля 2022, г. Санкт-Петербург).

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования внедрены в клиническую и научную практику отделения абдоминальной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (акт внедрения от 12.04.2017г.) и лаборатории иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (акт внедрения от 26.05.2022г.). Фундаментальные теоретические положения внедрены в учебный процесс преподавания на кафедре онкологии ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, образовательные программы обучения ординаторов и аспирантов на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

Личное участие автора в получении результатов

Автором выбрано направление исследования, сформулирована цель и определены задачи исследования, разработан дизайн исследования. Проанализирована отечественная и зарубежная литература по теме диссертационного исследования. Автором самостоятельно выполнены исследования по определению ЦОК в периферической крови больных раком ободочной кишки с использованием системы CellSearch, показателей системного и локального иммунитета методом проточной цитометрии, сывороточных цитокинов методом ИФА, а также, самостоятельно проанализированы полученные результаты. Автор принимал непосредственное участие в выполнении иммуногистохимического исследования, результаты которого оценивались им лично. В сотрудничестве с сотрудниками лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» автором изучен профиль транскрипционной активности микроРНК в опухолевой ткани и в ЦОК больных раком ободочной кишки, а также профиль экспрессии генов-мишеней в опухолевой ткани, проведен биоинформационный анализ данных. Автором самостоятельно проведен статистический анализ данных, сформулированы результаты и выводы, оформлена рукопись настоящей работы.

Соответствие содержания исследования научным специальностям

Основные результаты работы, научные положения и выводы, описанные в диссертационной работе, соответствуют паспорту специальности «3.1.6. - Онкология, лучевая терапия» («медицинские науки»).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 48 печатные работ, из них 12 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора медицинских наук, из которых 5 – в изданиях международной реферативной базы данных и системы цитирования, получено 2 патента на изобретение Российской Федерации.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 346 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 615 источников, в том числе 47 отечественных и 568 зарубежных. Работа иллюстрирована 61 рисунком и 97 таблицами, 5 клиническими примерами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование включены данные о 351 больном раком ободочной кишки II стадии заболевания (T3-4N0M0) с наличием неблагоприятных факторов прогноза (низкая степень дифференцировки, лимфоваскулярная/периневральная инвазия), III стадии (T1-4N1-2M0), IV стадии (T1-4N0-2M1a), находившихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России с 2012 по 2016 гг. Средний возраст больных соответствовал $64,2 \pm 3,7$ г. (разброс от 42 до 86 лет). При всех стадиях заболевания преобладали больные в возрастной группе старше 61 года, при II стадии их доля составляла 62,8%, при III – 62,5%, при IV стадии – 64,7%.

Диагноз был установлен на основании жалоб, анамнеза, физикального обследования, морфологического исследования опухолевого материала, данных инструментальных и лабораторных методов обследования. Все больные II-III стадий после проведения оперативного вмешательства получали адъювантную химиотерапию по схеме FOLFOX. Больным IV стадии с резектабельными метастазами в печень, одновременно с удалением первичной опухоли выполнялась операция на печени в объеме резекции R0 с последующими курсами ХТ по схеме FOLFOX.

Материалом исследования являлись: периферическая кровь больных, парафиновые блоки опухолевой ткани, свежемороженая опухолевая и нормальная ткани толстой кишки, изолированные циркулирующие опухолевые клетки. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (протокол №11/1 от 28.01.2014 г.) (рисунок 1).



Рисунок 1. Дизайн исследования

Использовались следующие критерии включения больных в исследование: возраст ≥ 18 лет, наличие письменного информированного согласия на передачу биологического материала для научных исследований, наличие гистологически верифицированного рака ободочной кишки, II-IV стадии заболевания (в случае наличия резектабельных метастазов в печень), отсутствие предоперационной противоопухолевой терапии.

Критериями исключения являлись: отсутствие информированного согласия на передачу биологического материала для научных исследований, рак прямой кишки, I стадия заболевания, наличие мультиорганных или нерезектабельных отдаленных метастазов в печень, предоперационное противоопухолевое лечение. Общая характеристика больных, включённых в исследование, представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика больных, включённых в исследование

Характеристика	II стадия		III стадия		IV стадия	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Всего больных	100	31,3	88	25,1	153	43,6
Пол:						
Женский	54	49,1	46	52,3	68	43,6
Мужской	56	50,9	42	47,4	85	55,6
Локализация первичной опухоли						
Слепая кишка	7	6,4	5	5,7	11	7,2
Восходящая ободочная кишка	23	20,8	11	12,5	21	13,7
Печеночный изгиб ободочной кишки	18	16,4	6	6,8	10	6,5
Поперечная ободочная кишка	17	15,4	13	14,8	12	7,8
Селезеночный изгиб ободочной кишки	6	5,5	9	10,2	18	11,8
Нисходящая ободочная кишка	11	10,0	7	8,0	16	10,5
Сигмовидная кишка	28	25,5	37	42,0	65	42,5
Степень дифференцировки опухоли						
G1	15	13,7	13	14,8	26	17,0
G2	71	64,5	64	72,7	59	38,6
G3	24	21,8	11	12,5	68	44,4
Степень злокачественности опухоли						
Низкая степень	86	78,2	77	87,5	85	55,6
Высокая степень	24	21,8	11	12,5	68	44,4
Гистологическая структура опухоли						
Аденокарцинома кишечного типа	95	86,4	66	75,0	123	80,4
Перстневидно-клеточный рак	4	3,6	6	6,8	4	2,6
Музинозная аденокарцинома	11	10,0	16	18,2	26	17,0

Мутации в гене *KRAS* выявлены у 163 (46,4%) из 351 исследованных больных, наиболее часто - мутация G12D (21,6%) и G13D (15,9%). Микросателлитная нестабильность была диагностирована в 11,7% случаев.

Методика иммунологического исследования опухоли и периферической крови методом проточной цитометрии и ИФА. Иммунологическое исследование в ткани опухоли проводили на операционном материале, изучали показатели локального иммунитета (CD3, CD4, CD8, T-reg, NK-T, CD56, CD335, CD19, T-клетки памяти и наивные T-лимфоциты, CD274, CD279), экспрессию опухолевыми клетками CD44, CD133, HLA-ABC, HLA-E, CD274. В периферической крови оценивали показатели системного иммунитета: врожденного (NK-клеточное, фагоцитарное звенья), адаптивного (T-хелперно-индукторное, T-цитотоксическое звенья, T-клетки памяти и наивные T-лимфоциты, B-клеточное звено), сывороточные цитокины (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- α , IFN- γ). Анализ антигенной экспрессии проводили на проточном цитометре FACSCantoII (Becton Dickinson, USA). Иммуноферментный анализ

выполняли с использованием планшетного анализатора АИФР-01 (УНИПЛАН, Россия).

Метод детекции и сепарации циркулирующих опухолевых клеток. Детекцию ЦОК проводили с помощью системы Veridex CellSearch™, (JanssenDiagnostics, LLC). Качество работы системы оценивали с использованием стандартного контроля CTC control kit. Материал сканировали в анализаторе CellTracks® Analyzer II®. Оценивали экспрессию опухолевыми клетками EpCAM, цитокератинов 8/18/19, CD45. У пациентов с выявленными ЦОК в количестве более 3 клеток был отобран дополнительный образец крови для сепарации ЦОК и последующего молекулярного профилирования с использованием набора CellSearch® Profile Kit (Menarini Silicon Biosystems) и системы CELLTRACKS® AUTOPREP®.

Метод иммуногистохимического исследования. Материал для исследования фиксировали 10% нейтральным формалином в течение 24 ч. Все этапы иммуногистохимической реакции проводили в иммуногистостейнере Termo Scientific Autostainer 480 фирмы Termo. В качестве системы детекции первичных антител была использована «Ultra Vision LP», а также «REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System». Применяли панель антител: CD133 (клон SP35, Cell Marque), CD44 (клон SP7, Termo scientific), ALDH1 (клон C8/144B, Cell Marque), ZEB1(клон 123C3.D5, Cell Marque). Результаты экспрессии оценивали путем подсчета количества окрашенных клеток в каждом 3-м поле зрения препарата, в инвазивном фронте опухоли, и выражали в процентах как долю окрашенных клеток по отношению ко всем опухолевым клеткам в поле зрения. Оценку результатов иммуногистохимической реакции проводили с применением светового микроскопа «AxioLab.A1» (Германия) при увеличении объектива $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты оценивали между опухолевыми клетками, подсчет вели в 5 полях зрения при увеличении объектива $\times 400$, среднее значение лимфоцитов вычисляли как общее количество лимфоцитов, деленное на 5 (Rozek L.S. et al., 2016; Олейникова Н.А., Мальков П.Г., Данилова Н.В., 2020). Результаты представляли в виде качественной оценки инфильтрации: слабой (<40), умеренной (40-80), выраженной (≥ 80) (Nazemalhosseini-Mojarad E. et al., 2019).

Молекулярно-генетические исследования. Выделение тотальной РНК осуществляли в удаленном материале методом фенол-хлороформной экстракции с последующей оценкой качества с помощью электрофореза в агарозном геле. Методом RT-qPCR определяли величины относительной экспрессии генетических локусов в присутствии специфичных олигонуклеотидов, подбор которых выполняли с использованием алгоритма Valcells I. et al. (2011). Уровень экспрессии микроРНК или мРНК (Rm) рассчитывали по формуле $Rm = E - \Delta\Delta Ct$. Нормализацию результатов проводили по референсным локусам и уровню экспрессии соответствующих локусов в сравниваемых образцах. Анализ данных по экспрессии проводился на языке программирования Python (Jones E. et al., 2001). Поиск генов-мишеней для исследуемых микроРНК проводили в программной вычислительной среде R 4.1.2 и пакета «multiMiR» с привлечением данных баз miRecords, miRTarBase и TarBase. Анализ сигнальных путей выполняли с использованием баз BioCarta и Gene Ontology.

Методы статистической обработки результатов. При обработке первичных материалов исследования использовали программы Statistica 12 (Stat Soft, США) и MedCalc 19.3.0 (MedCalc Software bv, США). Оценку распределения величин и отличие от нормального распределения анализировали по критерию Шапиро-Уилка. При наличии нормального распределения показателей для оценки статистической значимости различий использовали критерий Стьюдента-Фишера, при отсутствии нормального распределения – критерий Манна-Уитни. Оценку различия долей качественных признаков между группами определяли по критерию Пирсона χ^2 с непараметрической поправкой Мантеля-Ханзеля (метод кросстабуляции в программе Statistica 12). Критерий Фишера использовали при малочисленности подгруппы по признаку (менее 20). Для прогноза неблагоприятных событий использовали метод логистической регрессии и ROC анализа (одноименный модуль в MedCalc 19.3.0). Анализ бессобытийной выживаемости пациентов проводили с использованием метода множительной оценки Каплана-Майера (для полных и неполных наблюдений). Различия между подгруппами по выживаемости изучены по критерию log-rank теста.

С помощью метода регрессионного анализа Кокса была проведена оценка влияния лабораторных параметров (рассматривали как предикторы) на риск развития неблагоприятного события и выживаемость больных. Силу ассоциации между номинальными переменными и летальным исходом (таблица сопряжения 2x2) анализировали с помощью коэффициента контингенции (ассоциации).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ЦОК у больных раком ободочной кишки и их связь с клинико-морфологическими факторами прогноза

Уровень ЦОК в крови рассматривался нами как один из ведущих факторов, влияющих на вероятность и частоту метастазирования (Tan Y. et al., 2018; Abdalla T.S.A. et al., 2021; Pan R.J. et al., 2021).

ЦОК у больных раком ободочной кишки различных стадий выявлены в 62,9% случаев (у 188 из 299) в количестве от 1 до 402 клеток. Анализ выявленных ЦОК проводился для уровня клеток от 1 до 3 ЦОК и выше 3 ЦОК (таблица 2).

Таблица 2 – Сопряжения ЦОК и клинико-морфологических факторов прогноза (критерий Пирсона χ^2)

Факторы прогноза/ уровень ЦОК (абс./отн.)	0 ЦОК		1-3 ЦОК		Более 3-х ЦОК		р (χ^2)
Стадия заболевания							
II стадия (n=110)	67	60,9	23	20,9	20	18,2	p<0.001 ($\chi^2=44.244$)
III стадия (n=88)	25	28,4	31	35,2	32	36,4	
IV стадия (n=101)	19	18,8	40	39,6	42	41,6	
Пол больных							
Женский (n=144)	52	36,1	47	32,6	45	31,3	p=0.902 ($\chi^2=0.207$)
Мужской (n=155)	59	38,1	47	30,3	49	31,6	
Возраст больных, лет							
42-60 (n=128)	56	43,8	31	24,2	41	32,0	p=0.160 ($\chi^2=6.584$)
61-70 (n=104)	34	32,7	37	35,6	33	31,7	
старше 70 (n=67)	21	31,3	26	38,8	20	29,9	

Факторы прогноза/ уровень ЦОК (абс./отн.)	0 ЦОК		1-3 ЦОК		Более 3-х ЦОК		p (χ^2)
Локализация опухоли							
Правая половина (n=67)	21	31,3	24	35,9	22	32,8	p=0.246 ($\chi^2=5.434$)
Поперечно-ободочная (n=93)	29	31,2	33	35,5	31	33,3	
Левая половина (n=139)	61	43,9	37	26,6	41	29,5	
Уровень инвазии опухоли							
pT1-T2 (n=45)	24	53,3	8	17,8	13	28,9	p<0,001 ($\chi^2=32,793$)
pT3 (n=172)	77	44,8	47	27,3	48	27,9	
pT4 (n=82)	10	12,2	39	47,6	33	40,2	
Статус лимфоузлов							
N0 (n=116)	82	70,7	19	16,4	15	12,9	p<0,001 ($\chi^2=95,834$)
N1 (n=111)	17	15,3	51	46,0	43	38,7	
N2 (n=72)	12	16,7	24	33,3	36	50,0	
Отдаленные метастазы							
M0 (n=198)	108	54,6	87	43,9	3	1,5	p<0,001 ($\chi^2=244,004$)
M1a (n=101)	3	3,0	7	6,9	91	90,1	
Степень дифференцировки опухоли							
G1 (n=46)	40	87,0	6	13,0	-	-	p<0.001 ($\chi^2=65.377$)
G2 (n=165)	53	32,1	59	35,8	53	32,1	
G3 (n=88)	18	20,5	29	33,0	41	46,5	
Степень злокачественности опухоли							
Низкая степень (n=211)	93	44,1	65	30,8	53	25,1	p<0.001 ($\chi^2=18.532$)
Высокая степень (n=88)	18	20,5	29	33,0	41	46,5	
Гистологическая структура опухоли							
Аденокарцинома (n=242)	96	39,7	75	31,0	71	29,3	p=0.394 ($\chi^2=4.091$)
Перстневидно-клеточный рак (n=12)	3	25,0	4	33,3	5	41,7	
Муцинозная аденокарцинома (n=45)	12	26,7	15	33,3	18	40,0	
Лимфоваскулярная инвазия							
Есть (n=269)	84	31,2	91	33,8	94	34,9	p<0.001 ($\chi^2=40.472$)
Нет (n=30)	27	90,0	3	10,0	-	-	
Перинеуральная инвазия							
Есть (n=251)	99	39,4	75	29,9	77	30,7	p=0.153 ($\chi^2=3.758$)
Нет (n=48)	12	25,0	19	39,6	17	35,4	
Лимфоцитарная инфильтрация							
Слабая (n=98)	23	23,5	39	39,8	36	36,7	p=0.019 ($\chi^2=11.890$)
Умеренная (n=144)	63	43,7	39	27,1	42	29,2	
Выраженная (n=57)	25	43,8	16	28,1	16	28,1	

Нами выявлена статистически значимая связь количества ЦОК в периферической крови и стадии заболевания, показано сопряжение ЦОК и уровня прорастания опухоли в стенку кишки и подлежащие ткани, наличия метастатического поражения регионарных лимфоузлов и печени. Умеренная и низкая степени дифференцировки опухоли и высокая степень ее злокачественности, а также наличие лимфоваскулярной инвазии и слабой лимфоцитарной инфильтрации сопряжено с наличием ЦОК в периферической крови и их уровнем выше 3-х клеток. Локализация опухолевого процесса в

различных отделах толстой кишки, пол и возраст больных не продемонстрировали значимых различий в зависимости от уровня ЦОК (таблица 2).

Исследование мутационного статуса опухоли у больных, в периферической крови которых определяли содержание ЦОК, выявило наличие мутаций в гене *KRAS* в 46,5% случаев (139 из 299 исследованных больных), наиболее часто, в 56,8% случаев (79 из 139 больных) в IV стадии. Уровень ЦОК выше 3-х клеток и наличие мутации в гене *KRAS* с максимальной частотой в 43,0% выявлен у больных IV стадии, тогда как минимальный – 17,4% у больных II стадии (таблица 3).

Таблица 3 – Распределение больных раком ободочной кишки II-IV стадий с выявленными мутациями в гене *KRAS* по уровню ЦОК

Стадия заболевания	0 ЦОК		1-3 ЦОК		Более 3-х ЦОК		p (χ^2)
	Абс.	Отн. %	Абс.	Отн. %	Абс.	Отн. %	
II стадия (n=23)	13	56,5	6	26,1	4	17,4	p=0,011 ($\chi^2= 9,488$)
III стадия (n=37)	11	29,7	14	37,8	12	32,4	
IV стадия (n=79)	15	19,0	30	38,0	34	43,0	

Факторы врожденного иммунитета у больных раком ободочной кишки с различными стадиями заболевания и уровнем ЦОК

Важную роль в реализации метастатического потенциала опухоли играют факторы, влияющие на возможность циркуляции опухолевых клеток, а это прежде всего компоненты врожденной и адаптивной иммунной системы.

При исследовании **НК-клеточного звена** больных с наличием/отсутствием ЦОК выявлено, что наличие ЦОК характеризуется высокими уровнями НКТ-клеток при снижении содержания НК-клеток, а среди последних - снижением CD16+56dim при возрастании CD16dim56bright клеток (таблица 4).

Таблица 4 – Показатели НК-клеточного звена иммунной системы у больных с наличием и отсутствием ЦОК вне зависимости от стадии рака ободочной кишки

Уровень ЦОК	Доля экспрессирующих клеток, %						
	CD16+56+	НК Т-лимфоциты	CD335+	CD16dim56bright	CD16+56dim	Granzyme В	Perforin
	От лимфоцитов		От НК-клеток				
0 ЦОК	22,3±1,8	5,0±1,0	36,5±7,0	5,9±1,0	90,4±0,8	82,2±3,5	80,3±17,1
>0 ЦОК	16,8±1,9↓*	8,8±0,9↑*	46,4±4,5	13,1±3,2↑*	82,5±3,6↓*	78,0±2,3	67,7±6,6
1-3 ЦОК	15,9±2,8	9,2±1,4↑*	52,4±5,7	12,2±3,4	81,1±4,6↓*	76,1±2,4	70,4±6,5
ЦОК>3	17,8±2,3	8,4±1,1↑*	39,0±6,8	14,2±3,9↑*	84,3±6,0	80,9±4,4	64,8±12,2

Примечания: * - различия показателей статистически значимы по отношению к 0 ЦОК ($p \leq 0,05$).

При разделении по стадиям с учетом ЦОК у больных II стадии обнаружено различие в зависимости от наличия или отсутствия ЦОК, а также их уровня, по содержанию CD335+ НК-клеток, которое при наличии ЦОК было выше, чем при их отсутствии, не завися при этом от их уровня (таблица 5).

Таблица 5 – Показатели NK-клеточного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки II стадии при наличии/отсутствии ЦОК

Уровень ЦОК	Доля экспрессирующих клеток, %						
	CD16+56+	NK T-лимфоциты	CD335+	CD16dim 56bright	CD16+ 56dim	Granzyme B	Perforin
	От лимфоцитов			От NK-клеток			
0 ЦОК	13,9±2,9	10,6±2,3	18,4±4,7	6,4±2,2	89,6±2,4	84,2±3,8	72,8±7,4
>0 ЦОК	9,7±2,5	11,0±1,6	47,8±8,8↑*	16,5±5,3	81,4±5,5	76,0±4,2	65,5±10,6
1-3 ЦОК	8,2±3,7	11,8±2,1	48,0±9,8↑*	18,4±9,3	79,1±9,6	73,4±6,3	67,4±2,6
ЦОК>3	11,8±3,8	10,1±2,8	47,6±12,7↑*	14,2±4,5	84,2±4,8	79,7±5,2	64,3±12,2

Примечания: * - различия показателей статистически значимы по отношению к 0 ЦОК ($p \leq 0,05$).

При III стадии заболевания выявлены статистически значимые различия по уровню NK-клеток, экспрессирующих Perforin, при уровне ЦОК>3, а также тенденция к снижению CD335+ NK-клеток в сравнении с отсутствием ЦОК (таблица 6).

Таблица 6 – Показатели NK-клеточного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки III стадии при наличии/отсутствии ЦОК

Уровень ЦОК	Доля экспрессирующих клеток, %						
	CD16+56+	NK T-лимфоциты	CD335+	CD16dim 56bright	CD16+ 56dim	Granzyme B	Perforin
	От лимфоцитов			От NK-клеток			
0 ЦОК	16,9±3,7	4,6±2,3	62,3±4,9	7,8±2,6	84,9±3,7	80,3±4,8	70,0±7,9
>0 ЦОК	23,7±6,2	6,4±2,1	49,5±9,8	8,5±0,9	89,7±3,5	76,4±8,4	86,2±8,8
1-3 ЦОК	27,9±10,7	5,2±2,1	56,1±8,8	8,7±1,3	88,6±0,6	82,6±1,1	82,7±10,4
ЦОК>3	18,1±3,7	7,9±4,7	42,9±9,8	7,4±2,5	92,7±3,8	67,2±8,9	96,8±10,4↑*

Примечания: * - различия показателей статистически значимы по отношению к 0 ЦОК ($p \leq 0,05$).

Максимальное количество отличий наблюдается у больных IV стадии: при наличии ЦОК выявлено снижение доли CD335+ и Perforin+ NK-клеток, а также перераспределение субпопуляций натуральных киллеров в сторону снижения CD16+56dim при возрастании CD16dim56bright клеток (таблица 7).

Таблица 7 – Показатели NK-клеточного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки IV стадии при наличии/отсутствии ЦОК

Уровень ЦОК	Доля экспрессирующих клеток, %						
	CD16+56+	NK T-лимфоциты	CD335+	CD16dim 56bright	CD16+ 56dim	Granzyme B	Perforin
	От лимфоцитов			От NK-клеток			
0 ЦОК	18,5±2,6	7,2±1,4	63,0±7,4	2,5±0,5	96,8±1,9	76,9±5,5	86,9±9,9
>0 ЦОК	17,7±2,2	8,7±1,3	45,0±5,5↓*	12,3±5,1↑*	81,2±6,0↓*	79,5±2,8	61,4±7,6↓*
1-3 ЦОК	15,6±3,1	9,3±2,1	53,6±7,4	9,7±3,5↑*	79,4±7,3↓*	75,8±2,8	64,2±10,7
ЦОК>3	20,0±3,2	7,9±1,2	34,8±7,2↓*	15,2±8,5	83,2±6,1↓*	84,9±5,3	58,7±10,1↓*

Примечания: * - различия показателей статистически значимы по отношению к 0 ЦОК ($p \leq 0,05$).

Учитывая иммуносупрессивную роль NKT-клеток (Krijgsman D. et al., 2019), представление о CD16dim56bright клетках как о незрелой фракции натуральных киллеров (Stabile H. et al., 2018) и о CD335+(NKp46) клетках как о

высокоцитотоксических, участвующих в распознавании опухолевых клеток (Koch J. et al., 2013; Nadad U. et al., 2015), наши данные позволяют расценить наличие ЦОК как способствующее подавлению функциональной активности (цитотоксичности) НК-клеток, что может быть одним из механизмов гематогенного метастазирования.

Фагоцитарное звено у больных раком ободочной кишки с различными стадиями заболевания и различным уровнем ЦОК. Вне зависимости от стадии заболевания у больных с наличием ЦОК отмечено повышение кислородного взрыва в моноцитах и гранулоцитах, стимулированных fMLF; а также повышение доли фагоцитирующих моноцитов (таблица 8).

Таблица 8 – Характеристика фагоцитарного звена иммунной системы у больных с наличием и отсутствием ЦОК вне зависимости от стадии рака ободочной кишки

Показатели, %	Уровень ЦОК			
	0 ЦОК	>0 ЦОК	1-3 ЦОК	ЦОК>3
нейтрофилы	76,8±2,7	77,7±2,2	78,8±2,1	76,5±2,3
моноциты	4,8±0,2	5,4±0,5	4,4±0,4	5,0±0,4
% фагоцитирующих гранулоцитов	87,5±4,6	84,7±5,2	90,7±2,3	78,5±6,1
% фагоцитирующих моноцитов	71,1±5,6	83,4±2,9 ↑*	82,2±4,1	77,0±2,8
Кисл. взрыв гранулоцитов (E.coli)	78,1±18,9	89,0±4,7	78,9±9,8	94,4±2,1
Кисл. взрыв гранулоцитов (lowstim)	2,0±1,1	5,1±0,8 ↑*	3,7±1,0	5,8±1,3 ↑*
Кисл. взрыв гранулоцитов (highstim)	75,2±15,0	97,3±0,2	93,7±3,4	96,9±1,2
Кисл. взрыв моноцитов (E.coli)	65,6±11,0	69,5±6,5	59,2±7,6	77,8±4,4 ↑°
Кисл. взрыв моноцитов (lowstim)	3,2±1,5	10,8±3,3 ↑*	6,4±2,9	12,5±5,1
Кисл. Взрыв моноцитов (high stim)	51,9±20,0	67,5±4,8	61,4±7,6	68,9±9,7

Примечания: * - различия показателей статистически значимы по отношению к 0 ЦОК ($p \leq 0,05$); ° - различия показателей статистически значимы по отношению к 1-3 ЦОК ($p \leq 0,05$).

Исследование фагоцитарного звена врожденного иммунитета показало, что при увеличении стадии заболевания от II к IV происходит угнетение гранулоцитарного фагоцитоза и кислородного взрыва в моноцитах, стимулированных E. coli, наряду с усилением активности этих клеток в ответ на fMLF, у которого описано ростостимулирующее действие, опосредованное через формил-пептидные рецепторы (Li L. et al., 2016; Weiß E., Kretschmer D., 2018) (таблица 9).

Таблица 9 – Показатели фагоцитарного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки II-IV стадий при наличии/отсутствии ЦОК

Показатели, %	Уровень ЦОК			
	0 ЦОК	>0 ЦОК	1-3 ЦОК	ЦОК>3
II стадия				
% фагоцитирующих гранулоцитов	90,9±7,5	95,4±1,6	92,4±2,9	97,7±1,9
% фагоцитирующих моноцитов	78,8±12,1	89,4±3,6	85,1±4,3	94,7±2,1 ↑°
Кисл. взрыв гранулоцитов (E.coli)	92,3±1,2	97,5±1,6 ↑*	96,9±1,7 ↑*	96,4±2,0
Кисл. взрыв гранулоцитов (lowstim)	2,3±1,8	3,3±0,9	3,0±1,7	3,2±0,8
Кисл. взрыв моноцитов (E.coli)	74,3±7,9	82,6±2,4	77,0±3,1	85,4±1,0 ↑°
Кисл. взрыв гранулоцитов (highstim)	73,2±26,7	96,9±1,6	99,2±0,6	97,8±1,9
Кисл. взрыв моноцитов (lowstim)	4,5±2,3	5,9±1,8	4,6±0,7	6,4±2,5
Кисл. взрыв моноцитов (high stim)	61,8±28,1	71,7±15,3	79,7±10,2	73,1±2,1

Показатели, %	Уровень ЦОК			
	0 ЦОК	>0 ЦОК	1-3 ЦОК	ЦОК>3
III стадия				
% фагоцитирующих гранулоцитов	88,8±5,6	80,7±7,8	76,8±8,8	87,8±6,0
% фагоцитирующих моноцитов	82,7±7,8	80,7±4,3	76,5±11,9	82,6±6,7
Кисл. взрыв гранулоцитов (E.coli)	60,9±23,8	90,5±8,4	87,1±12,0	92,1±7,4
Кисл. взрыв гранулоцитов (lowstim)	2,3±1,3	3,5±0,1	3,0±0,5	3,7±0,1
Кисл. взрыв гранулоцитов (highstim)	97,9±1,3	99,2±0,4	98,6±1,1	98,8±0,9
Кисл. взрыв моноцитов (E.coli)	49,8±24,4	76,1±10,7	78,2±12,0	75,4±6,4
Кисл. взрыв моноцитов (lowstim)	2,9±1,9	3,7±1,5	3,3±1,6	3,2±2,1
Кисл. Взрыв моноцитов (high stim)	77,2±11,1	79,4±16,6	76,5±13,5	82,8±10,1
IV стадия				
% фагоцитирующих гранулоцитов	88,4±2,7	66,6±9,6 ↓*	69,4±4,9 ↓*	65,6±9,5 ↓*
% фагоцитирующих моноцитов	79,1±5,4	73,3±4,4	74,3±4,9	71,3±3,9
Кисл. взрыв гранулоцитов (E.coli)	81,7±13,0	95,7±2,4	92,8±6,3	96,7±3,4
Кисл. взрыв гранулоцитов (lowstim)	5,0±1,7	7,8±2,0	7,1±1,6	8,0±1,9
Кисл. взрыв гранулоцитов (highstim)	89,9±6,6	96,0±1,9	97,0±1,9	95,4±2,1
Кисл. взрыв моноцитов (E.coli)	56,9±5,3	75,7±7,2 ↑*	67,9±4,6	82,4±6,9 ↑*
Кисл. взрыв моноцитов (lowstim)	9,8±5,6	18,2±8,4	16,9±5,5	18,9±6,1
Кисл. Взрыв моноцитов (high stim)	50,9±5,9	60,0±15,8	57,1±11,2	62,3±10,1

Примечания: * - различия показателей статистически значимы по отношению к 0 ЦОК ($p \leq 0,05$); ° - различия показателей статистически значимы по отношению к 1-3 ЦОК ($p \leq 0,05$).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что наличие ЦОК оказывает негативное влияние на показатели НК-клеточного и фагоцитарного звеньев врожденного клеточного иммунитета больных раком ободочной кишки, что может служить одним из направлений стратегии выживания и диссеминации опухоли.

Характеристика факторов адаптивного иммунитета больных раком ободочной кишки с различными стадиями заболевания и уровнем ЦОК

Наличие/отсутствие и количественное содержание ЦОК характеризуется различиями показателей адаптивного иммунитета. Так, при II стадии учет уровня ЦОК позволил выявить снижение содержания CD4+CD25+ клеток и повышение CD8+CD25+ клеток в образцах, содержащих ЦОК>3. При III стадии уровень ЦОК>0 сопровождается снижением содержания процента Т-хелперов и увеличением - цитотоксических Т-лимфоцитов (таблица 10). Несмотря на количественное повышение последних, потеря ряда важных корреляционных связей с другими клетками иммунной системы (А.О. Ситковская, 2021) предполагает их функциональную неполноценность. Высокий уровень ЦОК при IV стадии характеризуется нарастанием доли CD8+ клеток с маркером ранней активации CD69 (таблица 10), гиперэкспрессия которого способствует IDO-опосредованной опухолевой прогрессии (Литвинова Л.С. и соавт., 2014) и истощению опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов, с чем связана прогрессия опухоли (Mita Y. et al., 2018).

Таблица 10 – Показатели Т-звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки II-IV стадий при наличии/отсутствии ЦОК

Показатели, %	Уровень ЦОК			
	0 ЦОК	>0 ЦОК	1-3 ЦОК	ЦОК>3
II стадия				
CD3+/CD4+	46,1±4,6	37,5±4,1	34,0±4,9	42,7±7,1
T-reg	7,4±1,6	9,5±1,7	10,3±2,6	7,9±0,6
CD3+/CD4+/CD38+	36,6±4,7	34,2±5,0	30,9±7,7	39,2±4,7
CD3+/CD4+/CD25+	17,7±6,0	11,3±2,8	14,3±3,7	5,3±1,1↓*↓°
CD3+/CD4+/CD69+	7,2±2,4	7,1±2,1	6,4±2,1	8,1±4,4
CD3+/CD8+	26,4±5,4	37,2±4,5	42,0±6,6	30,0±4,1
CD3+/CD8+/CD38+	23,4±5,8	26,7±5,4	31,5±8,2	19,6±4,9
CD3+/CD8+/CD25+	3,3±1,1	3,5±0,8	2,5±1,0	5,5±0,9↑°
CD3+/CD8+/CD69+	5,2±0,8	5,0±1,4	3,4±1,1	7,4±2,8
III стадия				
CD3+/CD4+	45,5±3,7	31,8±3,4↓*	34,1±6,0	28,7±2,0↓*
T-reg	6,3±1,4	7,8±0,6	7,8±0,9	7,8±0,8
CD3+/CD4+/CD38+	22,8±5,1	34,6±4,2	40,2±4,2↑*	27,1±6,4
CD3+/CD4+/CD25+	4,7±2,3	15,8±6,4	6,9±1,9	27,5±12,6
CD3+/CD4+/CD69+	13,4±9,1	13,8±8,3	21,5±16,9	6,0±1,5
CD3+/CD8+	17,4±5,1	25,0±4,6	15,6±2,0	37,5±1,6↑*↑°
CD3+/CD8+/CD38+	22,8±1,9	19,7±1,5	19,8±2,4	19,6±2,0
CD3+/CD8+/CD25+	1,8±0,8	5,3±1,0↑*	6,7±1,4↑*	3,4±0,5↓°
CD3+/CD8+/CD69+	12,4±6,1	12,5±7,1	19,1±14,3	5,9±1,7
IV стадия				
CD3+/CD4+	39,9±3,6	34,3±2,5	37,6±3,2	30,5±3,6
T-reg	8,7±1,4	6,8±0,3	6,9±0,4	6,6±0,6
CD3+/CD4+/CD38+	28,7±4,2	30,0±2,7	33,8±4,0	25,5±3,2
CD3+/CD4+/CD25+	18,7±3,4	16,7±2,2	16,4±2,9	17,1±3,7
CD3+/CD4+/CD69+	6,1±1,5	7,2±0,9	8,0±1,2	6,3±1,2
CD3+/CD8+	25,7±2,9	28,1±2,1	27,4±2,4	28,8±3,6
CD3+/CD8+/CD38+	24,2±5,9	27,9±2,8	28,1±4,7	27,7±2,8
CD3+/CD8+/CD25+	4,6±1,4	3,3±0,4	3,2±0,6	3,5±0,7
CD3+/CD8+/CD69+	3,8±1,0	6,8±1,0↑*	6,4±1,0	7,2±1,9

Примечания: * - различия показателей статистически значимы по отношению к 0 ЦОК ($p \leq 0,05$); ° - различия показателей статистически значимы по отношению к 1-3 ЦОК ($p \leq 0,05$).

Повышение уровня CD8+CD25+ клеток, описанных как фракция T-regs (Chakraborty S. et al., 2018), отмечено при II и III стадиях, причем при II их возрастание наступало только при уровне ЦОК>3, а при III при ЦОК 1-3, что может свидетельствовать о стимуляции этих лимфоцитов, тогда как субпопуляция T regs CD4+CD25+ снижается только при II стадии.

Таким образом, наличие ЦОК и в ряде случаев их уровень оказывает негативное влияние на показатели адаптивного Т-клеточного иммунитета, особенно выраженное при III стадии рака ободочной кишки.

Характеристика сывороточных цитокинов у больных раком ободочной кишки различных стадий и уровнем ЦОК

Стратификация больных по уровням ЦОК позволила выявить ряд различий содержания сывороточных цитокинов. Так, при наличии ЦОК определяется снижение уровней TNF- α и IL-10 у больных с II стадией, а у больных IV стадии с наличием ЦОК выявлено повышение уровня хемокина IL-8 (таблица 11), проявляющего активность в аутокринной и паракринной регуляции ЭМП, неоангиогенезе, стимуляции экспрессии ММП (Long X. et al., 2016), а также в привлечении нейтрофилов в опухоль, рост которой они усиливают (Szczerba V.M. et al., 2019).

Таблица 11 – Уровни цитокинов у больных с наличием и отсутствием ЦОК при различных стадиях раком ободочной кишки

Цитокины, пг/мл	II ст.		III ст.		IV ст.	
	ЦОК 0	ЦОК > 0	ЦОК 0	ЦОК > 0	ЦОК 0	ЦОК > 0
IL-1 β	12,6 \pm 4,3	4,5 \pm 0,8	4,2 \pm 0,7	4,4 \pm 0,9	6,1 \pm 2,6	14,4 \pm 8,0
IL-6	12,8 \pm 4,5	10,7 \pm 5,4	64,2 \pm 12,8	61,9 \pm 22,3	70,3 \pm 29,6	32,2 \pm 6,0
IL-8	36,9 \pm 11,8	20,5 \pm 5,7	44,7 \pm 9,2	45,6 \pm 8,7	15,7 \pm 4,3	74,8 \pm 24,1 \uparrow *
IL-10	6,2 \pm 0,9	3,1 \pm 0,6 \downarrow *	12,8 \pm 4,1	9,2 \pm 3,3	13,2 \pm 8,6	11,1 \pm 4,3
TNF- α	2,6 \pm 0,3	0,3 \pm 0,1 \downarrow *	1,0 \pm 0,7	0,9 \pm 0,9	1,0 \pm 0,8	1,3 \pm 0,4
IFN- α	0,9 \pm 0,3	1,2 \pm 0,9	2,0 \pm 0,6	1,9 \pm 0,4	1,6 \pm 0,3	1,2 \pm 0,5
IFN- γ	5,7 \pm 0,5	3,1 \pm 2,3	5,7 \pm 3,6	5,9 \pm 2,7	5,9 \pm 3,6	6,1 \pm 4,7

Примечания: * - различия показателей статистически значимы по отношению к 0 ЦОК ($p \leq 0,05$).

Таким образом, наличие ЦОК способствует формированию неблагоприятного цитокинового состава сыворотки, участвующего в прогрессировании опухоли.

Анализ экспрессии маркеров ОСК и ЭМП

При исследовании локального статуса опухоли нами были изучены опухолевые клетки с маркерами ОСК и ЭМП, по современным представлениям являющиеся родоначальниками ЦОК, которые рассматриваются в литературе как высокотуморогенная и высокоинвазивная субпопуляция ОСК (Yang M.H. et al., 2015). Проведенный анализ экспрессии маркеров ОСК и ЭМП в зависимости от различных клиничко-морфологических факторов прогноза показал наличие статистически значимых различий для всех исследуемых параметров в зависимости от стадии заболевания, степени выраженности лимфоцитарной инфильтрации, уровня инвазии опухоли и наличия отдаленных метастазов и отсутствие различий в зависимости от локализации опухоли (таблица 12).

Таблица 12 – Сопряжение клиничко-морфологических факторов прогноза и экспрессии маркеров ОСК и ЭМП в опухоли (критерий Пирсона χ^2).

Клиничко-морфологические факторы/исследуемый маркер	CD44	CD133	ALDH1	ZEB1
Стадия заболевания	0,027	0,047	0,003	<0,001
Степень дифференцировки опухоли	0,109	0,487	<0,001	0,914
Степень злокачественности опухоли	<0,001	0,236	<0,001	0,766
Гистологическая структура опухоли	0,042	0,005	0,979	0,872
Лимфоваскулярная инвазия	<0,001	0,041	0,772	0,122
Перинеуральная инвазия	0,002	0,003	0,010	0,142

Клинико-морфологические факторы/исследуемый маркер	CD44	CD133	ALDH1	ZEB1
Лифоцитарная инфильтрация	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Локализация опухоли	0,951	0,525	0,349	0,574
Уровень инвазии опухоли	<0,001	<0,001	0,018	<0,001
Статус лимфоузлов	<0,001	0,002	0,788	0,022
Метастатический индекс лимфоузлов	<0,001	0,087	0,987	<0,001
Отдаленные метастазы	<0,001	<0,001	<0,001	0,002

Примечания: показан p-уровень значимости

Из 12 изученных клинико-морфологических характеристик опухоли наиболее часто статистически значимая связь наблюдалась с экспрессией CD44 (по 10 параметрам), что говорит о наибольшем вкладе этих клеток в прогрессирование опухоли (таблица 12).

Анализ показателей локального иммунитета и характеристик опухолевых клеток у больных раком ободочной кишки

Сравнение показателей локального клеточного иммунитета и фенотипических характеристик опухолевых клеток между больными с разной распространенностью процесса (отсутствием и наличием отдаленных метастазов) позволило выявить в последнем случае более высокие локальные уровни НКТ при более низком проценте лимфоцитов, экспрессирующих CD274 и CD279, а также более высокое содержание опухолевых клеток с экспрессией CD44, коэкспрессией CD44 и CD133 наряду с более низкой экспрессией МНС I типа HLA-ABC и HLA-E и CD274 (PD-L1) (таблица 13).

Таблица 13 – Характеристика опухолевых клеток и их локального микроокружения при наличии/отсутствии отдаленных метастазов

Показатели, %	Нет отдаленных метастазов	Есть отдаленные метастазы
Лимфоцитарное микроокружение		
CD3+	69,2±4,1	67,5±3,0
CD3+CD4+	39,6±2,9	37,9±2,0
CD3+CD8+	27,2±2,9	29,8±2,0
T-reg	6,7±0,7	7,3±0,7
НКТ	3,8±0,5	6,0±0,6 ↑*
CD56+	12,9±2,2	9,1±3,0
CD56+CD335+	26,4±2,7	22,0±2,2
CD274+ (PD-L1)	40,6±3,4	30,9±2,1 ↓*
CD279+ (PD-1)	43,1±3,4	31,3±2,8 ↓*
Опухолевые клетки		
CD326+CD44+	8,0±0,8	12,7±2,0 ↑*
CD326+CD133+	17,2±3,0	20,1±3,3
CD326+CD44+CD133+	0,6±0,1	0,9±0,1 ↑*
CD326+HLA-ABC	69,2±3,8	56,8±3,9 ↓*
CD326+HLA-E	27,8±1,9	18,2±0,7 ↓*
CD326+CD274+ (PD-L1)	12,1±1,5	8,0±0,5 ↓*

Примечания: * - различия показателей статистически значимы по отношению к группе без отдаленных метастазов (p≤0,05).

Разделение больных в зависимости от наличия/отсутствия ОСК, коэкспрессирующих CD44 и CD133, позволили нам получить более детальную картину иммунологического микроокружения, чем разделение по распространенности опухоли (таблица 14). Среди исследованных показателей особенно важными представляются характеризующие локальную иммуносупрессию: высокий уровень T-reg и CD279+ лимфоцитов, наряду с низким содержанием НК-клеток, тем более значимую, что в литературе описана чувствительность ОСК к НК-клеточному лизису (Canter R.J. et al., 2016). У этих же больных нами выявлено снижение экспрессии CD274 (PD-L1) на лимфоцитах при ее повышении на опухолевых клетках. Наблюдаемое возрастание экспрессии CD279+ (PD-1) на лимфоцитах может обеспечивать их взаимодействие с опухолевыми клетками, экспрессирующими PD-L1, и усиливать иммуносупрессивные и ростостимулирующие свойства микроокружения опухоли. С другой стороны, те же характеристики делают опухолевые клетки и лимфоциты адекватными мишенями для иммунотерапии ингибиторами иммунных контрольных точек. Усиление экспрессии PD-L1 вносит вклад в избегание действия иммунной системы опухолевыми клетками, в частности, через сигнальную ось ЭМП/ β -catenin/STT3/PD-L1, особенно активную в ОСК. (Hsu J.M. et al., 2018). Повышение экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках в присутствии CD44+CD133+ клеток сопровождается снижением на них экспрессии молекул МНС I, что характеризует угнетение процессов распознавания, а повышение при этом уровня CD8+, возможно, следует рассматривать как компенсаторное (таблица 14).

Таблица 14 – Характеристика опухолевых клеток и их локального микроокружения при наличии/отсутствии коэкспрессии CD44+CD133+ в опухоли

Показатели, %	Отсутствие коэкспрессии	Наличие коэкспрессии
Лимфоцитарное микроокружение		
CD3+	64,7±1,1	72,2±0,7 ↑*
CD3+CD4+	39,7±1,8	34,8±1,2 ↓*
CD3+CD8+	24,3±1,8	36,9±1,1 ↑*
T-reg	5,3±0,5	7,3±0,4 ↑*
NKT	5,5±0,5	5,0±0,6
CD56+	14,8±1,0	8,4±0,9 ↓*
CD56+CD335+	20,9±5,9	24,2±4,1
CD274+	42,9±2,5	34,3±0,3 ↓*
CD279+	22,3±2,9	38,4±1,7 ↑*
Опухолевые клетки		
CD326+HLA ABC	79,3±7,6	60,4±4,9 ↓*
CD326+HLA E	23,7±1,9	22,4±4,1
CD326+CD274+	4,1±0,8	10,6±0,5 ↑*

Примечания: * - различия показателей статистически значимы по отношению к отсутствию коэкспрессии CD44+CD133+ ($p \leq 0,05$).

Таким образом, если найденные в опухолевой ткани изменения связаны преимущественно с распространенностью опухолевого процесса, то особенности иммунного микроокружения — в большей степени с коэкспрессией маркеров

ОСК, что подчеркивает различие изменений при оценке по наличию/отсутствию отдаленного метастазирования и коэкспрессии маркеров ОСК.

Профиль транскрипционной активности микроРНК в опухолевой ткани больных раком ободочной кишки

При изучении профиля транскрипционной активности микроРНК в опухолевой ткани обнаружено статистически значимое ($p < 0,0005$) изменение экспрессии hsa-let-7i-5p (увеличение в 4,2 раза в IV стадии), hsa-miR-126-5p (увеличение в 2,0; 2,1 и 2,9 раза в II, III и IV стадиях, соответственно), hsa-miR-143-3p (снижение в 3,3 раза в IV стадии), hsa-miR-21-5p (увеличение в 3,9 и 4,8 раза в III и IV стадиях), hsa-miR-25-3p (увеличение в 3,2 раза в IV стадии), hsa-miR-26a-5p (снижение в 10,0 раз, 5,0 раз и 6,7 раза при II, III и IV стадиях, соответственно) и hsa-miR-92a-3p (увеличение в 2,2; 5,1 и 9,5 раз при II, III и IV стадиях, соответственно) в опухолевой ткани относительно нормальной (рисунок 2).

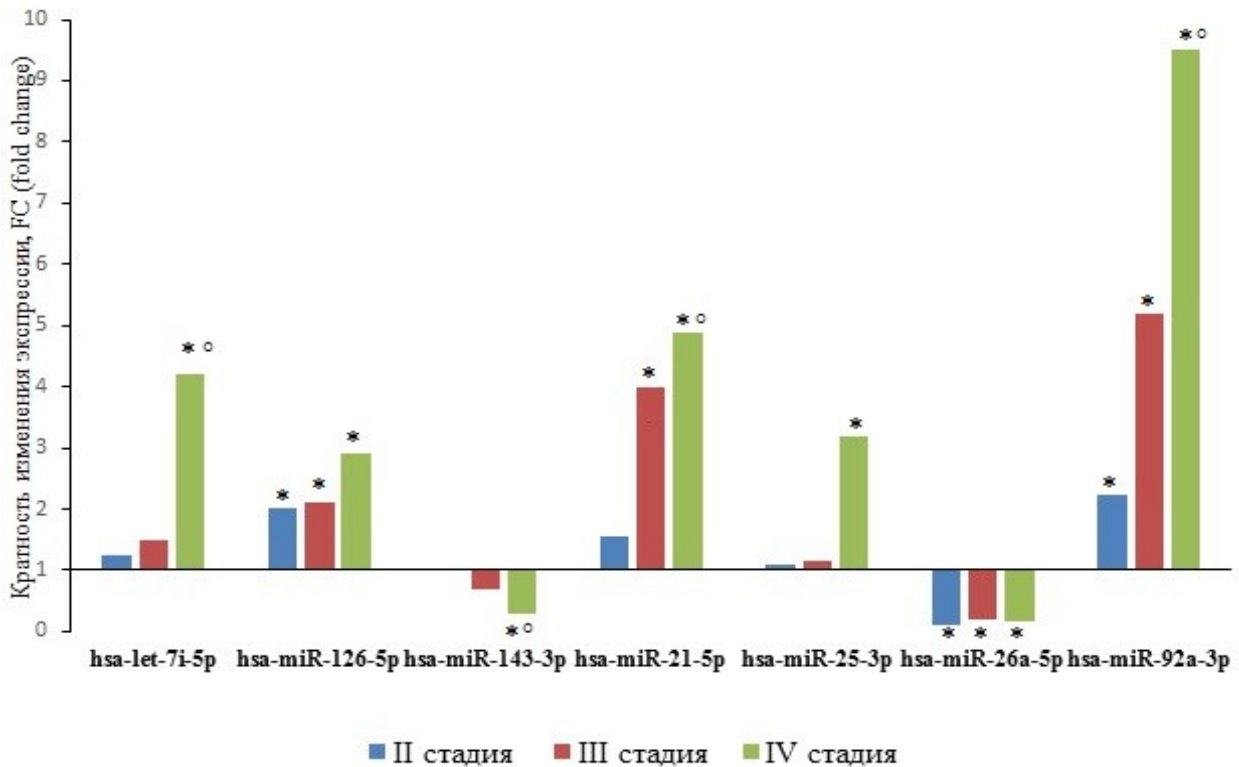


Рисунок 2. Экспрессия микроРНК в опухоли

* - статистически значимые ($p < 0,0005$) различия от нормальной ткани,

o - статистически значимые ($p < 0,005$) различия от II стадии.

Кроме того, обнаружено статистически значимое ($p < 0,005$) изменение экспрессии hsa-let-7i-5p (увеличение в 3,4 раза), hsa-miR-143-3p (снижение в 3,4 раза), hsa-miR-21-5p (увеличение в 3,2 раза) и hsa-miR-92a-3p (увеличение в 4,3 раза) у больных IV стадии относительно II стадии (рисунок 2). Наибольшее отклонение экспрессии микроРНК от показателей нормальной ткани наблюдается в группе больных IV стадии.

Профиль транскрипционной активности микроРНК в изолированных ЦОК

При оценке экспрессия микроРНК в ЦОК больных III и IV стадий относительно экспрессии в ЦОК больных II стадии общими являлись гиперэкспрессия miR-21-5p, miR-92a-3p и снижение экспрессии miR-26-5p и hsa-

miR-143-3p ($p < 0,05$). У больных IV стадии отмечено, кроме того, повышение экспрессии hsa-miR-126-5p и hsa-miR-25-3p относительно экспрессии в ЦОК больных II стадии ($p < 0,05$). При этом экспрессия hsa-miR-143-3p была в 1,8 раза ($p < 0,05$) ниже в ЦОК больных IV стадии по сравнению с больными III стадии, а экспрессия hsa-miR-92a-3p в 1,7 раза выше в ЦОК больных IV стадии по сравнению с больными III стадии ($p < 0,05$) (рисунок 3).

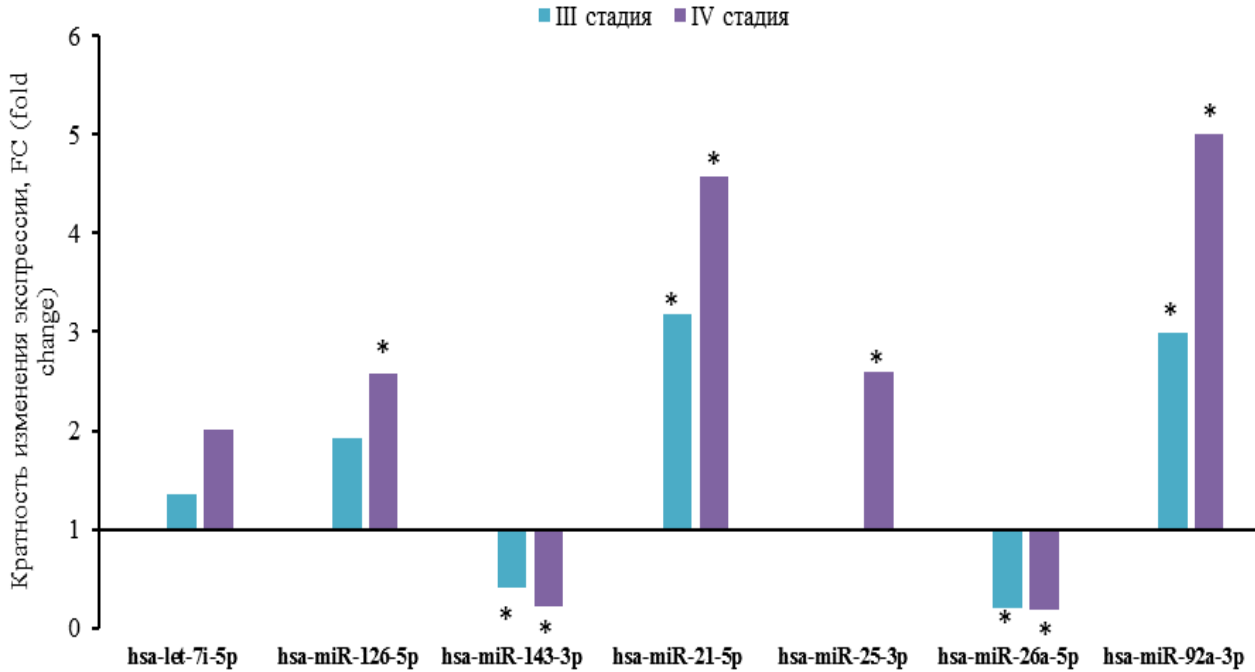


Рисунок 3. Экспрессии микроРНК в ЦОК у больных раком ободочной кишки
* - статистически значимые различия относительно больных II стадии ($p < 0,05$)

При сравнении результатов экспрессии из различных типов биоматериала отмечено сходство экспрессии микроРНК в опухоли и ЦОК. Тем не менее, выявлены различия по экспрессии hsa-miR-26a-5p, уровень которой в опухолях различных стадий значимо снижен примерно до одинакового уровня в сравнении с нормальной тканью, а в ЦОК III-IV стадий значимо отличается от II стадии, что позволяет дифференцировать рак ободочной кишки с отсутствием и наличием отдаленных и регионарных метастазов.

Биоинформационный анализа участия паттерна микроРНК в регуляции ЭМП и ОСК сигналинга

С помощью баз BioCarta и Gene Ontology был проведен анализ сигнальных путей, в регуляции которых опосредованно могут принимать участие обозначенные выше микроРНК. В результате установлена перекрестная ассоциация паттерна некодирующих РНК в сигналинге ЭМП и ОСК (рисунки 4-7 построены в BioCarta).

Участие микроРНК в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Одной из ключевых особенностей ЭМП является потеря целостности эпителия, возникающая в результате деградации адгезивных контактов за счет протеолитического расщепления с помощью ММП, экспрессия которых регулируется hsa-miR-21-5p, hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p. Другой механизм активации ЭМП связан с ремоделированием цитоскелета и взаимодействием белков ERM с CD44, обуславливая клеточную подвижность (рисунок 4).

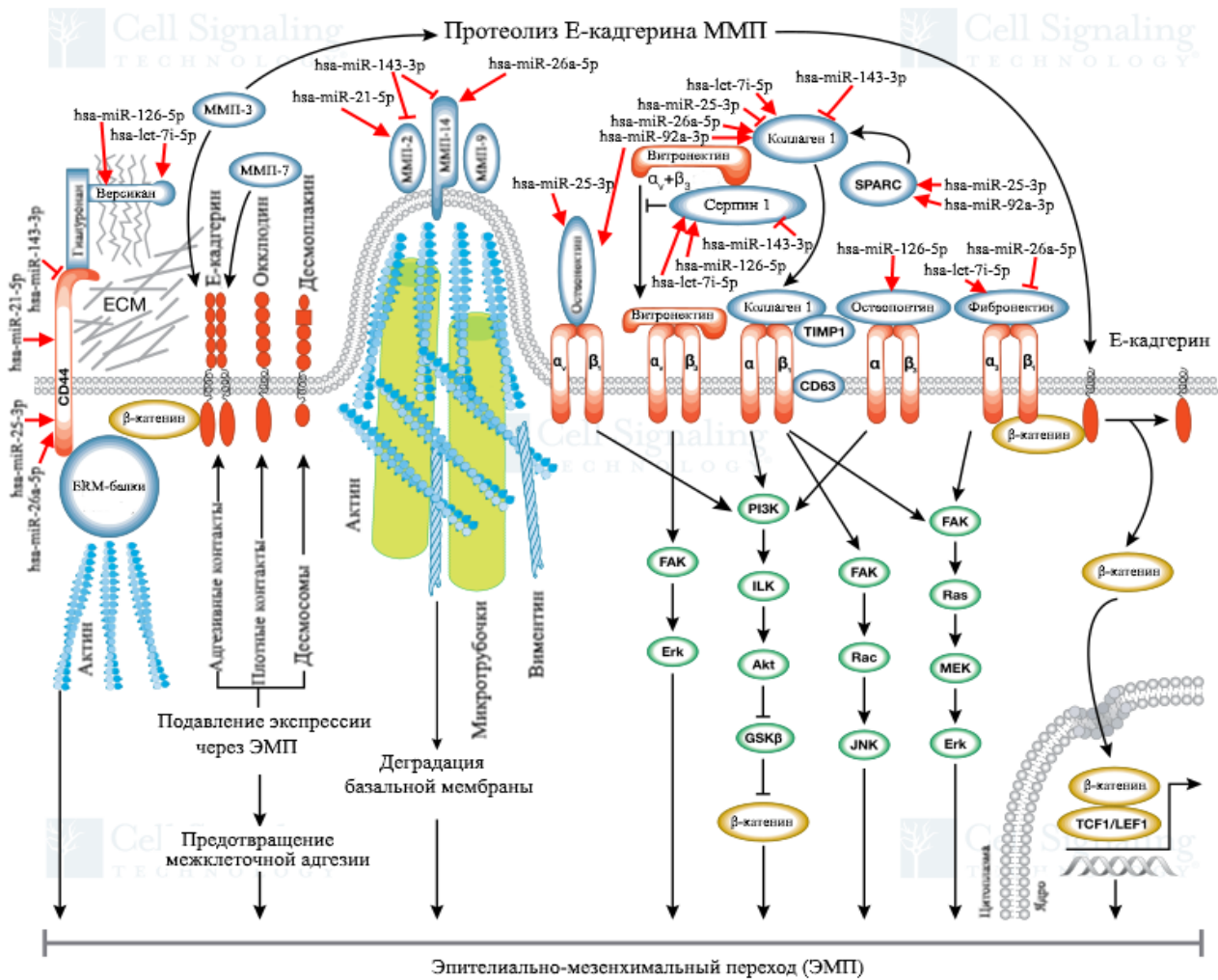


Рисунок 4. Регуляция сигнальных механизмов, ассоциированных с индукцией ЭМП

Таким образом, повышение уровня hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p и hsa-miR-25-3p в сочетании со снижением уровня hsa-miR-143-3p у больных в случае неблагоприятного исхода приводит к повышению экспрессии версикана и CD44 и интенсификации ЭМП.

Белки внеклеточного матрикса коллаген 1, витронектин и фибронектин, экспрессию которых регулируют также hsa-let-7i-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-143-3p и hsa-miR-25-3p (рисунок 4), также могут участвовать в запуске ЭМП опосредованно через SPARC. Повышение уровня hsa-let-7i-5p, hsa-miR-92a-3p в сочетании со снижением уровня hsa-miR-143-3p может быть сопряжено с повышением экспрессии коллагена 1 и активацией ЭМП. Кроме того, hsa-miR-92a-3p и hsa-miR-25-3p положительно регулируют транскрипцию SPARC, в связи с чем высокий уровень данных микроРНК может вносить дополнительный вклад в активацию ЭМП.

Сигнальный путь Wnt в опухолевых стволовых клетках. В ходе биоинформационного анализа выявлен ряд микроРНК, которые усиливают сигнальный путь Wnt, таргетируя гены GSK3 β , APC и β -катенина (рисунок 5).

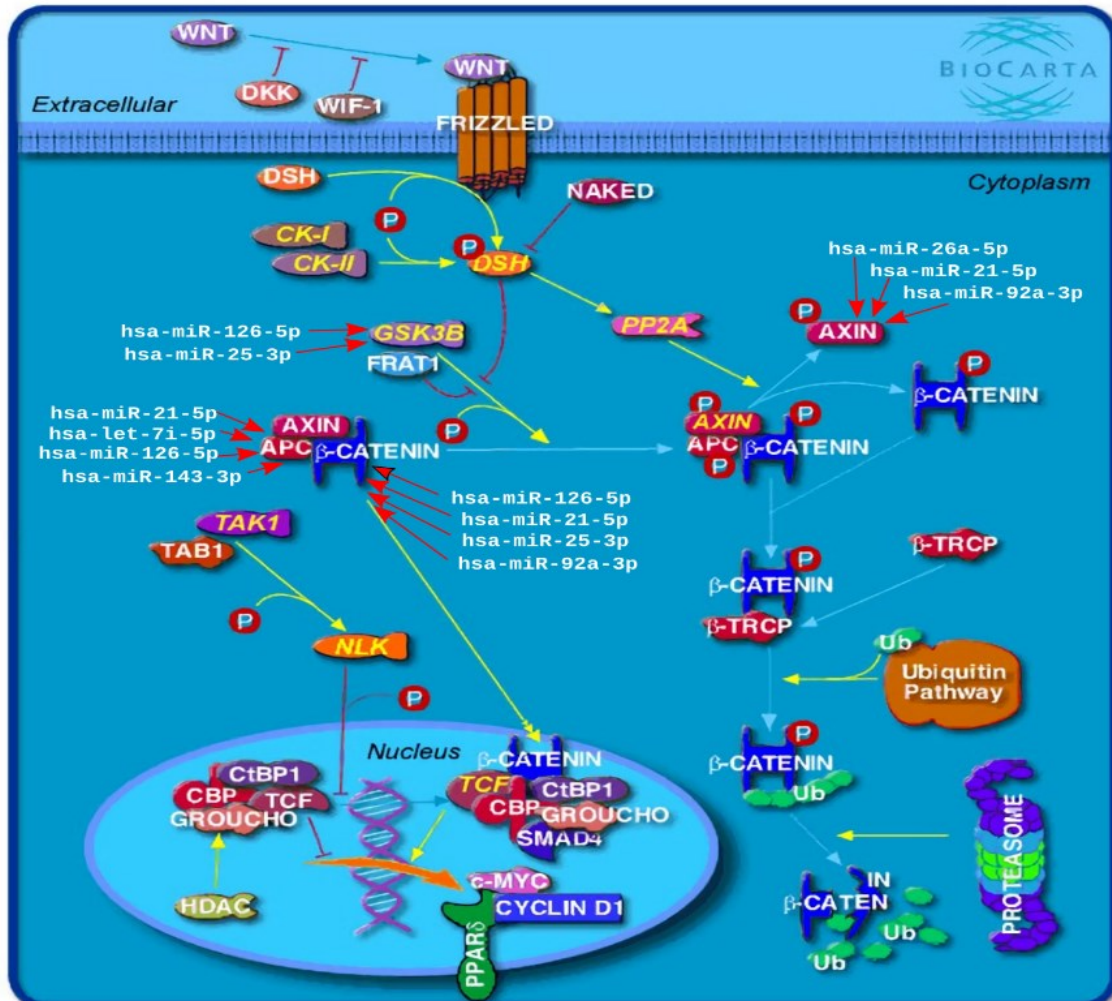


Рисунок 5. Регуляция сигнального пути Wnt в опухолевых стволовых клетках

В сигнальном пути Wnt ключевая роль отводится β -катенину. При поступлении сигнала от рецептора он проникает в ядро, где связывается с комплексом TCF/CBP/CtBP1/SMAD4/Groucho и активирует транскрипцию генов клеточного цикла. При отсутствии передачи сигналов по каноническому пути Wnt, β -катенин связывается с комплексом аксина, APC и GSK3 β , затем фосфорилируется, что приводит к его убиквитинированию и протеосомной деградации. Высокие уровни hsa-miR-126-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-21-5p и hsa-miR-92a-3p могут способствовать реализации биологических свойств ОСК и дальнейшего прогрессирования опухоли.

Сигнальный путь Hedgehog в опухолевых стволовых клетках начинается с рецептора PTCH, который передает сигнал на SMO, что позволяет отделиться Gli1/2 от SUFU и проникнуть в ядро, выступая в роли транскрипционного фактора. Нами установлено, что hsa-miR-126-5p положительно регулирует экспрессию PTCH, а hsa-miR-143-3p и hsa-let-7i-5p — Gli-2 (рисунок 6). Предполагается, что высокий уровень данных микроРНК через сигнальный путь Hedgehog может усиливать жизнеспособность ОСК и повышать резистентность к терапии.

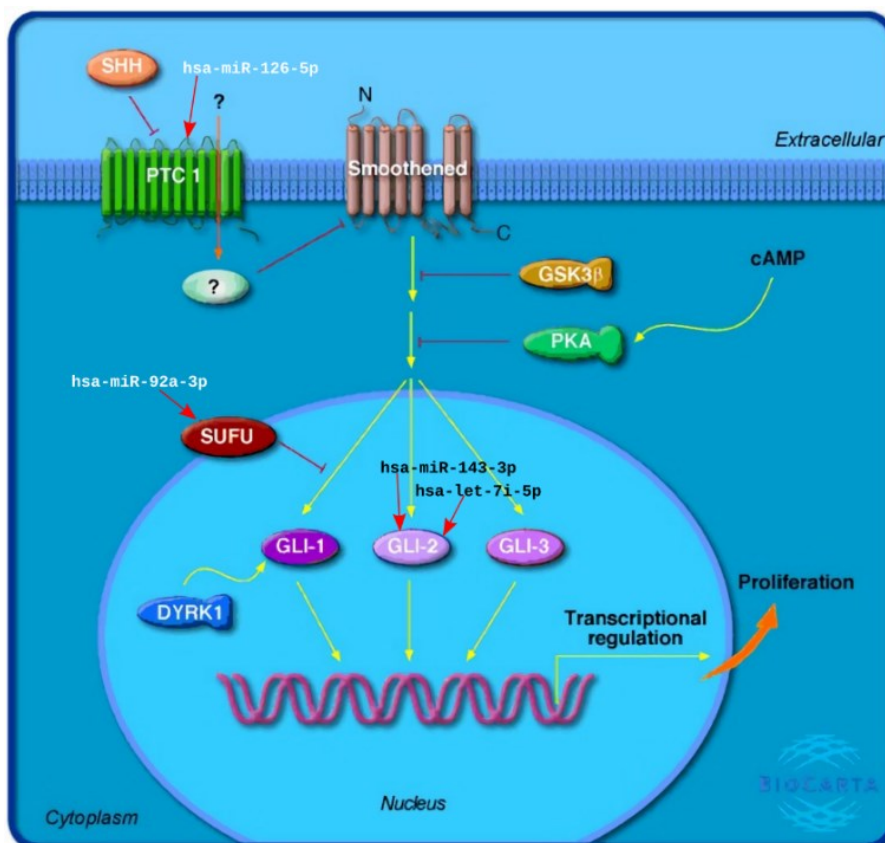


Рисунок 6. Регуляция сигнального пути Hedgehog в опухолевых стволовых клетках

Сигнальный путь NF-κB в опухолевых стволовых клетках. Сигнальный путь NF-κB начинается с передачи сигнала, получаемого рецептором от IL-1, TNF, липополисахарида или других первичных мессенджеров, димеру p50-p65, который подвергается посттрансляционным модификациям и переносится в ядро, где активирует транскрипцию генов-мишеней (рисунок 7).

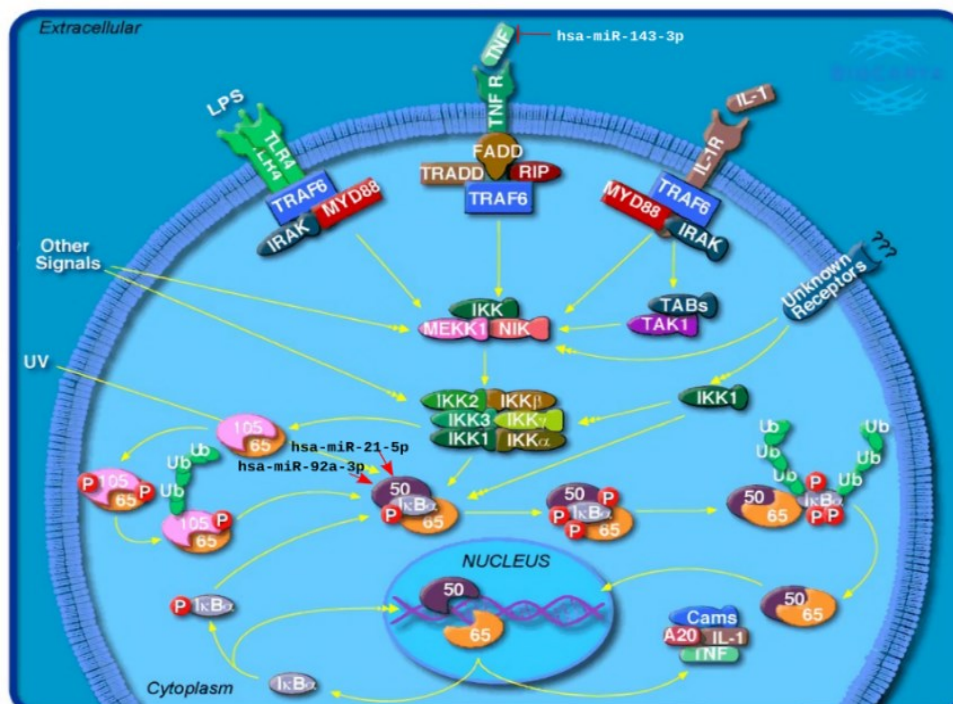


Рисунок 7. Регуляция сигнального пути NF-κB в опухолевых стволовых клетках

В ходе биоинформационного анализа нами установлено, что hsa-miR-143-3p может таргетировать TNF и подавлять его экспрессию, тогда как hsa-miR-21-5p и hsa-miR-92a-3p положительно модулируют экспрессию субъединицы p50. (рисунок 7).

Учитывая снижение уровня hsa-miR-143-3p у больных с неблагоприятным исходом, можно предположить, что TNF может беспрепятственно реализовать свою функцию и запустить сигнальный путь NF-κB. В этом ему помогает высокий уровень hsa-miR-21-5p и hsa-miR-92a-3p в исследуемых группах, которые активируют транскрипцию *NFKB1* и повышают содержание доступной p50. (рисунок 7).

В итоге, на основании построенной *in silico* сети взаимодействия выделенных микроРНК посредством ключевых для метастазирования сигналингов онкотрансформированной клетки мы выделили гены-мишени, перспективные для дальнейшего исследования их транскрипционной активности в опухолях ободочной кишки.

Экспрессия генов-мишеней микроРНК в опухолевой ткани больных раком ободочной кишки

Из 112 генов-мишеней, идентифицированных для семи микроРНК (hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p и hsa-miR-92a-3p), для ПЦР исследования было выбрано 25 генов, являющихся ключевыми участниками сигнальных путей эпителиально-мезенхимального перехода и стволовых клеток опухоли ((*MMP2*, *MMP14*, *CD44*, *VCAN*, *SPP1*, *FNI*, *COL1A2*, *SPARC*, *AXIN*, *GSK3B*, *CTNNB1*, *APC*, *SUFU*, *PTCH1*, *GLI2*, *BM1*, *ALDH1*, *NANOG*, *CCND1*, *MYC*, *TWIST1*, *OCT4*, *PDGFRA*, *TNF*, *NFKB1*).

Нами выявлен ряд статистически значимых изменений транскрипционной активности 14-ти генов-мишеней из 25 исследованных: гиперэкспрессия отмечена для 12-ти протоонкогенов (*MMP2*, *CD44*, *SPP1*, *FNI*, *COL1A2*, *SPARC*, *CTNNB1*, *SUFU*, *NANOG*, *MYC*, *OCT4*, *NFKB1*), падение транскрипционной активности - для двух онкосупрессоров (*APC*, *GSK3B*) (таблица 15).

Таблица 15 – Дифференциальная экспрессия генов-мишеней в опухоли относительно условно здоровой ткани (U-тест)

Гены-мишени	II стадия		III стадия		IV стадия	
	Z	p	Z	p	Z	p
<i>MMP2</i>	4,90959	0,00000	4,34154	0,00001	5,39649	0,00000
<i>MMP14</i>	-1,50128	0,13328	0,60863	0,54277	1,82588	0,06787
<i>CD44</i>	4,69319	0,00000	4,12514	0,00004	5,26124	0,00000
<i>VCAN</i>	0,47342	0,63591	0,47342	0,63591	-1,12274	0,26155
<i>SPP1</i>	3,47594	0,00051	3,47594	0,00051	5,26124	0,00000
<i>FNI</i>	-0,52748	0,59786	1,47423	0,14042	2,96198	0,00306
<i>COL1A2</i>	1,74473	0,08103	2,96198	0,00306	3,31395	0,00092
<i>SPARC</i>	5,39649	0,00000	4,99074	0,00000	5,39700	0,00000
<i>AXIN</i>	-0,71683	0,47348	1,36603	0,17193	1,63653	0,10173
<i>GSK3B</i>	-2,85378	0,00432	-1,25783	0,20845	-3,71939	0,00020
<i>CTNNB1</i>	0,75744	0,44879	1,35257	0,17619	3,89540	0,00010
<i>APC</i>	-2,61033	0,00905	-1,04143	0,29768	-2,33983	0,01929

Гены-мишени	II стадия		III стадия		IV стадия	
	Z	p	Z	p	Z	p
<i>SUFU</i>	1,20373	0,22870	1,04143	0,29768	2,71853	0,00656
<i>PTCH1</i>	0,79798	0,42488	0,90618	0,36484	1,39393	0,16669
<i>GLI2</i>	-0,93323	0,35070	0,74388	0,45695	1,23078	0,21841
<i>BMI1</i>	1,20373	0,22870	1,04143	0,29768	1,42098	0,15479
<i>ALDH1</i>	-0,98733	0,32348	1,20373	0,22870	1,50128	0,13328
<i>NANOG</i>	0,77093	0,44075	0,85208	0,39417	2,42098	0,01548
<i>CCND1</i>	-1,06848	0,28531	0,09468	0,92457	0,82503	0,40936
<i>MYC</i>	2,74558	0,00604	2,69148	0,00711	3,77349	0,00016
<i>TWIST1</i>	-0,71683	0,47348	1,01438	0,31040	0,20288	0,83923
<i>OCT4</i>	1,87998	0,06011	1,31193	0,18954	2,52918	0,01143
<i>PDGFRA</i>	-1,36603	0,17193	-0,36518	0,71498	1,06848	0,28531
<i>TNF</i>	-0,55453	0,57922	0,79798	0,42488	0,58158	0,56085
<i>NFKB1</i>	4,04399	0,00005	3,31364	0,00092	3,93579	0,00008

Примечание: выделены показатели, статистически значимо отличающиеся от здоровой ткани ($p < 0,05$)

Профиль генной экспрессии в опухолях разных стадий отличался следующим:

- при всех трёх исследованных стадиях отмечены статистически значимые изменения для шести генов *MMP2*, *CD44*, *SPPI*, *SPARC*, *MYC*, *NFKB1*;

- в большинстве случаев наблюдается усиление изменения транскрипционной активности исследованных генов по мере увеличения распространенности опухолевого процесса. Например, экспрессия *MMP2*, *CD44*, *MYC* увеличивается у больных II стадии соответственно в 4,9; 5,2 и 1,3 раз, у больных III стадии - в 6,0; 5,4 и 1,8 раз, у больных IV стадии – в 8,1; 9,4 и 2,4 раз. В то же время экспрессия гена *GSK3B* снизилась во II и III стадии в 1,2 раз, в IV - в 4,9 раза;

- в группе больных раком ободочной кишки с отдаленными метастазами в печень (IV стадия) отмечено статистически значимое увеличение экспрессии гена *COL1A2*, кодирующего коллаген, *CTNNB1* (β -катенин), и двух генов стволовости, кодирующих транскрипционные факторы, *NANOG* и *OCT4* соответственно в 1,2; 1,7; 1,5 и 1,6 раз (таблица 15).

Влияние изученных параметров на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

При проведении регрессионного анализа оценки влияния лабораторных параметров, рассматриваемых как предикторы, на риск развития неблагоприятного события (летального исхода или метастазирования), в качестве коварианты включали стадию заболевания; все показатели, имеющие статистическую значимость демонстрировали независимость от стадии.

Среди исследованных факторов системного иммунитета однонаправленное и прямое влияние на развитие летального исхода было выявлено у CD16dim56bright лимфоцитов и концентрации IL-6 в крови (таблица 16).

Таблица 16 – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния системных иммунологических показателей крови на общую выживаемость больных

Показатель	β -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка β	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
CD16dim56 bright (от NK)	0,085	0,036	5,53	0,019	0,82
IL-6	0,014	0,006	5,41	0,023	1,24

Среди изученных микроРНК наиболее выраженное прямое влияние на риск развития летального исхода больных имела исходная экспрессия hsa-miR-126-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-21-5p и обратное по направленности влияние величины экспрессии hsa-miR-143-3p в опухоли (таблица 17).

Таблица 17 – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии микроРНК в опухоли на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

Показатель	β -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка β	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
hsa-let-7i-5p	0,76	0,14	29,68	0,0001	2,14
hsa-miR-126-5p	2,39	0,44	29,0	0,0001	10,89
hsa-miR-143-3p	-3,93	0,755	26,92	0,0001	0,019
hsa-miR-21-5p	0,939	0,22	18,12	0,0002	2,56
hsa-miR-25-3p	1,02	0,18	29,53	0,0001	2,78
hsa-miR-92a-3p	0,38	0,07	27,74	0,0001	1,45

Повышению риска летального исхода способствовало снижение экспрессии генов *GSK3B*, *SUFU* и *APC* и повышение экспрессии генов *MMP2*, *CD44*, *SPPI*, *FNI*, *COL1A2*, *SPARC*, *CTNNB1*, *NANOG*, *MYC*, *OCT4*, *NFKB1*. При этом, наибольшее влияние на развитие летального исхода оказывали падение экспрессионной активности гена *GSK3B*, и повышение экспрессии *CD44* и *MYC* (таблица 18).

Таблица 18 – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии генов опухолевых клеток на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

Показатель	β -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка β	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
<i>MMP2</i>	1,51	0,43	12,43	0,00042	0,22
<i>CD44</i>	2,84	0,56	25,53	0,00000	17,07
<i>SPPI</i>	1,69	0,32	28,39	0,00000	5,44
<i>FNI</i>	1,54	0,31	24,93	0,00000	0,22
<i>COL1A2</i>	1,54	0,31	24,94	0,00000	0,21
<i>SPARC</i>	2,14	0,39	29,51	0,00000	0,12
<i>GSK3B</i>	-4,29	0,78	30,47	0,00000	73,04
<i>CTNNB1</i>	1,32	0,24	29,10	0,00000	0,27
<i>APC</i>	-2,68	0,49	29,45	0,00000	0,07
<i>SUFU</i>	-2,10	0,60	12,43	0,00042	0,12

Показатель	β -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка β	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
<i>NANOG</i>	2,68	0,49	29,45	0,00000	0,07
<i>MYC</i>	2,63	0,56	22,22	0,00000	13,91
<i>OCT4</i>	2,42	0,45	29,62	0,00000	0,09
<i>NFKB1</i>	4,05	0,76	28,55	0,00000	0,02

При иммуногистохимическом исследовании выявлено, что повышение экспрессии CD44+, CD133+, ZEB1 в опухоли сопровождалось повышением риска развития летального исхода в послеоперационный период, тогда как экспрессия ALDH1 на него не влияла (таблица 19).

Таблица 19 – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии CD44, CD133, ALDH1, ZEB1 в ткани опухоли на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

Показатель	β -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка β	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
CD44+	0,207	0,015	2,963	0,013	1,621
CD133+	0,806	0,032	6,298	0,001	1,923
ALDH1	0,025	0,021	1,373	0,241	1,025
ZEB1	1,167	0,053	10,014	0,002	1,881

В результате регрессионного анализа Кокса было установлено, что большинство из факторов локального иммунитета не оказывали статистически значимого влияния на риск летального исхода, за исключением экспрессии PD-1 (CD279+) на лимфоцитах (прямого), а также HLA-ABC (обратного) на опухолевых клетках (таблица 20).

Таблица 20 – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии локальных показателей на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

Показатель	β -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка β	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
CD45+CD279+	1,27	0,02	4,47	0,023	2,82
CD326+HLA-ABC	-1,01	0,03	6,54	0,01	0,19

Показана также различная выживаемость больных в зависимости от уровня ЦОК: за пятилетний срок наблюдения кумулятивная выживаемость больных с отсутствием ЦОК снизилась до 0,633, при 1-3 ЦОК до 0,565, при 4-9 ЦОК до 0,5 и при ЦОК 10 и выше до 0,164 (log-rank 11,59, p=0,009).

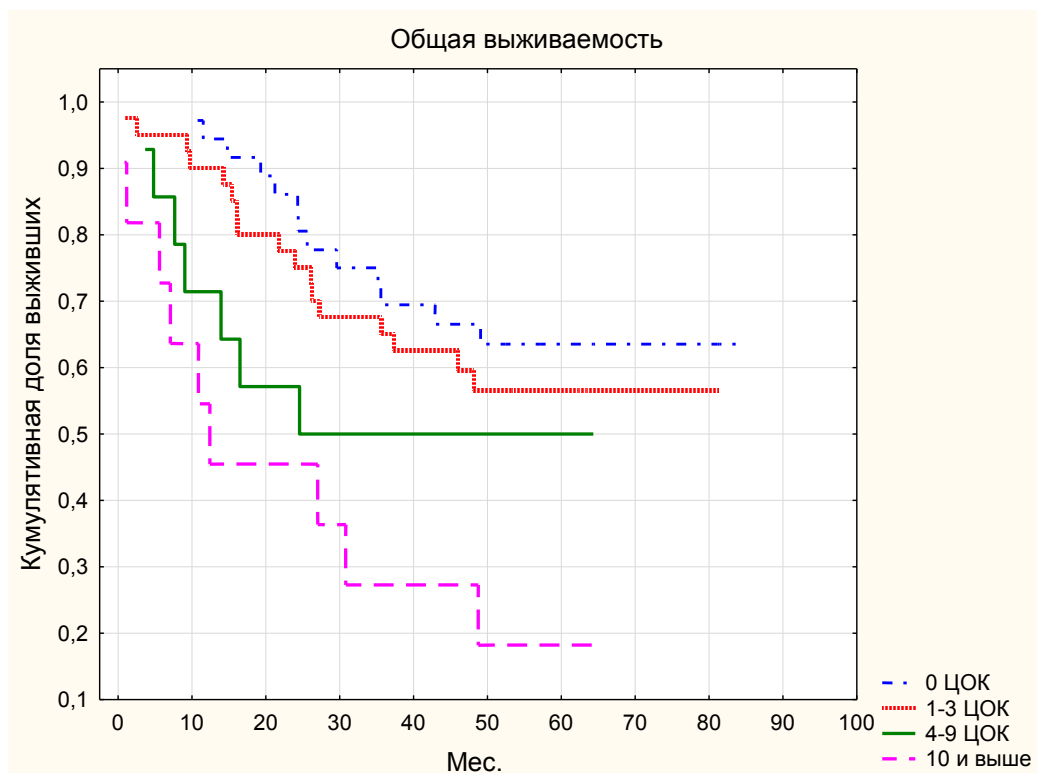


Рисунок 8. Общая выживаемость больных раком ободочной кишки в зависимости от количества ЦОК

Медиана дожития пациентов с отсутствием ЦОК в периферическом кровотоке составила 53,5 мес., при 1-3 ЦОК – 46 мес., 4-9 ЦОК – 32,2 мес. и 10 ЦОК и выше 12,4 мес. (рисунок 8).

Прогностическая значимость изученных параметров для оценки риска отдаленного метастазирования у больных раком ободочной кишки

Регрессионный анализ позволил также выделить показатели со статистической значимостью для прогноза развития отдаленного метастазирования. Так, вероятность развития отдаленного метастазирования в лимфатические узлы или печень после операции повышалась при увеличении экспрессии маркера CD133+ и фактора ЭМП ZEB1 (таблица 21).

Таблица 21 – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии маркеров ОСК и фактора ЭМП в опухоли на выживаемость больных, свободную от метастазирования

Показатель	β -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка β	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
CD44+	0,019	0,041	0,227	0,634	0,981
CD133+	0,335	0,089	6,937	0,006	1,791
ALDH1	0,038	0,047	0,646	0,422	0,963
ZEB1	1,321	0,127	6,364	0,012	1,679

Было установлено отсутствие статистически значимого влияния большинства локальных характеристик опухоли и ее микроокружения на риск развития отдаленного метастазирования. Исключением являлись регуляторные Т-лимфоциты и экспрессия опухолевыми клетками HLA-ABC (таблица 22).

Таблица 22 – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии локальных показателей на выживаемость, свободную от метастазирования

Показатель	β -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка β	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
Tregs	1,21	0,12	2,74	0,01	1,81
CD326+HLA-ABC	-1,94	0,07	3,68	0,04	0,28

Прогностическое значение отдельно взятого числа ЦОК в периферическом кровотоке на выживаемость, свободную от метастазирования, было низким (отношение шансов 1,23, $p=0,454$).

Модели прогноза летального исхода у больных раком ободочной кишки

По итогам регрессионного анализа было установлено, что одновременный учет у больных раком ободочной кишки экспрессии CD44+ в опухолевой ткани и числа ЦОК в периферическом кровотоке взаимно усиливают информативность прогноза развития летального исхода (отношение шансов 7,213, $p=0,000$). Для составления математического выражения оба показателя ранжировали и методом логистической регрессии определяли коэффициент (z), позволяющий рассчитать вероятность развития летального исхода в первые пять лет после операции. Методом ROC-анализа для z было найдено разделительное значение (0,34), превышение которого свидетельствовало о высоком риске летального исхода с диагностической чувствительностью 86,96% и специфичностью 80,36%.

С повышением экспрессии CD44+ и числа ЦОК вероятность развития летального исхода больных раком ободочной кишки повышалась. Стратификация поверхности графика цветом помогает визуально определить вероятность развития неблагоприятного исхода заболевания (рисунок 9).

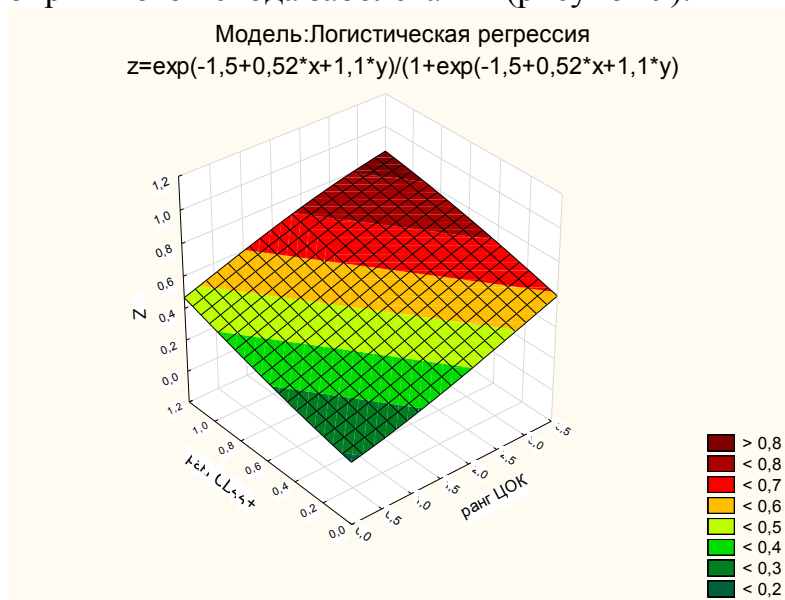


Рисунок 9. График вероятности развития летального исхода в зависимости от уровня экспрессии CD44 и количества ЦОК

Кроме того, был обозначен еще один информативный комплекс предикторов. В разработанную модель были объединены параметры: уровень экспрессии микроРНК 25-3р, экспрессия CD279+ на лимфоцитах, ранжированное

число ЦОК и экспрессия HLA-ABC опухолевыми клетками. Каждый предиктор по отдельности повышал риск развития летального исхода, однако, учет всех четырех предикторов позволил определить прогноз с большей информативностью (таблица 23).

Таблица 23 – Величины отношения шансов развития летального исхода

Предиктор модели	Отношение шансов	p
Экспрессия микроРНК 25-3p	7,6	<0,0001
Ранг ЦОК	5,28	0,050
Экспрессия CD45+279+	4,21	0,039
Экспрессия CD326+HLA-ABC	0,13	0,043
Для всей модели: $\chi^2=46,0$ p<0,0001, отношение шансов 41,4.		

Было определено критическое значение прогностического критерия P, при превышении которого риск развития летального исхода повышался. При $P \geq 0,56$ риск развития летального исхода у больных в первые пять лет после операции был высоким, при $P < 0,56$ – низким. Диагностическая чувствительность модели составила 80,4%, диагностическая специфичность 85,1%.

Модели прогноза отдаленного метастазирования и сроков его развития у больных раком ободочной кишки

По итогам регрессионного анализа было установлено, что одновременный учет у больных раком ободочной кишки экспрессии микроРНК-126a-5p, ранжированного числа ЦОК в периферической крови, числа T-регуляторных клеток в ткани и экспрессии рецепторов HLA-ABC на опухолевых клетках взаимоусиливает информативность прогноза развития метастазирования в послеоперационный период. Каждый предиктор по отдельности повышал риск метастазирования, однако, учет всех четырех предикторов многократно повышал информативность прогноза развития метастазов (таблица 24).

Таблица 24 – Величины отношения шансов развития метастазирования у больных раком ободочной кишки в первые пять лет после операции

Предиктор модели	Отношение шансов	p
Экспрессия микроРНК 126a-5p	3,5	<0,01
Ранг ЦОК	4,3	<0,001
Число T регуляторных клеток	2,3	0,026
Экспрессия 326+HLA-ABC	0,18	0,017
Для всей модели: $\chi^2=12,37$ p=0,015, отношение шансов 30,7.		

Было определено критическое значение прогностического критерия P_m, при превышении которого риск развития метастатического поражения повышался. При $P_m \geq 0,67$ риск развития отдаленных метастазов был высоким, при $P < 0,67$ – низким. Диагностическая чувствительность модели составила 89,5%, диагностическая специфичность 78,7%.

Кроме того, методом множественной регрессии была разработана модель, позволяющая в динамике определить сроки развития метастазирования по исходной величине экспрессии маркера эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1 на опухолевых клетках и числу ЦОК в периферическом кровотоке. По критерию F ($F(2,99)=3,18$) разработанная модель имела статистическую значимость $p=0,045$ относительно предсказательной ценности.

Таким образом, в работе с помощью многомерных статистических методов были определены совокупности параметров, которые дополнительно к стадии заболевания позволяли получить информацию о вероятности наступления неблагоприятных исходов не только по факту, но и по срокам развития.

Подводя итог, мы можем констатировать, что выполненное нами исследование, направленное на оценку вклада клеточных (ЦОК, ОСК, иммунологическое микроокружение) и молекулярных характеристик опухоли (профиль экспрессии микроРНК опухоли и ЦОК, экспрессия генов-мишеней опухоли) в прогрессирование рака ободочной кишки, расширило представления о биологических свойствах злокачественного процесса. Изучение биологических характеристик ОСК и ЦОК, выявило, что эти клетки, обладающие повышенными миграционными и инвазивными свойствами, а также резистентностью к лечению, формируют важнейшую стратегию, позволяющую опухоли не только избежать действия иммунного надзора, но и создать поддерживающее ее иммунологическое микроокружение, чем обеспечить ее выживание и распространение.

Проведенное в данной работе исследование, выполненное на различных уровнях: молекулярном, клеточном, тканевом, системном и на уровне целостного организма, важнейших факторов, определяющих наиболее неблагоприятное течение рака ободочной кишки: ОСК, ЦОК и их иммунологического микроокружения, молекулярно-генетических характеристик опухолевых клеток представляет собой комплексный и трансляционный подход к этому заболеванию, полученные данные использованы нами для построения прогностических алгоритмов, целесообразность применения которых подтверждена клиническими примерами. Изученные клеточные и молекулярные характеристики рака ободочной кишки могут быть использованы для стратификации пациентов на группы риска.

ВЫВОДЫ

1. ЦОК у больных различных стадий выявлены в 62,9% случаев в количестве от 1 до 402 клеток; доля больных с уровнем ЦОК от 1 до 3 и выше 3 – в равном количестве случаев по 50%. Установлены статистически значимые связи ЦОК и стадии заболевания ($p < 0,001$), глубины инвазии ($p < 0,001$), статуса лимфатических узлов ($p < 0,001$), метастатического поражения печени ($p < 0,001$), степени дифференцировки ($p < 0,001$), лимфоваскулярной инвазии ($p < 0,001$), лимфоцитарной инфильтрации опухоли ($p = 0,019$), мутации в гене *KRAS* ($p = 0,011$).

2. Состояние врожденного иммунитета при наличии ЦОК характеризуется угнетением его противоопухолевых свойств: вне зависимости от стадии выявлены более высокие уровни NKT, CD16dim56bright, низкие CD16+56dim ($p \leq 0,05$). У больных IV стадии с наличием ЦОК происходит наиболее выраженное угнетение NK-звена: снижение доли функционально активных CD335+ и перфорин-содержащих NK-клеток, повышение CD16dim56bright и снижение CD16+56dim ($p \leq 0,05$); в фагоцитарном звене вне зависимости от стадии заболевания наличие ЦОК сопровождается усилением хемотаксиса и кислородного взрыва в моноцитах и гранулоцитах и повышением количества фагоцитирующих моноцитов ($p \leq 0,05$). При локализованном процессе происходит стимуляция гранулоцитарного фагоцитоза, при генерализованном – его угнетение.

3. Наличие ЦОК характеризуется негативными изменениями показателей адаптивного Т-клеточного иммунитета в виде снижения уровня CD4+ клеток вне зависимости от стадии, повышения CD8+CD25+ при II-III стадиях и CD8+CD69+ при IV стадии рака ободочной кишки ($p \leq 0,05$). Наличие ЦОК у больных вне зависимости от стадии сопровождается снижением сывороточных уровней IFN- γ и TNF- α , наличие ЦОК у больных II стадии характеризуется снижением содержания TNF- α и IL-10 ($p \leq 0,05$), а IV стадии – повышением уровня IL-8.

4. Установлена статистически значимая связь всех исследованных параметров ОСК и ЭМП (CD44, CD133, ALDH1, ZEB1) со стадией заболевания, степенью выраженности лимфоцитарной инфильтрации, уровнем инвазии опухоли и наличием отдаленных метастазов ($p \leq 0,05$). Из 12 изученных клинико-морфологических характеристик опухоли наиболее часто статистически значимая связь наблюдалась с экспрессией CD44 (по 10 параметрам). Экспрессия CD133 продемонстрировала значимую взаимосвязь с 8 из 12 исследованных характеристик, тогда как ALDH1 с 7 из 12, ZEB1 – 6 из 12.

5. Отдаленное метастазирование характеризуется повышением в ткани опухоли доли клеток с маркерами ОСК CD44+CD133+ и CD44+, снижением экспрессии МНС 1 класса HLA-ABC и HLA-E и PD-L1, а в микроокружении опухоли – снижением доли PD-1, PD-L1 и повышением НКТ-лимфоцитов ($p \leq 0,05$).

6. В присутствии ОСК, коэкспрессирующих CD44+CD133+, в опухоли происходят изменения процессов распознавания (снижение уровня CD4+ лимфоцитов и HLA-ABC-экспрессирующих опухолевых клеток на фоне возрастания CD8+ лимфоцитов в микроокружении), клеточной гибели как опухолевых клеток (повышение экспрессии на них PD-L1, так и лимфоцитов (повышение экспрессии на них PD-1), нарастание локальной иммуносупрессии (снижение количества НК-клеток), повышение уровня Tregs ($p \leq 0,05$).

7. Профиль транскрипционной активности микроРНК в опухолевой ткани относительно нормальной характеризуется увеличением экспрессии hsa-miR-126-5p, hsa-miR-92a-3p и снижением экспрессии hsa-miR-26a-5p при всех исследованных стадиях ($p < 0,0005$).

Отдаленное метастазирование характеризуется статистически значимым увеличением экспрессии hsa-let-7i-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-92a-3p, а также снижением экспрессии hsa-miR-143-3p относительно II стадии ($p < 0,005$).

8. Биоинформационный анализ показал участие выявленного паттерна микроРНК (hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p и hsa-miR-92a-3p) в сигналинге эпителиально-мезенхимального перехода и сигнальной сети опухолевых стволовых клеток (Wnt, Hedgehog, NF- κ B). На основании построенной *in silico* сети взаимодействия микроРНК выделены 25 генов-мишеней и изучена их транскрипционная активность.

9. Регионарное метастазирование характеризуется повышением в ткани опухоли относительно нормальной ткани экспрессии 7 из 25 генов ($p < 0,05$): *MMP2*, *CD44*, *SPP1*, *COL1A2*, *SPARC*, *MYC*, *NFKB*, а отдаленное – кроме того, повышением экспрессии генов *FNI*, *CTNNB1*, *SUFU*, *NANOG*, *OCT4* и снижением экспрессии 2 генов: *GSK3B* и *APC* ($p < 0,05$).

10. Регионарное метастазирование характеризуется снижением экспрессии в ЦОК hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p, и повышением экспрессии hsa-miR-92a-3p и hsa-miR-21-5p, а отдаленное – кроме того, повышением экспрессии hsa-miR-126-5p и hsa-miR-25-3p ($p < 0,05$). Уровень экспрессии hsa-miR-26a-5p в ЦОК может быть использован для дифференциальной диагностики наличия регионарных и отдаленных метастазов ($p < 0,05$).

11. По результатам регрессионного анализа для общей выживаемости больных оказались значимыми следующие параметры, при возрастании которых увеличивается риск летального исхода: в крови - уровни CD16dim56bright NK-клеток ($p = 0,019$) и IL-6 ($p = 0,23$); в опухолевой ткани наиболее значимо повышение экспрессии hsa-miR-126-5p ($p = 0,0001$), hsa-miR-25-3p ($p = 0,0001$), hsa-miR-21-5p ($p = 0,0002$) и повышение экспрессии генов *MMP2*, *CD44*, *SPPI*, *FNI*, *COL1A2*, *SPARC*, *CTNBN1*, *NANOG*, *MYC*, *OCT4*, *NFKB1* и снижение – *GSK3B*, *SUFU* и *APC*; повышение экспрессии PD-1 на лимфоцитах ($p = 0,023$) при снижении экспрессии HLA-ABC на опухолевых клетках ($p = 0,01$); повышение доли клеток с маркерами ОСК: CD133+ ($p = 0,001$), CD44+ ($p = 0,013$) и ЭМП: ZEB1 ($p = 0,002$). Выявлены различия пятилетней кумулятивной выживаемости больных при различном уровне ЦОК: при их отсутствии она снизилась до 63,3%, при ЦОК 1-3 до 56,5%, при ЦОК 4-9 до 50% и при ЦОК 10 и выше до 16,4% (log-rank 11,59, $p = 0,009$).

12. Риск развития отдаленного метастазирования после операции повышался при высокой экспрессии CD133+ ($p = 0,006$) и ZEB1+ на опухолевых клетках ($p = 0,012$); а также, при повышении уровня опухоль-инфильтрирующих регуляторных Т-лимфоцитов ($p = 0,01$) и снижении экспрессии HLA-ABC опухолевыми клетками ($p = 0,04$).

13. Для больных раком ободочной кишки разработано 4 прогностических алгоритма – по 2 для риска летального исхода и риска развития отдаленного метастазирования. Алгоритмы могут быть использованы для стратификации пациентов на группы риска и индивидуализации лечебной тактики.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение параметра Z методом логистической регрессии позволяет рассчитать вероятность развития летального исхода в первые пять лет после операции для больных раком ободочной кишки II-IV стадий:

$$Z = \frac{\exp(-1,5 + 0,52 * \text{ЦОК} + 1,1 * \text{CD44})}{1 + \exp(-1,5 + 0,52 * \text{ЦОК} + 1,1 * \text{CD44})}$$

где Z – коэффициент прогноза;

ЦОК – ранжированное число ЦОК в периферическом кровотоке: 0 баллов – ЦОК в периферическом кровотоке отсутствуют, 1 балл - 1-3 ЦОК, 2 балла – 4-9 ЦОК, 3 балла – 10 ЦОК и выше;

CD44 – ранжированная оценка экспрессии CD44+ в опухолевой ткани: 1 балл – экспрессия CD44+ более 10% включительно, 0 баллов – менее 10%;

-1,5 – постоянная константа (определялась экспериментально методом логит-регрессии);

0,52 и 1,1 – коэффициенты перед предикторами (определялись экспериментально методом логит-регрессии).

При Z выше 0,34 прогнозируется высокий риск неблагоприятного исхода.

2. Для расчета прогноза летального исхода с учетом комплекса иммунологических и генетических факторов у больных раком ободочной кишки следует использовать вычисление коэффициента $P = \frac{\exp(z)}{1+\exp(z)}$, для чего по результатам анализа первичных данных о пациентах рассчитать постоянную функцию:

$$Z=1,58*X1 + 0,55*X2 + 0,04*X3 - 0,023*X4 - 4,01,$$

где $X1$ – экспрессия микроРНК 25-3p;

$X2$ – ранжирование значение величины ЦОК в периферическом кровотоке: 0 -0 ЦОК отсутствуют, 1 балл - 1-3 ЦОК, 2 балла – 4 - 9 ЦОК, 3 балла – 10 ЦОК и выше;

$X3$ – количество CD45+CD279+ клеток (%);

$X4$ - количество CD326+HLA-ABC+ опухолевых клеток (%);

-4,01 – постоянная уравнения.

Математическое выражение модели прогноза летального исхода у больных раком ободочной кишки имело вид:

$$P = \frac{\exp(1,58*X1+0,55*X2+0,04*X3-0,023*X4-4,01)}{1+\exp(1,58*X1+0,55*X2+0,04*X3-0,023*X4-4,01)}$$

При $P \geq 0,56$ риск развития летального исхода у больных раком ободочной кишки в первые пять лет после операции был высоким, при $P < 0,56$ – низким.

3. Для расчета вероятности развития отдаленных метастазов после операции для больных раком ободочной кишки, целесообразно использовать математическое выражение, имеющее вид:

$$P_M = \frac{\exp(34,3*X1+0,28*X2+0,16*X3-0,035*X4-4,4)}{1+\exp(34,3*X1+0,28*X2+0,16*X3-0,035*X4-4,4)}$$

где P_M – коэффициент прогноза развития метастазов;

$X1$ – экспрессия микроРНК 126a-5p;

$X2$ – ранжированное значение величины ЦОК в периферическом кровотоке: 0 -0 ЦОК отсутствуют, 1 балл - 1-3 ЦОК, 2 балла – 4 - 9 ЦОК, 3 балла – 10 ЦОК и выше;

$X3$ – число Т регуляторных клеток;

$X4$ - экспрессия рецепторов HLA-ABC на опухолевых клетках;

-4,4 – постоянная уравнения.

При $P \geq 0,67$ риск развития метастазов у больных раком ободочной кишки в первые пять лет после операции был высоким, при $P < 0,67$ – низким.

4. Для определения сроков метастазирования для больных раком ободочной кишки, целесообразно использовать исходные показатели экспрессии маркера эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1 на опухолевых клетках и уровень ЦОК в крови.

$$T = -0,31 * \text{ЦОК} - 0,42 * \text{ZEB1} + 43,08,$$

где T - сроки появления новых метастазов (мес.) в динамике наблюдения после операции;

ЦОК – число циркулирующих опухолевых клеток в периферическом кровотоке;

ZEB1 – число опухолевых клеток с экспрессией маркера эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1.

5. Для стратификации больных раком ободочной кишки III стадии с высоким риском развития метастатического поражения печени в течение двух лет может быть использовано определение мутации гена *KRAS* в опухоли и уровня ЦОК в периферическом кровотоке.

При наличии мутации гена *KRAS* и количества ЦОК более пяти в 100% случаев прогнозируется метастазирование.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные результаты открывают перспективу использования разработанных прогностических алгоритмов на проспективных группах больных раком ободочной кишки, что позволит валидировать их.

Кроме того, представляется перспективным проведение подобных исследований взаимосвязи уровней ЦОК, ОСК с иммунным статусом и микроокружением опухоли при различных молекулярно-генетических подтипах рака ободочной кишки, а также при других злокачественных опухолях для определения того, насколько полученные данные являются универсальными или органоспецифическими. Проведение подобного исследования в динамике лечения позволило бы выявить новые и/или подтвердить описанные биологические закономерности и прогностические факторы, внося таким образом вклад в персонализацию лечения.

Установление дифференциально экспрессированных микроРНК при различной распространенности рака ободочной кишки позволяет разработать тест-систему, дополняющую диагностический и прогностический алгоритм.

Представляется перспективным также рассмотрение ряда исследованных показателей в качестве возможных мишеней для таргетной (например, против ОСК), антицитокиновой терапии (против IL-6, IL-8), иммуно- и генотерапии. Так, экспрессия PD-1 и PD-L1 связана с экспрессией опухолевыми клетками стволоподобных маркеров CD44+ и CD44+CD133+ но не CD133+, что делает такие опухоли адекватными мишенями для иммунотерапии ингибиторами иммунных контрольных точек системы PD-1/ PD-L1.

В качестве перспективных направлений для дальнейших научных исследований следует отметить изучение механизмов, опосредующих связь некоторых субпопуляций лимфоцитов (NKT, CD16dimCD56bright, CD8+CD25+, CD4+CD25+, CD8+CD69+), нейтрофилов и моноцитов (отвечающих на fMLF) с распространенностью рака ободочной кишки и уровнем ЦОК, а также качественных и количественных характеристик ОСК с особенностями иммунного микроокружения опухоли. В работе получены данные о некоторых различиях тканевых и циркулирующих опухолевых клеток по составу микроРНК; дальнейшее исследование молекулярно-генетических различий и сходства этих

клеток будет способствовать выявлению механизмов диссеминации рака ободочной кишки.

Обнаруженные нами пары микроРНК-ген проясняют эпигенетические особенности опухолей ободочной кишки и открывают перспективы для разработки новых терапевтических агентов и схем лечения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ALDH1 – альдегиддегидрогеназа 1 типа, маркер опухолевых стволовых клеток

CD133 (проминин-1) – гликопротеин, член трансмембранных гликопротеинов, маркер опухолевых стволовых клеток

CD44 – интегральный клеточный гликопротеин, играющий важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции, маркер опухолевых стволовых клеток

EpCAM – молекула клеточной адгезии эпителия (CD326)

ERM – белки эзрина, радиксина и мозина

Gli1/2 - транскрипционные факторы, известные как ассоциированные с глиомами онкогены

Hedgehog – сигнальный путь, регулирующий дифференцировку клеток

IFN- γ – интерферон гамма, растворимый цитокин, являющийся членом класса интерферонов II типа

IL-6 – интерлейкин 6, провоспалительный цитокин

MHC – главный комплекс гистосовместимости

miR – микроРНК, малые некодирующие молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов

NF- κ B - транскрипционный фактор, контролирующий экспрессию генов апоптоза, клеточного цикла и иммунного ответа.

PD-1 – мембранный белок, рецептор программируемой клеточной гибели 1, играет роль в клеточной дифференцировке иммунных клеток

PD-L1 – мембранный белок, лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1

PTCH - белок (protein patched homolog 1) семейства patched, кодируется геном PTCH1 и выполняет функцию рецептора.

SMO - рецептор smothened, является компонентом сигнального пути Hedgehog.

SUFU – suppressor of fused homolog, белок, кодируемый геном SUFU и играющий роль ненативного регулятора сигнального пути Hedgehog

TNF- α – фактор некроза опухоли

Treg – регуляторные Т-лимфоциты

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

ZEB1 – транскрипционный фактор, маркер эпителиально-мезенхимального перехода

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

КРР – колоректальный рак

ММП - матричные металлопротеиназы

ОСК - опухолевые стволовые клетки

ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови / О.И. Кит, И.А. Новикова, А.В. Бахтин, Е.А. Никипелова, Ю.С. Шатова, В.М. Габараева, О.В. Нистратова // Международный журнал экспериментального образования. - 2013. - № 11-2. - С. 37-39.

2. Local cell-mediated immunity in stage III and IV colon cancer / O.I. Kit, E.A. Nikipelova, E.Yu. Zlatnik, A.V. Shaposhnikov, I.A. Novikova, R.E. Tolmakh // 2014 ASCO Annual Meeting / Journal of clinical oncology 32, 2014 (suppl; abstr e22097) - DOI: 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.e22097.

3. Probability of detection of circulating tumor cells in colorectal cancer stage III-IV / E.A. Nikipelova, O.I. Kit, I.A. Novikova, A.Yu. Maksimov, A.V. Bakhtin, O.V. Nistratova, E.P. Ulianova, V. Anapalian // 2014 ASCO Annual Meeting / Journal of clinical oncology 32, 2014 (suppl; abstr e22035) - DOI: 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.e22035.

4. Циркулирующие опухолевые клетки как высокоспецифичный прогностический фактор. Обзор литературы / О.И. Кит, И.А. Новикова, Е.А. Никипелова, О.В. Нистратова, А.В. Бахтин, О.В. Селютина, Е.Н. Черникова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2014. - № 12-2. - С. 252-257.

5. Effect of circulating tumor cells (CTCs) on metastatic progression in colorectal cancer / Yu. Gevorkyan, O.I. Kit, I.A. Novikova, N. Soldatkina, A.V. Bakhtin, P.B. Shulikov, A.G. Milakin, V. Kolesnikov, S.A. Ilchenko // 2015 ASCO Annual Meeting / Journal of clinical oncology 33, 2015 (suppl; abstr e22026).

6. Experience of detection of circulating tumor cells (CTCs) in patients with epithelial tumors / I.A. Novikova, O.I. Kit, A.V. Bakhtin, A.Yu. Maksimov, E.N. Chernikova, R. Isaeva, O.N. Selyutina, E.P. Ulianova, D.A. Shvyrev // 2015 ASCO Annual Meeting / Journal of clinical oncology 33, 2015 (suppl; abstr e22017).

7. Local level of CD 44+ cells in colon cancer / E.A. Nikipelova, O.I. Kit, E.Yu. Zlatnik, I.A. Novikova, A.V. Shaposhnikov, R.E. Tolmakh // 2015 ASCO Annual Meeting / Journal of clinical oncology. 33, 2015 (suppl; abstr e22095).

8. Исследование уровня ЦОК при эпителиальных опухолях различных локализаций / О.И. Кит, И.А. Новикова, О.Н. Селютина, М.Н. Дурицкий, В.А. Донцов, Е.Н. Черникова, Н.Ю. Саманева, О.В. Нистратова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2015. - № 12-5. - С. 817-820.

9. Прогностическое значение циркулирующих опухолевых клеток при метастатическом колоректальном раке / О.И. Кит, Ю.А. Геворкян, Н.В. Солдаткина, И.А. Новикова, П.Б. Шуликов, Ф.Р. Джандигова, А.Г. Милакин // Академический журнал Западной Сибири. - 2015. - Т.11. - № 5 (60). - С. 75.

10. Прогностическое значение циркулирующих опухолевых клеток при метастатическом колоректальном раке / О.И. Кит, Ю.А. Геворкян, Н.В. Солдаткина, И.А. Новикова, П.Б. Шуликов // I Российский онкологический научно-образовательный форум с международным участием «Белые Ночи – 2015»: Сборник тезисов. – Москва, 2015. - С. 452-453.

11. Анализ иммунного статуса больных колоректальным раком после различных вариантов оперативного вмешательства / В.Е. Колесников, О.И. Кит, Е.Ю. Златник, И.А. Новикова, А.О. Гранкина, Ю.А. Геворкян, А.Ю. Максимов // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. - № 6. - С. 153. - Режим доступа: URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25733>.

12. Ассоциация между наличием KRAS-мутаций в опухоли и количеством циркулирующих опухолевых клеток у больных колоректальным раком / О.И. Кит, О.В. Нистратова, И.А. Новикова, Д.И. Водолажский, Е.А. Никипелова, Е.М. Непомнящая, Е.П. Ульянова, Е.Н. Олейникова // *Кубанский научный медицинский вестник*. - 2016. - № 1 (156). - С. 70-73. - DOI: <http://dx.doi.org/10.25207/1608-6228-2016-1-70-73>.

13. Колоканцерогенез: онкоиммунология локальных изменений / Е.А. Никипелова, О.И. Кит, А.В. Шапошников, Е.Ю. Златник, И.А. Новикова. // *Злокачественные опухоли*. - 2016. - № 4 - Спецвыпуск 1 – С. 81-86.

14. Параллели между циркулирующими опухолевыми клетками и некоторыми морфо-генетическими показателями при колоректальном раке / Е.М. Непомнящая, Е.А. Никипелова, О.В. Нистратова, И.А. Новикова, И.Д. Водолажский, Е.П. Ульянова // *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. - 2016. - № 2. - С. 64-69.

15. Современные возможности молекулярной онкологии: циркулирующие опухолевые клетки / О.И. Кит, Ю.А. Геворкян, Н.В. Солдаткина, И.А. Новикова // *Молекулярная медицина*. - 2016. - Т.14. - № 2. - С. 8-12.

16. Циркулирующие опухолевые клетки и некоторые морфо-иммуногистохимические показатели при колоректальном раке / Е.М. Непомнящая, О.И. Кит, О.В. Нистратова, И.А. Новикова, Е.А. Никипелова, А.В. Бахтин, Е.П. Ульянова, Ж.И. Вострикова, О.Н. Селютина // *Современные проблемы науки и образования*. - 2016. - № 2-0. - С. 140. - Режим доступа: URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24378>.

17. Некоторые молекулярно-биологические особенности метастатического колоректального рака / О.И. Кит, Ю.А. Геворкян, Н.В. Солдаткина, И.А. Новикова, Д.И. Водолажский, П.Б. Шуликов, Д.А. Харагезов, С.А. Ильченко, А.В. Дашков, С.И. Полуэктов // *Современные проблемы науки и образования*. - 2017. - № 3. - С. 3 - Режим доступа: URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26362>.

18. Циркулирующие опухолевые клетки и клиничко-морфологические факторы прогноза при эпителиальных опухолях различных локализаций / И.А. Новикова, О.И. Кит, А.О. Гранкина, О.Г. Шульгина, Е.П. Ульянова, Ю.С. Шатова, Н.В. Солдаткина, П.Б. Шуликов // *Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017»*, 23–24 июня 2017. г. Санкт-Петербург - С. 192.

19. Циркулирующие опухолевые клетки как показатель лимфо-гематогенного метастазирования при колоректальном раке / О.И. Кит, И.А. Новикова, Ю.А. Геворкян, Н.В. Солдаткина, О.Г. Шульгина, П.Б. Шуликов // *Материалы XXI российского онкологического конгресса*, Москва, 14-16 ноября 2017 / *Злокачественные опухоли*. - 2017. - Т. 7. - № 3S. - С. 143-144.

20. Циркулирующие опухолевые клетки при колоректальном раке / О.И. Кит, П.Б. Шуликов, И.А. Новикова, А. Гранкина, В.Е. Колесников, Ю.А. Геворкян, Н.В. Солдаткина // Врач. - 2017. - № 5. - С. 42-45.

21. Cancer stem cells in colorectal tumors of various extents. / E.Yu. Zlatnik, O.I. Kit, I.A. Novikova, E.P. Ulianova, O.G. Shulgina, P.B. Shulikov, A.G. Milakin, S. Poluektov, D.O. Kaymakchi, F.N. Grechkin // 2018 ASCO Annual Meeting (June 1-5, 2018, USA, Chicago) / Journal of clinical oncology 36, 2018 (suppl; abstr e15659).

22. Возможная роль раковых стволовых клеток в процессах метастазирования колоректального рака / Е.Ю. Златник, Е.И. Триандофилиди, П.Б. Шуликов, О.Г. Шульгина, А.Б. Сагакянц, Е.П. Ульянова, И.А. Новикова, О.И. Кит // Материалы IV Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2018»: Тезисы. - Автономная некоммерческая научно-медицинская организация «Вопросы онкологии», 2018. - С. 144.

23. Возможная роль стволовых опухолевых клеток в процессах метастазирования колоректального рака / Е.Ю. Златник, О.И. Кит, И.А. Новикова, Е.П. Ульянова, А.Б. Сагакянц, М.А. Теплякова, Г.Ю. Егоров, Г.М. Чупанов, Е.Н. Черникова // Современные проблемы науки и образования. - 2018. - № 6. - С. 28. - Режим доступа: URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28217>.

24. Стволовые опухолевые клетки различного иммунофенотипа при колоректальном раке в зависимости от распространенности / Е.П. Ульянова, Е.Ю. Златник, И.А. Новикова, О.Г. Шульгина, П.Б. Шуликов, С.Г. Власов // Материалы X Съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии памяти акад. Н.Н. Трапезникова. Сочи, 23-25 апреля 2018г / Евразийский онкологический журнал. - 2018. - Т. 6. - С. 81.

25. Циркулирующие опухолевые клетки и их связь с клинимоρφологическими характеристиками колоректального рака / О.И. Кит, В.Е. Колесников, Р.Е. Толмах, И.А. Новикова, О.Г. Шульгина, Е.Ф. Комарова, А.А. Демидова // Казанский медицинский журнал. - 2018. - Т. 99. - № 1. - С. 5-9. - DOI: 10.17816/KMJ2018-005.

26. Показатели иммунного статуса у больных колоректальным раком различной распространенности при наличии и отсутствии циркулирующих опухолевых клеток / Е.Ю. Златник, А.О. Ситковская, И.А. Новикова, Е.С. Бондаренко // Тезисы V Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2019», Санкт-Петербург, 20-23 июня 2019. – СПб.: АНМО «Вопросы онкологии», 2019. – С. 206.

27. Differential expression of micro-RNA in tumor and non-tumor tissues of patients with colorectal cancer / I.A. Novikova, N.N. Timoshkina, O.I. Kit, S.I. Poluektov, A.V. Dashkov, D. Haragezov, R.E. Tolmakh, E.N. Kolesnikov, V.A. Dontsov, D.S. Petrov, N.V. Soldatkina, Yu.A. Gevorkyan, D.S. Kutilin // 2020 ASCO Virtual Scientific Program (May 29-31) / Journal of clinical oncology 38, 2020 (suppl; abstr e13516) - DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e13516.

28. Features of iso-miR expression in colon tumor tissue / N.N. Timoshkina, D.S. Kutilin, I.A. Novikova, S.I. Poluektov, R.E. Tolmakh, A.V. Dashkov, D. Haragezov, E.N. Kolesnikov, V.A. Dontsov, D.S. Petrov, N.V. Soldatkina, O.I. Kit // 2020 ASCO

Virtual Scientific Program (May 29-31) / Journal of clinical oncology 38, 2020 (suppl; abstr e13518) - DOI:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e13518.

29. Presence of circulating tumor cells is more significant than tumor stage in characterizing cellular local immunity in colorectal cancer / A.O. Sitkovskaya, O.I. Kit, E.Yu. Zlatnik, I.A. Novikova, A.B. Sagakyants, E.P. Ulianova, O.G. Shulgina, V.E. Kolesnikov, N.B. Oganyan, V.K. Pavlov, T.S. Karasev, E.A. Dzhenkova, A.V. Shaposhnikov, A.V. Snezhko, R.E. Tolmakh, Yu.A. Fomenko, D.S. Petrov // 2020 ASCO Virtual Scientific Program (May 29-31) / Journal of clinical oncology 38, 2020 (suppl; abstr e16073) - DOI:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e16073.

30. Колоректальный рак: циркулирующие опухолевые клетки и клеточный локальный иммунитет / А.О. Ситковская, Е.Ю. Златник, И.А. Новикова, Е.П. Ульянова, О.Г. Шульгина, О.И. Кит // Тезисы XI Съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии. Казань, 23-25 апреля 2020. / Евразийский онкологический журнал. - 2020. - Т.8. - № 2. - Приложение - С. 851-852

31. Корреляционный анализ показателей локального иммунитета и эпителиально-мезенхимального перехода больных колоректальным раком в зависимости от уровня циркулирующих опухолевых клеток / А.О. Ситковская, И.А. Новикова, Е.Ю. Златник, Е.П. Ульянова, О.Г. Шульгина, В.Е. Колесников, П.Н. Габричидзе, В.А. Донцов, С.С. Мезенцев // Современные проблемы науки и образования. - 2020. - № 5. - С. 90 - Режим доступа: URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=30107>.

32. Наличие циркулирующих опухолевых клеток является более значимым, чем стадия, для характеристики клеточного локального иммунитета при колоректальном раке / А.О. Ситковская, И.А. Новикова, Е.Ю. Златник, Е.П. Ульянова, О.Г. Шульгина, О.И. Кит // Материалы Третьего международного форума онкологии и радиологии, Москва 21-25 сентября, 2020. - С. 149-150.

33. **Новикова, И.А. Дифференциальная экспрессия микроРНК в опухолевых и нормальных тканях толстой кишки / И.А. Новикова, Н.Н. Тимошкина, Д.С. Кутилин // Якутский медицинский журнал. - 2020. - № 4 (72). - С. 74-82. – DOI: 10.25789/УМЖ.2020.72.19.**

34. **Показатели клеточного иммунитета у больных колоректальным раком разных стадий при наличии и отсутствии циркулирующих опухолевых клеток / Е.Ю. Златник, А.О. Ситковская, И.А. Новикова, Е.С. Бондаренко, А.Б. Сагакянц // Сибирский онкологический журнал. - 2020. - Т. 19. - № 4. - С. 94-98. - DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-4-94-98.**

35. Association between cancer stem cell marker ALDH1 and clinical and morphological factors of colorectal cancer prognosis / E.A. Dzhenkova, I.A. Novikova, O.I. Kit, E.Yu. Zlatnik, E.P. Ulianova, A.O. Sitkovskaya, O.G. Shulgina, Yu.A. Gevorkyan, N.V. Soldatkina, V.E. Kolesnikov, M.K. Aleksandrovich, A.V. Dashkov, S.I. Poluektov, D.O. Kaymakchi, E.A. Mirzoyan, V.K. Pavlov, M.A. Vereshchak, O.V. Katelnitskaya, D.A. Savchenko, R.E. Tolmakh // 2021 ASCO Annual Meeting / Journal of clinical oncology 39, 2021 (suppl 15; abstr 3522) - DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.3522.

36. Circulation of tumor cells to destroy correlations in immune system of colorectal cancer patients / A.O. Sitkovskaya, E.Yu. Zlatnik, O.I. Kit, I.A. Novikova, E.S. Bondarenko, Yu.A. Gevorkyan, N.V. Soldatkina, V.E. Kolesnikov, M.K.

Aleksandrovich, A.V. Dashkov, S.I. Poluektov, D.O. Kaymakchi, E.A. Mirzoyan, V.K. Pavlov, M.A. Vereshchak, O.V. Katelnitskaya, D.A. Savchenko, R.E. Tolmakh // 2021 ASCO Annual Meeting / Journal of clinical oncology 39, 2021 (suppl 15; abstr e15508) - DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e15508.

37. Peripheral blood levels of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and circulating tumor cells (CTCs) in patients with colorectal cancer / I.A. Novikova, O.I. Kit, E.Yu. Zlatnik, A.O. Sitkovskaya, O.G. Shulgina, E.P. Ulianova, Yu.A. Gevorkyan, N.V. Soldatkina, V.E. Kolesnikov, M.K. Aleksandrovich, A.V. Dashkov, S.I. Poluektov, D.O. Kaymakchi, E.A. Mirzoyan, V.K. Pavlov, E.A. Dzhenkova, A.V. Shaposhnikov, M.A. Vereshchak, O.V. Katelnitskaya, D.A. Savchenko // 2021 ASCO Annual Meeting / Journal of clinical oncology 39, 2021 (suppl 15; abstr e15510) - DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e15510.

38. Relationship between circulating tumor cells and ZEB1 expression in tumor cells in colorectal cancer / I.A. Novikova, O.I. Kit, E.Yu. Zlatnik, E.P. Ulianova, A.B. Sagakyants, A.O. Sitkovskaya, O.G. Shulgina, Yu.A. Gevorkyan, N.V. Soldatkina, V.E. Kolesnikov, M.K. Aleksandrovich, A.V. Dashkov, S.I. Poluektov, D.O. Kaymakchi, E.A. Mirzoyan, V.K. Pavlov, E.A. Dzhenkova, A.V. Shaposhnikov, M.A. Vereshchak, O.V. Katelnitskaya // 2021 ASCO Annual Meeting / Journal of clinical oncology 39, 2021 (suppl 15; abstr e15509) - DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e15509.

39. ZEB1 expression in different stages of colorectal cancer / E.M. Nepomnyashchaya, E.P. Ulianova, I.A. Novikova, A.B. Sagakyants, et al. // 2021 ASCO Annual Meeting - Journal of clinical oncology 39, 2021 (suppl 15; abstr e15526) - DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e15526.

40. Новикова, И.А. Особенности экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода – Е-кадгерина и ZEB1 – при колоректальном раке / И.А. Новикова, О.И. Кит // Исследования и практика в медицине. – 2021. - № 8 (2). – С. 23-33. – DOI: <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2021-8-2-2>

41. Factors of innate immunity in patients with colon cancer with different levels of circulating tumor cells / E.Yu. Zlatnik, I.A. Novikova, E.S. Bondarenko, Yu.A. Gevorkyan, N.V. Soldatkina, D.S. Petrov, V.E. Kolesnikov, D.A. Savchenko, R.E. Tolmakh, A.V. Dashkov, O.V. Katelnitskaya, S.A. Ilchenko, E.A. Dzhenkova, O.I. Kit, A.V. Snezhko, E.N. Kolesnikov, A.Yu. Maksimov, A.V. Shaposhnikov // ASCO Annual Meeting 2022 (3-7 июня 2022, Чикаго, США, онлайн) / Journal of clinical oncology 40, 2022 (suppl 16; abstr e15501) - DOI: 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.e15501.

42. Immunological microenvironment in colon cancer patients with different phenotypes of cancer stem cells / E.Yu. Zlatnik, I.A. Novikova, E.P. Ulianova, E.S. Bondarenko, Yu.A. Gevorkyan, N.V. Soldatkina, D.S. Petrov, V.E. Kolesnikov, D.A. Savchenko, R.E. Tolmakh, A.V. Dashkov, O.V. Katelnitskaya, S.A. Ilchenko, E.A. Dzhenkova, A.V. Snezhko, E.N. Kolesnikov, A.V. Shaposhnikov, O.I. Kit, A.Yu. Maksimov // ASCO Annual Meeting 2022 (3-7 июня 2022, Чикаго, США, онлайн) / Journal of clinical oncology 40, 2022 (suppl 16; abstr e15503) - DOI: 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.e15503.

43. MicroRNA expression in tissue and circulating tumor cells of patients with stage II-IV colon cancer / I.A. Novikova, E.Yu. Zlatnik, D.Yu. Gvaldin, A.A. Pushkin, Yu.A. Gevorkyan, N.V. Soldatkina, D.S. Petrov, V.E. Kolesnikov, D.A. Savchenko, R.E. Tolmakh, A.V. Dashkov, O.V. Katelnitskaya, S.A. Ilchenko, O.Yu. Kaymakchi,

O.I. Kit, E.A. Dzhenkova, E.N. Kolesnikov, A.Yu. Maksimov, A.V. Shaposhnikov // ASCO Annual Meeting 2022 (3-7 июня 2022, Чикаго, США, онлайн) / Journal of clinical oncology 40, 2022 (suppl 16; abstr e15502) - DOI: 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.e15502.

44. Иммунологическое микроокружение у больных раком ободочной кишки с различными фенотипическими вариантами опухолевых стволовых клеток / Е.Ю. Златник, И.А. Новикова, Е.П. Ульянова, Е.С. Бондаренко // Тезисы XIII Съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии 25-27 апреля 2022 г. / Евразийский онкологический журнал. - 2022. - Т. 10. - № 2. - С. 72-73.

45. Локальный клеточный иммунитет при колоректальном раке в зависимости от локализации опухоли / О.И. Кит, Е.А. Дженкова, И.А. Новикова, А.Б. Сагакянц, Э.А. Мирзоян, Е.Ю. Златник, Е.С. Бондаренко, О.Г. Шульгина, Е.И. Золотарева, Е.П. Ульянова, Д.А. Харагезов, Г.В. Каминский, С.А. Малинин, Л.Х. Чалхакян, Д.А. Савченко, А.Г. Милакин // Тезисы XIII Съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии 25-27 апреля 2022 г. / Евразийский онкологический журнал. - 2022. - Т. 10. - № 2. - С. 82.

46. **Общая выживаемость больных раком ободочной кишки с различным уровнем циркулирующих опухолевых клеток и возможности повышения его прогностической значимости** / О.И. Кит, Е.Ю. Златник, И.А. Новикова, Е.П. Ульянова, А.А. Демидова, Е.Н. Колесников, Ю.А. Геворкян, Н.В. Солдаткина, А.В. Снежко // Сибирский онкологический журнал. – 2022. – Т. 21. - № 4. – С. 32-39. - DOI: <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2022-21-4-32-39>.

47. Характеристика системного и локального иммунитета и стволовых опухолевых клеток у больных колоректальным раком с различной распространенностью, динамикой и прогнозом / Е.Ю. Златник, И.А. Новикова, Е.С. Бондаренко, Е.П. Ульянова, А.О. Ситковская // Медицинская иммунология. - 2022. - Т. 24. - № 1. - С. 121-134. - DOI: 10.15789/1563-0625-COL-2352.

48. Экспрессия микроРНК в тканевых и циркулирующих опухолевых клетках больных раком ободочной кишки II–IV стадий / Е.Ю. Златник, И.А. Новикова, Д.Ю. Гвалдин, А.А. Пушкин // Тезисы XIII Съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии 25-27 апреля 2022 г. / Евразийский онкологический журнал. - 2022. - Т. 10. - № 2. - С.71-72

Патенты на изобретения

1. Пат. 2613142 Российская Федерация, МПК G01N. Способ прогнозирования метастазирования при раке ободочной кишки [текст] / Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Новикова И.А., Водолажский Д.И., Шуликов П.Б.; заявитель и патентообладатель Ростовский научно-исследовательский онкологический институт. (RU). - № 2015150450; заявл. 24.11.2015; опубл. 15.03.2017, Бюл. №8. – 8 с.

2. Пат. 2772207 Российская Федерация, МПК G01N. Способ прогнозирования риска неблагоприятного исхода рака ободочной кишки и ректосигмоидного отдела [текст] / Кит О.И., Новикова И.А., Златник Е.Ю., Демидова А.А.; заявитель и патентообладатель Национальный медицинский исследовательский центр онкологии. (RU). - № 2021130402; заявл. 19.10.2021; опубл. 18.05.2022, Бюл. №14. – 9 с.: илл.