

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**Новикова Инна Арнольдовна**

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

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

**Научный консультант:**  
доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАН  
**Кит О.И.**

**Научный консультант:**  
доктор медицинских наук,  
профессор  
**Златник Е.Ю.**

Ростов-на-Дону – 2022 г.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	6
Глава 1. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ, ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА (обзор литературы) .....	22
1.1. Клинико-эпидемиологические особенности колоректального рака .....	22
1.2. Молекулярно-генетические характеристики колоректального рака .....	24
1.2.1. Молекулярные подтипы колоректального рака .....	26
1.2.2. Экспрессия микроРНК в ткани опухоли и их прогностическая значимость у больных колоректальным раком .....	28
1.3. Прогрессирование опухолевого процесса. Модели метастазирования.....	31
1.3.1. Внутриопухолевая гетерогенность. Опухолевые стволовые клетки и теории их биологического происхождения .....	33
1.3.2. Ниша стволовых опухолевых клеток. Внутриопухолевое микроокружение .....	38
1.4. Эпителиально-мезенхимальный переход .....	45
1.5. Циркулирующие опухолевые клетки периферической крови. Биологическая роль циркулирующих опухолевых клеток в метастатическом каскаде .....	46
1.5.1. Молекулярные и фенотипические характеристики циркулирующих опухолевых клеток .....	51
1.5.2. Взаимодействие циркулирующих опухолевых клеток и иммунокомпетентных клеток крови .....	53
1.5.3. Прогностическая значимость циркулирующих опухолевых клеток .....	56
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	62
2.1. Материал исследования .....	62
2.2. Клинико-морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика больных раком ободочной кишки .....	64
2.3. Методы исследования .....	73

Глава 3. ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ .....	84
3.1. Частота выявления циркулирующих опухолевых клеток у больных раком ободочной кишки и их связь с клинико-морфологическими факторами прогноза .....	84
3.2. Влияние мутации в гене <i>KRAS</i> и уровня циркулирующих опухолевых клеток на прогрессирование рака ободочной кишки .....	93
Глава 4. ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ НАЛИЧИИ И ОТСУТСТВИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ .....	98
4.1. Характеристика факторов врожденного иммунитета больных раком ободочной кишки с различными стадиями заболевания и уровнем циркулирующих опухолевых клеток .....	98
4.1.1. НК-клеточное звено у больных раком ободочной кишки с различными стадиями заболевания и различным уровнем циркулирующих опухолевых клеток .....	100
4.1.2. Фагоцитарное звено у больных раком ободочной кишки с различными стадиями заболевания и различным уровнем циркулирующих опухолевых клеток .....	111
4.2. Характеристика факторов адаптивного иммунитета больных раком ободочной кишки с различными стадиями заболевания и уровнем циркулирующих опухолевых клеток .....	117
4.3. Характеристика сывороточных цитокинов у больных раком ободочной кишки различных стадий и уровнем циркулирующих опухолевых клеток .....	125
Глава 5. ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В ОПУХОЛЯХ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ (КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ) .....	129

5.1. Анализ экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток и эпителиально-мезенхимального перехода .....	129
5.2. Характеристика экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток и эпителиально-мезенхимального перехода в ткани опухоли ободочной кишки при различном уровне циркулирующих опухолевых клеток .....	162
Глава 6. ПОКАЗАТЕЛИ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И ХАРАКТЕРИСТИКА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ .....	164
Глава 7. ПРОФИЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОРНК И ИХ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ В ОПУХОЛЯХ И В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ II-IV СТАДИЙ .....	173
7.1. Отбор пула микроРНК, ассоциированного с раком ободочной кишки.....	174
7.2. Профиль транскрипционной активности микроРНК в опухолевой ткани больных раком ободочной кишки .....	179
7.3. Профиль транскрипционной активности микроРНК в изолированных циркулирующих опухолевых клетках .....	181
7.4. Биоинформационный анализ участия паттерна микроРНК в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода и стволовклеточного опухолевого потенциала .....	183
7.5. Уровень относительной экспрессии генов-мишеней микроРНК в опухолевой ткани больных раком ободочной кишки .....	189
Глава 8. ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК, СИСТЕМНЫХ И ЛОКАЛЬНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ .....	198



8.1. Общая выживаемость и выживаемость, свободная от метастазирования, у больных раком ободочной кишки с учетом исходного клинического статуса пациентов .....	198
8.2. Влияние профиля экспрессии микроРНК, генов-мишеней опухолевых клеток, факторов локального и системного иммунитета, опухолевых стволовых клеток и циркулирующих опухолевых клеток на общую выживаемость больных раком ободочной кишки .....	205
8.3. Прогностическая значимость экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток, эпителиально-мезенхимального перехода, локального иммунитета, молекул главного комплекса гистосовместимости и количества циркулирующих опухолевых клеток для оценки риска метастазирования у больных раком ободочной кишки после операции .....	217
8.4. Модели прогноза летального исхода у больных раком ободочной кишки ...	221
8.5. Модели прогноза отдаленного метастазирования и сроков его развития у больных раком ободочной кишки.....	235
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	241
ВЫВОДЫ .....	277
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	281
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ .....	284
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	286
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	288

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность 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 (Chiorean 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 C. 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 (Acharya 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, секретируя 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 (Campromenosi 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 клинко-морфологическое 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 кровоток 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 исследования**

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

### **Задачи исследования**

1. Оценить частоту встречаемости ЦОК у больных раком ободочной кишки в зависимости от различных клинико-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 клинико-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-, НК- 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 стволовоклеточного 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*, *FNI*, *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**

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+, НК-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 НК-клеточном и фагоцитарном звеньях врожденного иммунитета и Т-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 стволовклеточного опухолевого потенциала.

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

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Экспрессия маркеров ОСК и ЭМП в опухоли, количество ЦОК в периферической крови сопряжены с клиничко-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 диссертации паспорту научной специальности**

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

### **Объем и структура 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.

### **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.

# ГЛАВА 1. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ, ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА (обзор литературы)

## 1.1. Клинико-эпидемиологические особенности колоректального рака

КРР является третьим наиболее распространенным раком в мире, с общей заболеваемостью более миллиона случаев в год (Siegel R.L. et al., 2019). В 2020 году зарегистрировано более 1,9 миллиона новых случаев КРР и 935 тысяч летальных исходов от него. В целом КРР занимает третье место по заболеваемости и второе место по смертности (Sung H. et al., 2021). Приблизительно 50% больных имеют скрытые или обнаруживаемые отдаленные метастазы на момент постановки диагноза, что объясняет высокую смертность, связанную с этим заболеванием (Bray F. et al., 2018). Распространенность рака толстой кишки в России в 2019 году составила 275,7 на 100 000 населения, при этом суммарно, около половины всех случаев выявлено в III и IV стадиях заболевания (22,5% и 26,2% соответственно), а летальность больных в течение года с момента установления диагноза в 2019 году составила 24,1% (Каприн А.Д. и соавт., 2020)

Заболеваемость КРР увеличивается с возрастом, удваиваясь каждые 5 лет, начиная с 20 лет, после 60 лет рост заболеваемости менее значительный (Bailey C.E. et al., 2015; Stoffel E.M. et al., 2017). До 10% всех КРР выявляются в возрасте моложе 50 лет и около трех четвертей из них диагностируются в возрасте 40–49 лет (Holowatyj A.N. et al., 2016; Eusebi L.H. et al., 2017; Siegel R.L. et al., 2017). По прогнозам, с 2015 по 2030 годы заболеваемость КРР увеличится на 90% для больных в возрасте 20–34 лет и на 27,7% для 35–39 лет (Bailey C.E. et al., 2015).

КРР можно рассматривать как маркер социально-экономического развития, и в странах, переживающих серьезный переходный период, заболеваемость имеет тенденцию к равномерному росту (Bray F. et al., 2015; Fidler M.M. et al., 2016). Уровень заболеваемости неуклонно повышается во многих странах Восточной Европы, Юго-Восточной и Центральной Азии, Южной Америки (Arnold M. et al.,

2020). Увеличение заболеваемости КРР отражает изменения в образе жизни и питании, т.е. сдвиг в сторону увеличения потребления продуктов животного происхождения и малоподвижного образа жизни, ведущий к снижению физической активности и избыточной массе тела, которые независимо связаны с риском развития КРР (Siegel R.L. et al., 2020). К дополнительным факторам риска относят чрезмерное употребление алкоголя, курение и потребление красного или обработанного мяса. Адекватное потребление цельного зерна, клетчатки и молочных продуктов сокращают риск заболеваемости (Clinton S.K. et al., 2019). Снижение заболеваемости КРР в некоторых странах объясняется выбором более здорового образа жизни (например, отказ от курения) и повышением внимания к скринингу (Arnold M. et al., 2020).

В последние годы в литературе уделяется большое внимание как геному опухоли, так и состоянию метаболома и микробиома макроорганизма как факторам, влияющим на канцерогенез и опухолевый рост, которые тесно связаны с иммунной системой, в частности, с ее локальным компартментом (Gagnière J., et al., 2016). Известно, что нормальная (комменсальная) микрофлора стимулирует адекватное становление и развитие локального и системного иммунитета (Tlaskalova-Hogenova H. et al., 2005), а целый ряд метаболитов кишечного микробиома обладает либо туморогенными, либо противоопухолевыми свойствами (Харченко Е.П., Соловьев И.А., 2017; Meng C. et al., 2018). Как позитивное, так и негативное действие микробиоты опосредуется через продукты метаболизма бактерий, которые выступают в качестве молекулярных медиаторов, осуществляют взаимодействие между микро- и макроорганизмом через рецепторы, представленные в толстой кишке (Багиров Н.С. и соавт., 2018; Lundgren P. et al., 2020), влияя на взаимосвязанные процессы воспаления и канцерогенеза (Ou B. et al., 2016; Харченко Е.П., Соловьев И.А., 2017).

Основной стратегией лечения КРР является хирургическое лечение и химиотерапия. Достижения в области молекулярной диагностики и открытие биомаркеров привело к возникновению концепции «одного гена, одного препарата», применимой и в лечении больных КРР (Dienstmann R. et al., 2017).

Применение таргетных препаратов, а также иммунотерапия с помощью ингибиторов контрольных точек является современным и перспективным направлением в лечении КРР (Xie Y.H. et al., 2020; Cohen R. et al., 2020; Abakushina E.V., et al., 2021; Абакушина Е.В. и др., 2019). Первичная профилактика остается ключевым направлением снижения заболеваемости КРР, а скрининг с использованием доступных и мало инвазивных методов представляется оправданным (Navarro M. et al., 2017).

## 1.2. Молекулярно-генетические характеристики колоректального рака

Поэтапное развитие КРР от образования аденомы до карциномы путем накопления генетических и эпигенетических событий было первоначально описано Vogelstein и соавт. (Vogelstein B. et al., 1988). Рак является генетически детерминированным заболеванием, зависящим от последовательного накопления соматических мутаций, где для КРР наиболее важными являются APC, MAP-киназа, трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ) и опухолевый белок 53 (TP53) (Vogelstein B. et al., 2015; Simanshu D.K. et al., 2017).

Одной из ведущих причин опухолевой трансформации является постоянная активация сигнального пути рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (Baranovskaya S. et al., 2009). Сигналы, передаваемые при активации рецептора EGFR по RAS/MAPK-зависимому сигнальному пути, влияют на пролиферативную активность опухолевых клеток, а также их способность к дифференцировке, метастазированию и инвазии. Одной из причин подобной активации при КРР являются мутации в других генах сигнального пути, а именно в генах семейства *RAS* и *RAF*. Белки RAS (KRAS, HRAS, NRAS) часто мутируют в различных карциномах, включая КРР, где KRAS мутации выявляются в 42% случаев и NRAS в 9% (Kasthuber E.R. et al., 2017). Мутации в генах *RAS*-каскада при метастатическом КРР обнаруживаются с высокой частотой 35-60% (Garde Noguera J. et al., 2017). При этом, они, как правило, локализованы в специфических областях генов, например, в 12-ом и 13-ом кодонах гена *KRAS* и 61-ом кодоне гена *NRAS*. При КРР мутации в гене *KRAS* сохраняются в течение

всего процесса канцерогенеза, присутствуя как в первичной опухоли, так и в ее метастазах (Кит О.И. и соавт., 2015).

В настоящее время расширенное тестирование *RAS* (экзоны 2 и 3 *KRAS* и экзоны 2,3 и 4 *NRAS*) рассматривается как стандарт диагностики при назначении анти-EGFR терапии на поздних стадиях КРР (Van Cutsem E. et al., 2016). Соматические мутации при КРР в гене *NRAS* наблюдаются в 2-6% случаев, в основном, в 61-м кодоне 3-го экзона, а также в 12-м и 13-м кодонах 2-го экзона (Garde Noguera J. et al., 2017). Как правило, наличие мутаций в *KRAS*, которые более распространены при КРР, исключает вероятность появления мутации в гене *NRAS*. Как и в случае *KRAS*, активация гена *NRAS* за счет мутации приводит к потере эффекта ингибирования EGFR моноклональными антителам.

*TP53* является одним из наиболее часто мутирующих генов-супрессоров при раке (Kasthuber E.R. et al., 2017).

Мутация *BRAF*<sup>V600</sup> присутствует примерно в 8% случаев на ранних и поздних стадиях КРР и представляет собой неблагоприятный прогностический признак (Venderbosch S. et al., 2014). По другим данным, активирующие мутации в гене *BRAF* встречаются в 10% случаев КРР и являются взаимоисключающими с мутациями в гене *KRAS* (Кит О.И., Водолажский Д.И., 2015). Мутантный ген *BRAF* определяет устойчивость опухоли к анти-EGFR терапии и чувствительность к ингибиторам RAF. При этом наличие мутации в гене *BRAF* ассоциируется с неблагоприятным прогнозом: с более агрессивным типом опухоли, высоким метастатическим потенциалом, низкой выживаемостью и более ранним прогрессированием заболевания, что позволяет использовать мутантный статус данного гена в качестве прогностического маркера (Кит О.И. и соавт., 2016; Taieb J. et al, 2019; Molina-Cerrillo J. et al., 2020).

Клинические исследования, направленные на комбинированную блокаду *BRAF*, *EGFR* и *MEK* при КРР с *BRAF*<sup>V600E</sup> мутацией, демонстрируют многообещающие результаты положительного ответа (Van Cutsem E. et al., 2015; Corcoran R.B. et al., 2018). Кроме того, добавление ингибитора *BRAF* вемурафениба к цетуксимабу и иринотекану у этих пациентов улучшает

выживаемость без прогрессирования, подчеркивая необходимость новых подходов в преодолении механизмов резистентности (Kopetz S. et al., 2017).

Около 85% спорадических случаев КРР демонстрируют хромосомную нестабильность (CIN), тогда как 15% - микросателлитную нестабильность (Vogelstein B. et al., 1988). Спорадические опухоли, для которых характерна высокая микросателлитная нестабильность (MSI-H) часто являются правосторонними, низкодифференцированными, муцинозными, ассоциированными с инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL) и характеризуются более высокой частотой мутаций *BRAF* (приблизительно 50%) (Mino P. et al., 2010). Микросателлитно стабильные опухоли (MSS) чаще бывают левосторонними (дистальными) и имеют более высокий уровень мутации *KRAS*. Было установлено, что статус MSI является важным прогностическим маркером КРР, так опухоли MSI-H характеризуются лучшей выживаемостью (стадия I-III) в сравнении с опухолями MSS (Gavin P.G. et al., 2012). Однако при генерализованном процессе показан худший прогноз опухолей MSI-H, что обусловлено мутациями *BRAF* (Tran B. et al., 2011). Продемонстрирована значимость тестирования MSI при КРР, связанная с применением PD-1 (Le D.T. et al., 2015).

Мутационный статус *KRAS* при первичном КРР и метастазах является конкордантным (около 95%), при этом мутационный статус как *KRAS*, так и *BRAF* может оцениваться независимо как при первичном, так и метастатическом КРР (Etienne-Grimaldi M.C. et al., 2008).

### **1.2.1. Молекулярные подтипы колоректального рака**

Для классификации КРР предложены четыре молекулярных подтипа (CMS) с отличительными признаками (Guinney J. et al., 2015; Wang W. et al., 2019). CMS1 подтип включает, MSI опухоли, характеризующиеся гипермутацией, гиперметилированием, высокой частотой мутаций *BRAF*, выраженной лимфоцитарной инфильтрацией CD4+, CD8+ и NK-клетками. Подгруппы CMS2 и CMS4 являются MSS микросателлитно-стабильными с низким уровнем

гиперметилирования генов. Для CMS2 характерна активация Wnt и MYC и более высокая экспрессия онкогенов *EGFR*, *ERBB2*, *IGF-2*, *IRS-2*, *HNF4 $\alpha$* . Опухоли CMS4 демонстрируют повышенную регуляцию генов, связанных с ЭМП, *TGF- $\beta$*  и интегринов, выраженную стромальную инвазию и ангиогенез и коррелирует с худшим прогнозом. Для опухолей CMS3 характерны мутации *KRAS*, активация путей RTK и MAPK, метаболическая дерегуляция (Guinney J. et al., 2015). Тем не менее, в пределах четырех подтипов CMS не выявлено молекулярного события или генетической аберрации, ограниченной только одним подтипом (Guinney J. et al., 2015).

Состав микроокружения отличается между подтипами KPP (Becht E. et al., 2016). Подтипы CMS1 и CMS4 демонстрируют высокий уровень инфильтрирующих иммунных клеток, противоположных по своей функциональной направленности (Roelands J. et al., 2017). CMS1 подтип характеризуется высокой мутационной нагрузкой и уровнем TIL, чувствительностью к ингибиторам контрольных точек (Le D.T. et al., 2015). Большинство опухолей CMS2 и CMS3 подтипов не являются гипермутированными, в их микроокружении отсутствуют TIL, что позволяет предположить их низкую чувствительность к иммунотерапии (Becht E. et al., 2016).

На CMS1 (MSI иммунный подтип) приходится 14%, CMS2 (канонический) – 37%; CMS3 (метаболический) – 13%, и CMS4 (мезенхимальный) – 23%. Опухоли со смешанными признаками (13%) представляют переходный фенотип. Опухоли CMS1 чаще встречаются у женщин и характеризуются правосторонним расположением. И наоборот, опухоли CMS2 в основном левосторонние. Опухоли CMS4, как правило, диагностируются на более поздних стадиях (III и IV) (Guinney J. et al., 2015).

Для опухолей CMS1 характерен благоприятный прогноз при выявлении до прогрессирования заболевания, но низкая выживаемость после рецидива, в сравнении с опухолями MSI с мутированным *BRAF*. Наоборот, опухоли CMS4,

демонстрируют низкую общую и безрецидивную выживаемости. Подтипы CMS2 и CMS3 характеризуются промежуточной выживаемостью (Marisa L. et al., 2017).

Поскольку система идентификации подтипов КРР основана на транскриптомном и геномном анализе, что является сложно воспроизводимым в рутинной клинической практике, в последнее время рассматривается возможность применения классификатора на основе ИГХ анализа тканевых микрочипов с использованием пяти маркеров (*CDX2*, *FRMD6*, *HTR2B*, *ZEB1* и *KER*) (Trinh A. et al., 2017).

### **1.2.2. Экспрессия микроРНК в ткани опухоли и их прогностическая значимость у больных колоректальным раком**

МикроРНК – короткие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов катализируя разрушение мРНК, либо ингибируя трансляцию мРНК в белок. МикроРНК являются эпигенетическими регуляторами, специфичны для определенной ткани и модулируют экспрессию генов путем взаимодействия с комплементарными нуклеотидными последовательностями мРНК-мишеней (Chen B. et al., 2019). Многие микроРНК при КРР по-разному экспрессируются в тканях и биологических жидкостях организма, вносят значительный вклад в инициацию онкогенеза, прогрессирование и метастазирование опухолей и представляют собой новые неинвазивные прогностические, диагностические и предиктивные маркеры течения заболевания и ответа на терапию у больных КРР (Abdelsattar Z.M. et al., 2016; Luo X. et al., 2019; Gmeiner W.H., 2021). Было обнаружено, что микроРНК играют главную роль как в эмбриональном развитии, так и в опухолевой трансформации эпителия толстой кишки (Monzo M. et al., 2008). Кроме того, микроРНК играют ключевую роль в биологии ОСК, эпителиально-мезенхимальном переходе, ангиогенезе, метастазировании и фармакорезистентности (Angius A. et al., 2021; Pan G. et al., 2021).

До конца не выяснена роль микроРНК в определении наиболее значимых различий между ОСК и доброкачественными стволовыми клетками (Yoshida K. et



al., 2021). МикроРНК играют ключевую роль в регуляции функции нормальных и опухолевых стволовых клеток посредством их взаимодействия с основными путями передачи сигналов, необходимыми для поддержания плюрипотентности стволовых клеток, такими как Nanog, Oct3/4, Sox2, KLF4, Lin28 и c-Myc, или участвующими в развитии ОСК, такими как Wnt, TGF- $\beta$ , RAS. Например, miR-470, miR-296 и miR-134, могут ингибировать факторы Oct4, Sox2 и Nanog (Tay Y. et al., 2008). Напротив, miR-145 усиливает дифференцировку клеток, таргетируя Oct4, Sox2 и KLF4 (Xu N. et al., 2009). Благодаря их взаимодействию с сигнальными путями Notch и Wnt miR-146, miR-34a и Let-7 влияют на гибель и пролиферацию стволовых клеток, что может способствовать развитию ОСК (Hwang W.L. et al., 2014; Madison B.B. et al., 2015; Bu P. et al., 2016). В частности, miR-34a может регулировать дифференцировку и самообновление путем таргетирования передачи сигналов Notch в ответ на воспалительные сигналы как *in vitro*, так и *in vivo* (Bu P. et al., 2016).

В одном из исследований показано, что из 46 miRNAs, дифференциально экспрессируемых в ОСК толстой кишки, отмечено снижение экспрессии miR-93 и miR-1231, тогда как экспрессия miR-32, miR-33a, miR-194, miR -215, miR-29b и miR-192 были увеличены (Yu X.F. et al., 2011). Было продемонстрировано, что miR-429 является онкогеном в ОСК, и предложено рассматривать его в качестве потенциального прогностического фактора (Li J. et al., 2013).

Семейство miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 и miR-429) играет важную роль в качестве регулятора стволовых клеток посредством отрицательной модуляции двух ключевых биологических свойств: ЭМП и самообновления стволовых клеток. MiR-200a является одной из наиболее дифференциально экспрессируемых микроРНК клетками с низкой и высокой экспрессией E-кадгерина (Pichler M. et al., 2014). Кроме того, истощение miR-200c приводит к повышенной экспрессии маркеров стволовых клеток, таких как CD166 и CD133, и приобретению признаков стволовости в линиях клеток KPP SW480 и HCT-116 (Lu Y.X. et al., 2014).

Другой микроРНК, которая ингибирует пролиферацию, миграцию, инвазию, ЭМП и метастазирование является предполагаемый онкосупрессор miR-203 (Deng B. et al., 2016). Кроме того, miR-203 идентифицирована как ингибитор стволовых клеточного потенциала в опухолевых клетках толстой кишки, а также отвечает за химиорезистентность опухолевых клеток, подавляя экспрессию генов АКТ2 (Li J. et al., 2011).

Панель микроРНК может быть использована с высокой чувствительностью и специфичностью для дифференциальной диагностики больных КРР от здоровых доноров при тестировании на большой популяции (Chen B. et al., 2019). MiR-548c-5p, miR-548i и miR-548am-5p были идентифицированы как дифференциально экспрессируемые miRNA в отношении метастазов в лимфатические узлы (Liu J. et al., 2017). Напротив, в других исследованиях отсутствуют данные о значительной корреляции паттернов экспрессии микроРНК со стадией КРР (Rammer M. et al., 2017). Показана возможность использования панели микроРНК для прогнозирования развития рецидива при КРР II и III стадий (Kandimalla R. et al., 2018).

Определен потенциал микроРНК и в лечении больных КРР, например, miR-214 увеличивает чувствительность клеток КРР к лучевому воздействию, ингибируя аутофагию в клетках опухоли (Hu J.L. et al., 2018). Гиперэкспрессия miR-143 связана с окислительным стрессом, что может способствовать преодолению резистентности клеток КРР к оксалиплатину (Gomes S.E. et al., 2018), а miR-195 способна десенсибилизировать клетки КРР к 5-фторурацилу (5-FU) (Kim C. et al., 2018; Kong D. et al., 2018).

МикроРНК могут быть использованы в качестве неинвазивных биомаркеров при КРР. Высокий уровень экспрессии в плазме miR-129 (Ya G. et al., 2017) и низкий уровень экспрессии miR-24-2 в сыворотке крови больных (He H.W. et al., 2018) являются потенциальными положительными или отрицательными биомаркерами в диагностике КРР (Chen B. et al., 2019). В исследовании Wang Y.N. и соавт. выявлено пять микроРНК, miR-31, miR-141, miR-224-3p, miR-576-5p и miR-4669, которые значительно различаются в группах больных КРР и

здоровых доноров, что может быть использовано в качестве панели для диагностики КРР (Wang Y.N. et al., 2017). Кроме того, miR-21 является полезным биомаркером для прогнозирования рецидива КРР и неблагоприятного прогноза у больных II -IV стадий (Tsukamoto M. et al., 2017).

### **1.3. Прогрессирование опухолевого процесса. Модели метастазирования**

Метастазирование является многоступенчатым процессом, клетки должны пройти четырехэтапный процесс, чтобы сформировать клинически видимые метастазы: разрушение базальной мембраны и инвазия опухолевых клеток в ближайшую строму (локальная инвазия); интравазация и циркуляция в кровотоке; экстравазация и выход в паренхиму органа; адаптация к чужеродной среде и рост в макрометастазы (колонизация) (Lambert A.W. et al., 2017). Существует несколько моделей метастазирования – линейной и параллельной прогрессии, иногда упоминаемые как модели позднего и раннего распространения (Massagué J. et al., 2016; Naxerova K. et al., 2017; Welch D.R. et al., 2019).

Модель параллельной прогрессии или раннего распространения предполагает распространение метастатически активных клеток первичной опухоли на ранних стадиях ее развития, где первичное и метастатическое поражения развиваются параллельно (Klein C.A., 2009; Hosseini H. et al., 2016). Модель линейной прогрессии, более «классическая», предполагает процесс метастазирования как последовательное событие после развития первичной опухоли (Naxerova K. et al., 2017). Было высказано предположение, что метастатическая прогрессия и «метастатическое переключение» связаны с модификацией иммунного микроокружения как одного из компонентов стромальной прогрессии (Celià-Terrassa T. et al., 2016; Binnewies M. et al., 2018). Третьей моделью является модель «самосева опухоли» – метастазирования в себя, при которой опухолевые клетки распространяются путем метастазирования, а затем возвращаются в первичную опухоль, внося вклад в развитие/прогрессирование первичной опухоли (Ishaque N. et al., 2018). По мнению исследователей, описанные три модели метастазирования, не являются

самостоятельными, а могут существовать параллельно (Klein C.A., 2009; Welch D.R. et al., 2019). Существуют противоречивые данные как о наличии общего предка клона первичной опухоли и метастазов (Ishaque N. et al., 2018), так и гипотезы полностью независимого генеза метастазирования и первичной опухоли (Allgayer H. et al., 2020).

Успехи молекулярной онкологии позволяют сопоставлять мутационный статус метастатической опухоли с тканью первичной (Brastianos P.K. et al., 2015). Продемонстрирована высокая степень согласованности обнаруженных мутаций между первичной и метастатической опухолями, подтверждающая модель линейной прогрессии опухоли (Brannon A.R. et al., 2014). Напротив, в работе Vermaat J.S. и соавт. найдены генетические изменения, отличающие первичные опухоли от ее метастазов (Vermaat J.S. et al., 2012). В других работах не обнаружено значительного количества генетических изменений в метастазах в сравнении с первичной опухолью (Yaeger R. et al., 2018). Результаты исследований показывают, что случаи метастатического КРР могут соответствовать как моделям линейной, так и параллельной прогрессии (Turajlic S. et al., 2016).

При рассмотрении механизмов метастазирования уделяют внимание как органотропности, связанной с крово- и лимфооттоком (Pretzsch E. et al., 2019; Zhang C. et al., 2020), так и с молекулярными характеристиками опухолей (Malki A. et al., 2020), их метаболическим и иммунологическим микроокружением (Van den Eynde M. et al., 2020; Ceelen W. et al., 2020).

При всех описанных моделях метастазирования несомненную роль играют как гетерогенность клеток опухоли, так и их взаимодействия со стромальными клетками; важнейшим метастатическим потенциалом обладают опухолевые стволовые клетки (ОСК).

### **1.3.1. Внутриопухолевая гетерогенность. Опухолевые стволовые клетки и теории их биологического происхождения**

Ткань опухоли состоит из гетерогенных клеток, включая опухолевые стволовые клетки, а также иммунные клетки и клетки стромы. Генетическая и фенотипическая разнородность популяции опухолевых клеток представляет собой серьезную проблему в лечении больных, увеличивая вероятность терапевтической резистентности (Kunihiko H. et al., 2019). Гипоксия и воспаление, оказывают значительное влияние на гетерогенность клеток в опухоли. В отличие от генетической изменчивости, эпигенетические программы являются обратимыми и, таким образом, могут непосредственно регулировать фенотипическую пластичность (Feinberg A.P., 2018).

Терапевтический ответ в значительной степени определяется эволюцией устойчивых субпопуляций и изменением фенотипа клеток (Lawson D.A. et al., 2018). Мутации, способствующие прогрессированию опухоли и химиорезистентности, могут присутствовать в преинвазивных или даже предраковых формах заболевания (Spira A. et al., 2017). Давно постулируется, что внутриопухолевая гетерогенность и ассоциированная с опухолью микросреда способствуют прогрессированию заболевания и влияют на выживаемость пациентов (Oskarsson T. et al., 2014).

Еще в 1877 году ученик Вирхова Конгейм обратил внимание на популяцию клеток эмбрионального характера, или опухолевые стволовые клетки, инициирующие рост опухоли (Capp J.-P., 2019), коррелирующие с агрессивностью, гетерогенностью опухоли и определяющие резистентность опухоли к терапии (Ayob A.Z. et al., 2018; Kuşoğlu A. et al., 2019).

Существуют три основные теории биологического происхождения ОСК. Во-первых, ОСК развиваются из стволовых клеток. Эта теория основана на предположении, что продолжительность жизни зрелых клеток недостаточно велика, чтобы подвергаться множественным мутациям, необходимым для онкогенной трансформации, тогда как продолжительность жизни стволовых клеток позволяет им приобретать последовательные мутации, необходимые для

развития злокачественного фенотипа (Shah A. et al., 2014; Moharil R.V. et al., 2017).

Во-вторых, ОСК могут развиваться из клеток-предшественников, обладающих частичной способностью к самообновлению, количество которых в ткани взрослого организма более высокое, чем стволовых клеток, что повышает вероятность онкогенной трансформации (Shah A. et al., 2014; Moharil R.V. et al., 2017).

В-третьих, стволовые опухолевые клетки развиваются из дифференцированных клеток путем дедифференцировки и вторично достигают вершины иерархии опухолевых клеток. Этот процесс тесно связан с индукцией ЭМП в дифференцированных клетках человека, приводящего к приобретению фенотипа, подобного стволовым клеткам, и образованию ОСК. Он включает сигнальные пути TGF- $\beta$ , Wnt, Hedgehog (Hh),  $\beta$ -катенин, Notch, NF $\kappa$ B и STAT3. В настоящее время это наиболее устоявшаяся концепция (Cai Z. et al., 2018).

Опухолевые стволовые клетки (ОСК), выявлены при многих злокачественных новообразованиях, включая рак яичников (Muinao T. et al., 2018), колоректальный рак (Munro M.J. et al., 2018) и другие опухоли желудочно-кишечного тракта (Taniguchi H. et al., 2016), рак поджелудочной железы (Heiler S. et al., 2016), меланома (Alamodi A.A. et al., 2016), рак легких (Codony-Servat J. et al., 2016), рак молочной железы (Fonseca N.A. et al., 2017). Большинство маркеров, экспрессируемых ОСК, можно найти и в популяции резидентных стволовых клеток взрослой ткани, эмбриональных стволовых клетках человека или взрослых тканях (Kim W.T. et al., 2017).

В исследованиях показано, что большинство ОСК расположены по краю опухоли при раке яичников (Jiang H. et al., 2012), уротелиальном раке (Brandt W.D. et al., 2009) и гепатоцеллюлярной карциноме (Nomura Y. et al., 2017). Расположение ОСК по краю опухоли может быть частично объяснено их миграцией за счет высокой подвижности и метастатической способности. ОСК, происходящие из не стволовой опухолевой клетки, должны пройти процесс ЭМП,

прежде чем приобрести ОСК фенотип, под воздействием внутриопухолевого микроокружения (Hernández-Camarero P. et al., 2018).

Колоректальные ОСК первоначально были идентифицированы по экспрессии гликопротеина CD133 (Ricci-Vitiani L. et al., 2007), затем были предложены другие маркеры, такие как CD44, CD166, BerEp4, EpCAM, Musashi-1, CD29, CD24, альдегид-дегидрогеназа-1, Lgr5 и Vmi1 (Angius A. et al., 2021). ОСК при КРР выявлены с частотой 1 на  $5,7 \times 10^4$  клеток, и лишь 100-500 из клеток CD133 + или CD44 + воспроизводят опухоли человека у мышей NOD/SCID (Ricci-Vitiani L. et al., 2007).

Некоторые данные показывают, что CD26+CD133+ субпопуляция клеток КРР обладает уникальным метастатическим потенциалом и ассоциирована с высоким инвазивным потенциалом и химиорезистентностью, а также способностью образовывать метастазы в печени при введении мышам. (Pang R. et al., 2010). CD133 ОСК были идентифицированы при различных злокачественных опухолях, включая рак молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, печени, поджелудочной железы, рак легких и плоскоклеточный рак головы и шеи (Sun Z. et al., 2020). CD133 является мембраносвязанным гликопротеином и участвует в дифференцировке примитивных клеток и ЭМП (Glumac P.M. et al., 2018). Кроме того, вносит вклад в пролиферацию клеток через Wnt-сигнальный путь и связан с неблагоприятным прогнозом при КРР, глиобластоме и гепатоцеллюлярной карциноме (Wu B. et al., 2015; Zhong C. et al., 2015; Muftuoglu Y. et al., 2021).

Другим мембранным маркером, используемым для идентификации стволовых клеток КРР, является CD44, трансмембранный гликопротеин класса I, действующий как рецептор для компонентов внеклеточного матрикса (Orlan-Rousseau V., 2010). Белки CD44 регулируют рост, выживание, дифференцировку и миграцию клеток, участвуют в прогрессировании и метастазировании опухоли. При колоректальном раке экспрессия CD44 повышена как в аденомах, так и в карциномах (Kim H.R. et al., 2004). CD44 является надежным маркером высоко онкогенных опухолевых клеток толстой кишки со свойствами стволовых клеток

(Zelistra J. et al., 2013). В исследованиях показано, что CD44v65 экспрессируется стволовыми клетками рака толстой кишки и необходим для обеспечения миграции и метастатического потенциала этих клеток. HGF, остеопонтин и SFD-1 $\alpha$  (стромальный фактор 1 $\alpha$ ), секретируемые микроокружением опухоли, увеличивают экспрессию CD44v6, активируя путь WNT/ $\beta$ -катенин (Sakuma K. et al., 2018).

Еще одним маркером ОСК является альдегиддегидрогеназа 1 (ALDH1) (Holah N.S. et al., 2017). В исследованиях показана связь экспрессии ALDH1 с расположением опухоли в толстой кишке (Goossens-Beumer I. et al., 2014). Отмечается отсутствие связи между гистологическим типом опухоли и экспрессией ALDH1 (Holah N.S. et al., 2017). Во многих исследованиях показана взаимосвязь между метастазированием в лимфатические узлы и экспрессией ALDH1 (Hou Y. et al., 2013; Chen J. et al., 2015a), тогда как в других исследованиях такая связь выявлена не была (Zhou F. et al., 2014). ALDH1 индуцирует ЭМП в опухолевых клетках, что способствует их проникновению через базальную мембрану в лимфатическую и кровеносную системы (Chen J. et al., 2015a). Показана корреляция экспрессии ALDH1 с низкой выживаемостью (Goossens-Beumer I.J. et al., 2014).

Кроме этих молекул, в качестве маркеров ОСК описан ряд других: CD166, участвующий в эмбриональном гемопоэзе и ангиогенезе и трансформации аденомы в аденокарциному; Lgr-5, обеспечивающий формирование резистентности к 5-фторурацилу; Oct 4, способствующий инвазии в лимфоузлы; Sox-2, связанный с быстрым рецидивированием; CD29, обладающий регенерационным и иммуносупрессивным действием; CD26, стимулирующий миграцию и инвазию; CD51, ответственный за сфероидообразование и ЭМП (Zhou Y. et al., 2017).

Srinivasan с соавторами продемонстрировано, что стволовые клетки рака толстой кишки неоднородны, могут подвергаться асимметричному делению, генерируя друг друга (Srinivasan T. et al., 2016). Пластичность ОСК предполагает возможность переключения между различными клеточными состояниями,



характеризующимися экспрессией поверхностных маркеров и факторов транскрипции (Yuan S. et al., 2019). Пластичность ОСК представляет собой серьезную проблему, указывающую на необходимость детального изучения внутренних и внешних механизмов, приводящих к реверсии клеток опухоли (Terrié E. et al., 2019).

Известно, что ОСК определяют резистентность опухоли к терапии и отвечают за возникновение рецидива опухоли (Desai A. et al., 2019; Marzagalli M. et al., 2021). Устойчивость ОСК к терапии связана с гиперэкспрессией генов семейства ABC-транспортеров (Dean M., 2009) и высокой способностью к репарации повреждений ДНК (Cheng L. et al., 2011). Химио- и лучевая терапия в основном эффективна для пролиферирующих клеток, ОСК при этом могут переходить в G<sub>0</sub>-фазу клеточного цикла, оставаясь способными к клеточному делению в ответ на стимуляцию их митотической активности (van der Toom E.E. et al., 2016). ОСК избегают цитотоксического воздействия за счет уменьшения экспрессии проапоптотических маркеров, таких как каспаза 3, и повышения экспрессии антиапоптотических белков, таких как bcl-2 (Domingo-Domenech J. et al., 2012).

При применении химио- или лучевой терапии, изменяется состав опухолевых клеток (Ayob A.Z. et al., 2018; Arnold C.R. et al., 2020), сначала погибают опухолевые клетки с высокой пролиферативной активностью, происходит уменьшение размера опухоли, в то время как ОСК выживают (Shibata M. et al., 2019). Низкая иммуногенность ОСК может быть обусловлена следующими причинами: продукцией ими иммунодепрессивных молекул, ослабляющих иммунную систему; рекрутингом ими клеток, подавляющих иммунную систему; снижением или потерей экспрессии опухолевого антигена, подавлением экспрессии МНС-I и ингибированием экспрессии молекул МНС-II на антигенпрезентирующих клетках (Codony-Servat J. et al., 2015). За счет описанных выше свойств ОСК могут избегать действия химиолучевой и иммунотерапии и формировать опухоли, резистентные к этим методам лечения. Поэтому представляются важными разработки, направленные на их элиминацию

или вывод из стволового состояния. Прежде всего, это вещества, нацеленные на такие сигнальные пути как Notch, лигандом которого является, например, DLL4, блокирующий опухолевый ангиогенез; hedgehog, в качестве антагониста которого разработан и проходит II фазу клинических испытаний висмодегиб; JAK/STAT3, ингибитор которого набукасин показал эффект во II фазе клинических испытаний (Bendell J. et al., 2017); а также ингибитор COX2 целекоксиб; ингибитор транскрипции  $\beta$ -катенина - малая молекула ICG-001, устраняющая химиорезистентные клетки путем апоптоза (Novellademunt L. et al., 2015). В отличие от них, антитела против мембранных маркеров, включая входящие в системы доставки цитостатиков, находятся только в экспериментальной разработке (Junttila M.R. et al., 2015; Zalewski A. et al., 2021).

### **1.3.2. Ниша стволовых опухолевых клеток. Внутриопухолевое микроокружение**

ОСК находятся в специализированных нишах, которые включают иммунные клетки, фибробласты, эндотелиальные и периваскулярные клетки или их предшественники, не стволовые опухолевые клетки, компоненты внеклеточного матрикса, цитокины и факторы роста (Korkaya H. et al., 2011). Наличие ниши стволовых клеток способствует поддержанию их в недифференцированном состоянии с возможностью самообновления, а также защищает от противоопухолевого воздействия путем индукции состояния покоя. Стромальные, иммунокомпетентные клетки и кровеносные сосуды являются ключевыми компонентами ниши, поддерживающими ОСК (Borovski T. et al., 2011). Важным фактором для поддержания стволовости является метаболическая среда ниши, содержащая низкий уровень глюкозы (Rovida E. et al., 2014). Эксперименты *in vitro* при культивировании в условиях гипоксии показали наличие тесной связи между напряжением кислорода и функциями нормальных стволовых клеток (Mazumdar J. et al., 2010).

Во многих опухолях происходит активация гипоксия – индуцибельного фактора HIF-1 $\alpha$ , который взаимодействуя с IL-6, TGF- $\beta$  и VEGF-A, вызывает

изменения медиаторов микроокружения. Показано, что HIF-1 способен индуцировать экспрессию некоторых маркеров эмбриональных стволовых клеток, таких как OCT4, в клетках КРР и других злокачественных опухолях (Mathieu J. et al., 2011). Низкое содержание кислорода в опухолях, ингибирует дифференцировку и, вероятно, увеличивает долю ОСК. Гипоксия индуцирует p53, что в свою очередь стимулирует транскрипцию miR-107, которая действует как потенциальный регулятор HIF-1 $\alpha$ , одной из двух субъединиц HIF-1. В целом, miR-107 может подавлять HIF-1 $\alpha$  и, в свою очередь, ангиогенез опухоли, рост и экспрессию VEGF (Yamakuchi M. et al., 2010). MiR-22 и miR-17-92 являются микроРНК, регулирующими белок HIF-1 $\alpha$  (Yamakuchi M. et al., 2011).

Компоненты окружающей среды опухоли обеспечивают сигналы, стимулирующие или подавляющие пролиферацию опухолевых клеток и определяют дальнейший сценарий их поведения (Wang L. et al., 2018). С другой стороны, опухолевые клетки могут также воздействовать на окружающие клетки и ткани, способствуя прогрессированию опухоли. Иммуносупрессивная ниша способствует поддержанию стволовых клеток фенотипа опухолевых клеток (Plaks V. et al., 2015).

Показана взаимосвязь иммунного микроокружения опухоли и ОСК (Xu F. et al., 2018). Фенотип ОСК является более гибким и обусловлен опухолевым микроокружением, а стволовоподобный фенотип может быть приобретен и не стволовыми опухолевыми клетками. Сообщалось, что IL-6 и фактор роста гепатоцитов (HGF), секретируемые МСК, могут индуцировать трансформацию опухолевых клеток в ОСК и индуцировать приобретение ОСК-подобного фенотипа ALDH1- субпопуляциями опухолевых клеток при КРР (Jiménez G. et al., 2018).

Также было показано, что TGFB1, секретируемый САФ (опухоль-ассоциированными фибробластами), индуцирует трансформацию дифференцированных опухолевых клеток в ОСК при немелкоклеточном раке легкого (Shintani Y. et al., 2013). Кроме того, показано, что САФ могут секретировать микровезикулы с помощью miR221, которые индуцируют

экспрессию стволовклеточного маркера CD133 в опухолевых клетках рака молочной железы (Sansone P. et al., 2017). Секретируемый опухолевым микроокружением IL-6 индуцирует процесс ЭМП в опухолевых клетках, а затем TGFB1 стимулирует экспрессию стволовклеточных маркеров, таких как CD44. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что дифференцированные опухолевые клетки должны пройти процесс ЭМП, прежде чем стать ОСК (Wu L. et al., 2017).

ОСК ингибируют пролиферацию цитотоксических Т-клеток, стимулируя активацию Т-регуляторных клеток (Wei J. et al., 2010) и способствуют привлечению макрофагов, ассоциированных с опухолью (ТАМ) (Aramini B. et al., 2021), а также усилению перехода ТАМ из противоопухолевого (M1) фенотипа в проопухолевый (M2) (Zhou W. et al., 2015). Кроме того, ниша индуцирует дифференцировку моноцитов, происходящих из костного мозга, в ассоциированные с опухолью макрофаги (Aderetti D.A. et al., 2018). Взаимодействие между ОСК и нишей является двунаправленным, что позволяет рассматривать ее многообещающей терапевтической мишенью (Guitart A.V. et al., 2010).

В эру применения иммунотерапии в лечении рака, активно изучается микроокружение опухоли (ТМЕ) и влияние лимфоцитарной инфильтрации на клинический исход заболевания. Отсутствие или наличие инфильтрации опухоли иммунокомпетентными клетками позволяет провести их деление на «холодные» и «горячие» соответственно, причем ингибиторы контрольных точек проявляют активность преимущественно в последнем случае. Результаты исследований позволяют выделить наиболее значимые иммунные клетки и продуцируемые ими цитокины микроокружения опухоли как препятствующие, так и способствующие опухолевому росту. Изменения в составе и состоянии активации иммунных клеток микроокружения КРР представляют собой ключевые события, способствующие установлению про- или противоопухолевого иммунного статуса (Atreya I. et al., 2019).

При исследовании функций врожденных лимфоидных клеток (ILC), населяющих слизистую оболочку кишки и поддерживающих ее целостность и гомеостаз, было выяснено, что наряду с этим они влияют на прогрессию опухоли. Например, их субпопуляция ILC1 обладает ингибирующим действием на опухолевый рост, тогда как ILC2 способна его стимулировать. Эти клетки характеризуются высокой экспрессией HS3ST1 и PD1, через которые и реализуется эта стимуляция, а ILC3 при прогрессии КРР могут трансдифференцироваться в ILCregs, также стимулируя его дальнейший рост опосредованно через TGF- $\beta$  (Wang S. et al., 2020). В связи с этим субпопуляции ILCs рассматриваются с одной стороны, как возможные мишени, а с другой – как клетки с мощными иммуномодулирующими свойствами.

НК-клетки – также клетки врожденного иммунитета - ответственны за механизмы ранней иммунной защиты и иммунного надзора за опухолями, продуцируя IFN- $\gamma$  и опосредуя перфорин/гранзим-зависимую цитотоксическую активность (Castriconi R. et al., 2018). Кроме того, НК-клетки экспрессируют рецепторы для иммунорегуляторных цитокинов, включая IL-2, IL-12, IL-15 и IL-18, которые играют решающую роль в их поддержании и активации (Hammer Q. et al., 2018). Описана цитолитическая роль НК-клеток в отношении клеток, иницирующих рак (cancer-initiating cells CIC) (Pernot S. et al., 2014). Низкая активность НК-клеток может являться прогностическим маркером развития локального рецидива у больных КРР (Chiossone L. et al., 2018), а риск развития колоректального рака возрастает в 10 раз (Jobin G. et al., 2017). Микроокружение солидных опухолей, продуцирующее трансформирующий фактор роста бета 1 (TGF- $\beta$ ) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), способно ингибировать эффекторную цитотоксическую функцию натуральных киллеров (Vacca P. et al., 2018). Кроме того, инфильтрирующие опухоль НК-клетки у больных КРР могут приобретать проангиогенные свойства и поддерживать образование ассоциированной с опухолью сосудистой сети (Bruno A. et al., 2018).

Так как противоопухолевая активность эндогенных НК-клеток у больных КРР снижена, в качестве инновационной стратегии, направленной на

оптимизацию клинического подхода может рассматриваться адоптивный перенос НК-клеток, в сочетании с таргетной анти-EGFR терапией (Ishikawa T. et al., 2018). Механизм действия основан на взаимосвязи анти-EGFR-антител с EGFR+ опухолевыми клетками, которые могут распознаваться адоптивными и эндогенными НК-клетками через Fc-рецепторы, что приводит к опосредованной НК-клетками антителозависимой клеточной цитотоксичности (Ishikawa T. et al., 2018). Противоопухолевое действие естественных киллеров может быть реализовано также через продукцию ими цитокинов, среди которых важнейшими являются IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . IFN- $\gamma$  поддерживает клеточно-опосредованный лизис опухолевых клеток, главным образом, посредством активирующего воздействия на цитотоксические Т-клетки и НК-клетки и повышения экспрессии молекул МНС-I на клетках-мишенях (Mattner J. et al., 2017). У TNF- $\alpha$  описана способность индуцировать апоптоз опухолевых клеток и способствовать накоплению инфильтрирующих опухоль макрофагов и дендритных клеток (Bertazza L., Mocellin S., 2010). Данные об ангиогенной роли TNF- $\alpha$  противоречивы: с одной стороны, он как провоспалительный цитокин, вызывает неоангиогенез, в другой – может разрушать сосудистую сеть опухоли (Burton E.R., Libutti S.K., 2009).

Среди других клеток врожденного иммунитета в микроокружении опухоли есть данные о позитивной значимости эозинофилов, ассоциированных с опухолью, наличие которых вследствие их прямого цитотоксического действия считается благоприятным прогностическим маркером КРР (Saraiva A.L. et al., 2018).

Давно известно, что функция макрофагов, ассоциированных с опухолью, разнонаправлена в зависимости от их принадлежности к провоспалительным М1 и ростостимулирующим М2, связанным с более короткой выживаемостью при всех типах рака (Fridman W.H. et al., 2017). Но, учитывая, что макрофаги осуществляют свое влияние на опухолевые клетки во многом через продуцируемые ими цитокины, роль М1 также представляется неоднозначной. Так, хорошо известна и, тем не менее, продолжает изучаться с целью поиска возможных мишеней, связанных с сигнальными путями, ростостимулирующая

активность TGF- $\beta$  – продукта макрофагов M2 (Liu Z. et al., 2018; Batlle E., Massagué J., 2019). Однако и ряд продуктов M1 стимулирует опухолевый рост. Так, IL-6 активирует STAT3 в клетках КРР, способствуя пролиферации и росту, и ингибируя апоптоз опухолевых клеток (Waldner M.J. et al., 2012). Хемокин IL-8 участвует в привлечении нейтрофилов, стимуляции неоангиогенеза и пролиферации опухолевых клеток. Есть сообщения о том, что его высокий уровень в крови больных связан с резистентностью к ингибиторам контрольных точек; поскольку эти данные были получены на небольшом материале, исследования продолжаются (Bakouny Z., Choueiri T.K., 2020).

Напротив, было показано, что повышенные уровни IL-12, IL-18 и IL-15 связаны с эффективным противоопухолевым иммунным ответом и более благоприятным клиническим течением (Bahri R. et al., 2015; Mager L.F. et al., 2016). Противоопухолевая и антиметастатическая активность IL-12 и, вероятно, IL-18, основана на способности индуцировать выработку IFN- $\gamma$  врожденными и адаптивными иммунными клетками (Del Vecchio M. et al., 2007).

IL-22, продуцируемый, кроме активированных макрофагов, многими другими иммунокомпетентными клетками ( $\alpha\beta$  и  $\gamma\delta$  Т-клетками субпопуляций Th1, Th22 и Th17, а также НКТ, ILC3, нейтрофилами), является центральным медиатором перекрестных взаимодействий между эпителиальными, иммунными клетками и микробиотой, способствуя поддержанию целостности эпителиального барьера за счет дифференцировки эпителиальных стволовых клеток на дне крипты (Lindemans C.A. et al., 2015).

Клетки врожденного иммунного ответа, включая макрофаги, НК-клетки, дендритные клетки, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы, обнаруживаются в опухолях в кооперации с клетками адаптивного иммунного ответа: цитотоксическими CD8+Т-клетками, Th1/Th2 Т-клетками, Th17 клетками, Treg и В-клетками. Их относительная плотность, распределение и взаимодействия отличаются при опухолях различных стадий и локализаций (Bindea G. et al., 2013). Как правило, наличие CD8+Т-клеток в опухоли ассоциируется с благоприятным исходом при раке желудка, колоректальном раке (Di Caro G. et al., 2013), раке

поджелудочной железы и печени (Solinas C. et al., 2017), раке молочной железы (Huang Y. et al., 2015) и раке легких (Bremnes R.M. et al., 2016); тем не менее, при почечно-клеточном раке (Giraldo N.A. et al., 2015) и раке простаты (Petitprez F. et al., 2019) исход оказался не связан с ними.

Разноречивые данные приводятся в литературе и о роли Tregs, что, по-видимому, связано с гетерогенностью этой субпопуляции (Shevyrev D., Tereshchenko V., 2020). Так, показана связь Tregs с высокой выживаемостью при КРР (Solinas C. et al., 2017) и низкой при опухолях печени (Solinas C. et al., 2017), раке пищевода (Кит О.И., Златник Е.Ю. и соавт., 2020), немелкоклеточном раке легких (Bremnes R.M. et al., 2016). Остается непроясненной роль Tregs при некоторых опухолях, включая рак желудка (Choi H.S. et al., 2016).

Судя по данным литературы, играет роль не только количество и качественный состав, но и расположение клеток иммунной системы в опухоли. В то время как макрофаги присутствуют как в инвазивном крае (ИМ), так и в центре опухолей (СТ), лимфоциты обнаруживаются, как правило, в инвазивном крае. В исследовании Xu F. и соавт. показано, что опухоли с высоким содержанием CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в опухолевом центре и CD68+ макрофагов в инвазивном крае демонстрируют худший прогноз (Xu F. et al., 2018). Третичные лимфоидные структуры (TLS) часто развиваются в инвазивном крае и/или строме опухоли (Dieu-Nosjean M.C. et al., 2016). Плазматические клетки, как правило, расположены вблизи третичных лимфоидных структур (Germain C. et al., 2014).

Итак, в многочисленных исследованиях показана связь иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, с прогнозом заболевания. Сообщается о связи высокой плотности CD3+Т-клеток, CD8+цитотоксических Т-клеток и третичных лимфоидных структур с более длительной безрецидивной выживаемостью и/или общей выживаемостью (Saute`s-Fridman C. et al., 2016; Vano Y.A. et al., 2018), за исключением рака печени, где отмечена их связь с высокой частотой рецидивов (Sia D. et al., 2017). Однако, в целом, в большинстве работ продемонстрирована значимость показателей, основанных на оценке инфильтрации опухоли Т-цитотоксическими лимфоцитами, в качестве фактора положительного прогноза



(Plaks V. et al., 2015), а наличие в опухоли фибробластов и M2 макрофагов, как правило, связано с худшим прогнозом (Becht E. et al., 2016).

#### **1.4. Эпителиально-мезенхимальный переход**

ЭМП является важным путем эмбрионального развития и регенерации тканей. Экспрессия маркеров ЭМП обнаружена почти во всех типах опухолей и связана с неблагоприятным прогнозом за счет стимуляции клеточной инвазии и метастазирования (Huang R. et al., 2017; Pastushenko I. et al., 2019). ЭМП характеризуется потерей эпителиальными клетками клеточной полярности и межклеточной адгезии, снижением экспрессии E-кадгерина и повышением экспрессии мезенхимного маркера виментина (Lamouille S. et al., 2014). Потеря апикально-базальной полярности, изменение клеточной морфологии и снижение плотного соединения позволяют опухолевым клеткам покидать паренхиму опухоли, выходить в системный кровоток и давать рост новым метастазам в других органах (Nawshad A. et al., 2005).

ЭМП является регулятором гетерогенности клеток, при этом клетки, прошедшие процесс ЭМП, приобретают свойства, подобные ОСК (Chaffer C.L. et al., 2011). При анализе механизмов, определяющих пластичность ОСК, выявлено, что клетки рака молочной железы, не относящиеся к стволовым, несут промотор ZEB1, который может легко переключаться из равновесного состояния в активное, приводя к эффективной индукции ZEB1 и последовательному приобретению фенотипа ОСК. Благодаря ЭМП происходит миграция ОСК, вследствие чего запускаются процессы метастазирования и рецидивирования (Hannen R. et al., 2018).

Показана связь ЭМП и иммунологического микроокружения опухоли, где TGF- $\beta$  может как индуцировать иммуносупрессивные состояния, так и инициировать программы ЭМП, помогая клеткам с фенотипом ЭМП избегать иммунологического надзора, тем самым, приводя к метастазированию (Padua D. et al., 2009). Участие опухолевого микроокружения имеет решающее значение в индукции процесса ЭМП в опухолевых клетках за счет секреции TGF- $\beta$ 1, IL-6, IL-

8, EGF, FGF, HGF, PDGF и VEGF (Sistigu A. et al., 2017). Контакты между опухолевыми и эндотелиальными клетками, необходимые для экстравазации метастатических клеток из кровотока опосредованы молекулами адгезии, такими как CD44 и N-кадгерин (Bill R. et al., 2015). Продемонстрирована роль микроокружения опухоли в генерации ОСК из не стволовых опухолевых клеток и связь с процессом ЭМП как необходимым механизмом репрограммирования для достижения состояния стволовости (Liao T.T. et al., 2017). Наличие перекрестных связей между стволовклеточным фенотипом опухолевых клеток, программами ЭМП и опухолевым микроокружением позволяет рассматривать их как неотъемлемую часть друг друга, что необходимо для понимания механизмов их взаимодействия.

Как показано на моделях КРР, ЭМП регулируется через различные сигнальные пути: Wnt/ $\beta$ -Catenin, STAT, Hedgehog (Hh), Notch, TGF $\beta$  (Gonzalez D.M. et al., 2014), причем пути Wnt и STAT опосредованы через стимуляцию экспрессии Zeb1 (Simeone P. et al., 2019) который является активатором этого процесса, будучи ключевым фактором дифференцировки эпителиальных клеток. Zeb1 обеспечивает клетки критическими свойствами, такими как повышенная пластичность, нарушения метаболизма, стволовклеточный фенотип и высокий метастатический потенциал (Simeone P. et al., 2019). Продемонстрировано, что экспрессия Zeb1 может прогнозировать развитие метастатического процесса (Lehmann W. et al., 2016).

В последнее десятилетие все большее внимание исследователей привлекает изучение процесса ЭМП в ЦОК (Francart M.E. et al., 2018; Burr R. et al., 2020).

### **1.5. Циркулирующие опухолевые клетки периферической крови.**

#### **Биологическая роль циркулирующих опухолевых клеток в метастатическом каскаде**

После отделения от первичной опухолевой массы часть опухолевых клеток с повышенным миграционным потенциалом в результате ЭМП способна проникать в сосудистую систему посредством капиллярной интравазации и

начинать миграцию в кровотоке, костном мозге или лимфатических сосудах (Haber D.A. et al., 2014).

Большинство ЦОК погибает в течение нескольких часов после выхода в системный кровоток, и лишь небольшая часть обладает способностью инициировать опухоль (Toyoshima K. et al., 2015). Небольшая популяция ЦОК, живущих в кровотоке длительное время, является основными клетками, ответственными за метастазирование. Оставаясь в состоянии покоя в кровотоке длительное время, они также могут быть вовлечены в развитие рецидива заболевания (Islam F. et al., 2015).

По одним данным количество ЦОК в системе кровообращения напрямую связано с риском метастазирования и стадией заболевания (Maas M. et al., 2017) и обратно коррелирует с ответом на противоопухолевую терапию (Agelaki S et al., 2015). По другим данным, несмотря на большое количество ЦОК, количество метастазов может быть незначительным, что позволяет сделать предположение о неэффективном процессе метастазирования (Allard W.J. et al., 2004).

Наиболее частым подходом для выявления ЦОК является система CellSearch, основанная на иммуномагнитном отборе циркулирующих клеток в цельной крови онкологических больных с использованием антител EpCAM, CK8, 18 и 19 и CD45 (Galizia G. et al., 2013; Bork U. et al., 2015). Основная проблема в подсчете ЦОК системой CellSearch связана с крайне редкой встречаемостью ЦОК: в количестве 1 на  $10^6$ – $10^8$  нормальных клеток крови (Joosse S.A. et al., 2014), а также с динамической экспрессией EpCAM и плотностью антигена на опухолевой клетке, что приводит к занижению количества ЦОК (de Wit S. et al., 2018). С биологической точки зрения незначительное количество ЦОК объясняется ЭМП, при котором на поверхности эпителиальной клетки экспрессируются маркеры мезенхимных клеток, а опухолевая клетка приобретает миграционные и инвазивные свойства, необходимые для метастатического процесса, тем самым подавляя экспрессию EpCAM (Gloushankova N.A. et al., 2018). В настоящее время для обнаружения ЦОК предлагаются EpCAM-независимые методы (Agnolletto C. et al., 2018). Следует также учитывать, что для метастазирования не всегда

необходим ЭМП. В последние годы описан метод исследования двух популяций ЦОК:  $ErCAM^{high}$  и  $ErCAM^{low}$  (de Wit S. et al., 2018; 2019), причем показано отсутствие корреляции ЦОК  $ErCAM^{low}$  и низкой общей выживаемости (de Wit S. et al., 2019).

Концепция внутриопухолевой гетерогенности подразумевает поддержание гетерогенности и на уровне ЦОК. ЭМП играет решающую роль в биологии ЦОК и вносит вклад в их гетерогенность (Genna A. et al., 2020).  $ErCAM+$  и  $ErCAM-$  ЦОК обладают различным тропизмом к органам. Показано, что  $ErCAM-$  ЦОК преимущественно ассоциированы с метастазами в мозг (Hanssen A. et al., 2018), тогда как  $ErCAM+$  ЦОК - с метастазами в кости (Fu L. et al., 2018).

Представлены доказательства наличия гибридных ЦОК, коэкспрессирующих как эпителиальные, так и мезенхимальные маркеры, и обладающих повышенным метастатическим потенциалом (Jolly M.K. et al., 2018).

2-5% всей популяции ЦОК циркулирует в виде небольших кластеров (микроэмболов), в состав которых входит до 50 клеток, характеризующихся повышенной способностью образовывать метастазы, по сравнению с отдельными ЦОК (Fabisiewicz A. et al., 2017). ЦОК могут образовывать смешанные кластеры вместе с тромбоцитами. Циркулирующие тромбоциты могут поглощать макромолекулы, такие как РНК и белок, синтезируемые опухолевыми клетками или микроокружением опухоли, и способствующие их активации, превращаясь в «обученные опухолью тромбоциты» (ТЕР), защищающие опухолевые клетки от иммунного надзора. Кроме того, ТЕР могут способствовать процессу ЭМП и последующей метастатической активности ЦОК (Kanikarla-Marie P. et al., 2017; Plantureux L. et al., 2018).

В литературе приводятся данные о существовании кластеров ЦОК, содержащих клетки иммунной системы (Kanikarla-Marie P. et al., 2017). Было продемонстрировано, что ЦОК нескольких типов ЗНО (рака молочной железы, меланомы) могут приносить свои собственные пермиссивные клетки микроокружения, такие как CAF, полученные из первичной опухоли, образуя смешанные кластеры, состоящие из ЦОК-CAFs, позволяющие им метастазировать

в легкие. САФ обеспечивают выживание в кровотоке, увеличивают метастатический потенциал ЦОК и обеспечивают опереженное ими раннее метастазирование (Duda D.G. et al., 2010).

Кластеры ЦОК поддерживаются молекулами межклеточной адгезии, что приводит к созданию микросреды, обеспечивающей защиту ЦОК от иммунного надзора, физического воздействия и аноикиса - разновидности апоптоза (Hong Y. et al., 2016).

Внутри циркулирующих микроэмболов была выделена субпопуляция миелоидных клеток с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>, так называемых «ассоциированных с опухолью макрофагоподобных клеток» (SAML) (Adams D.L. et al., 2014). SAML были обнаружены в периферической крови больных РМЖ, РПЖ, раком поджелудочной железы и раком легких с частотой от 81 до 97% от общего числа пациентов (Adams D.L. et al., 2014; 2016). Фенотипическая характеристика, проявляющаяся интенсивной экспрессией или отсутствием CD14 и CD45, а также различная морфология этих клеток, сходная с пластичностью макрофагов, позволяет предположить, что SAML могут находиться на разных стадиях созревания и дифференцировки (Adams D.L. et al., 2014).

Механизмы образования кластеров и их роль в формировании метастазов были проанализированы с использованием ксенотрансплантатов (Aceto N. et al., 2014; Liu X. et al., 2019). Экспериментальные данные на животных моделях показывают, что кластеры ЦОК обладают более высоким метастатическим потенциалом (Fabisiewicz A. et al., 2017; Aceto N., 2020). Циркуляция ЦОК в виде кластеров способствует их выживанию в кровотоке (Al Nabyan S. et al., 2018).

Нейтрофилы связаны не только с ангиогенезом в опухоли, но и с диссеминацией опухолевых клеток (Coffelt S.B. et al., 2016). Среди механизмов этих процессов, привлекающих внимание исследователей – секреция нейтрофилами провоспалительных факторов, которая является триггером «нетоза» – образования «ловушек» (NETs), состоящих из ДНК и антимикробных белков, в которые при воспалении включаются патогенные микроорганизмы, а при опухолях – ЦОК (Burz C. et al., 2018; Leone K. et al., 2018). При этом

усиливается их адгезия к эндотелию, экстравазация и, в конечном итоге, метастазирование (Cools-Lartigue J. et al., 2013). В экспериментальных исследованиях показано, что выделяемый NETs белок HMGB1 через рецептор TLR9 стимулирует адгезию, пролиферацию и миграцию опухолевых клеток (Tohme S. et al., 2016). Сами ЦОК могут индуцировать NETs, поддерживающие метастазирование путем стимуляции нейтрофилов секретлируемым опухолью G-CSF, что рассматривается как одна их стратегий их выживания. В литературе описано, что у больных КРР после резекции печени послеоперационное воспаление вызывало повышение NETs, которое высоко достоверно коррелировало со снижением выживаемости (Tohme S. et al., 2016). NETs обнаружены также при раке желудка (Yang C. et al., 2015), молочной (Park J. et al., 2016) и поджелудочной желез (Boone V.A. et al., 2015), но на клиническом материале не прослежена их связь с ЦОК.

Еще в 1970-х годах показано, что органы, в которые метастазируют первичные опухоли, не является случайным местом, и этот процесс связан не только с особенностями кровотока, а успешная колонизация метастазами происходит в определенных сайтах (Fidler I.J. et al., 1976). В более поздних исследованиях продемонстрировано, что опухоли вызывают образование перmissive микроокружения в отдаленных от первичной ткани органах, так называемых премеастатических нишах, способствуя успешному росту опухолевых клеток до того, как они попадут в эти места (Sleeman J.P., 2015). Состав премеастатической ниши в ткани-мишени определяется модификацией или разрушением локальных резидентных клеток, рекрутированием нерезидентных клеток, таких как CD11b и VEGFR1-позитивных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BM-MSCs) (Joyce J.A. et al., 2009), повреждением сосудистой сети за счет увеличения проницаемости сосудов, aberrантной морфологией эндотелия и потерей базальной мембраны сосудов (Huang Y. et al., 2009). Образование премеастатической ниши опосредуется многочисленными растворимыми факторами и внеклеточными микровезикулами (EMV), секретлируемыми клетками первичной опухоли. Было показано, что

метастатические опухолевые клетки обладают выраженной способностью секретировать как микровезикулы (> 150 нм в диаметре), так и экзосомы (30–150 нм в диаметре), содержащие микроРНК, мРНК и белки (Ostenfeld M.S. et al., 2014). Считается, что и ЦОК вовлечены в генерацию преметастатической ниши (Grange C. et al., 2011).

### **1.5.1. Молекулярные и фенотипические характеристики циркулирующих опухолевых клеток**

Несмотря на то, что само по себе обнаружение ЦОК не свидетельствует о метастатическом процессе, этап циркуляции опухолевых клеток является ключевым для его развития (Pantel K. et al., 2008; Hendricks A. et al., 2021).

ЦОК часто генотипически, фенотипически и функционально различаются. Некоторые из них обладают характеристиками стволовых клеток (например, CD44- или ABC-положительные), другие мезенхимально-подобными характеристиками (например, N-кадгерин-позитивные), третьи характеризуются гибридным фенотипом (Werner S. et al., 2017).

В некоторых исследованиях показано снижение экспрессии E-кадгерина и повышение экспрессии N-кадгерина в ЦОК (Loh C.Y., et al., 2019). Изучаются и другие маркеры ЭМП, такие как ZEB1 и ZEB2, Snail и Twist (Goossens S., et al., 2017; Stemmler M.P. et al., 2019). В ЦОК также были проанализированы и некоторые сигнальные пути – TGF- $\beta$ , EGFR, c-Met, Notch и Wnt (Gonzalez D.M. et al., 2014).

Коэкспрессия маркеров стволовых клеток CD44, ALDH1 или CD133 в сочетании с маркерами ЭМП оказывают влияние на выживаемость ЦОК и их метастатический потенциал (Wang L. et al., 2018; Chen C. et al., 2018). Показана высокая экспрессия матриксных металлопротеиназ (ММП) в ЦОК и их роль в инвазии опухоли, ремоделировании внеклеточного матрикса и ослаблении межклеточных контактов у больных раком простаты (Dhar M. et al., 2018). Способность ЭМП стимулировать ангиогенез является фактором, способствующим высвобождению ЦОК, так, экспрессия ангиогенного фактора

VEGF-A была описана в ЦОК больных раком молочной железы (Kallergi G. et al., 2009). Отмечена корреляция экспрессии маркеров ЭМП в ЦОК после терапии с устойчивостью к химио-лучевому, а также таргетному лечению (Papadaki M.A. et al., 2019; Guan X. et al., 2019; Ikeda M. et al., 2020).

Некоторые ЦОК экспрессируют эндотелиальные маркеры и воспроизводят сосудистую мимикрию - феномен, связанный с агрессивным течением заболевания (Rossi E. et al., 2019).

Были продемонстрированы перекрестные взаимодействия между различными субпопуляциями ЦОК и клетками иммунной системой (Leone K. et al., 2018).

ЦОК с фенотипом ОСК выявлены при раке легких, гепатокарциноме, где ЦОК экспрессируют CD90+CXCR4+, раке прямой кишки с клетками CD44v9+, раке молочной железы, где ЦОК экспрессируют *TWIST*, *AKT2*, *PI3K-alpha*, *ALDH1* и характеризуются резистентностью к терапии и неблагоприятным прогнозом (Rossi E. et al., 2019; Agnoletto C. et al., 2019). У больных раком желудка CD44+ ЦОК коррелировали с плохим прогнозом (Li M. et al., 2014).

Доля ЦОК, экспрессирующих маркеры ОСК в общей фракции ЦОК, сильно варьирует между различными типами злокачественных новообразований и даже внутри одного и того же типа рака. Так, 18-35% ЦОК у больных раком молочной железы экспрессирует ОСК-фенотип CD44+CD24-ALDH+ (Theodoropoulos P.A. et al., 2010).

Остается вопросом, насколько меняются молекулярные характеристики опухолевых клеток в процессе миграции при метастазировании и может ли это иметь прогностическую и предиктивную значимость. Есть сообщения о том, что в ЦОК эти характеристики отличаются от первичной опухоли (Gangnus R. et al., 2004). В других исследованиях, напротив, показана высокая степень сопоставимости мутаций *KRAS*, выявленных в ткани первичной опухоли и ЦОК, а определение мутационного статуса *KRAS* в ЦОК при КРР рекомендовано для отбора пациентов с хорошим ответом на анти-EGFR-терапию (Yen L.C. et al., 2009). Показано, что пациенты с высоким уровнем MSI не чувствительны к



химиотерапии 5FU, а клинический ответ на системную цитотоксическую терапию может быть предсказан с помощью молекулярного анализа ЦОК при КРР (Gazzaniga P. et al., 2010).

### **1.5.2. Взаимодействие циркулирующих опухолевых клеток и иммунокомпетентных клеток крови**

С учетом современных представлений об «иммуноредактировании» опухоли, в литературе рассматриваются механизмы, с помощью которых различные популяции лимфоцитов способны ограничивать или стимулировать диссеминацию и персистенцию ЦОК (Leone K. et al., 2018), причем для реализации своего метастатического потенциала фенотип ЦОК эволюционирует в сторону снижения иммуногенности. Выше мы касались изменений иммунологического микроокружения опухоли и значения клеток иммунной системы в транспортировке ЦОК. Кровоток представляет собой среду, в которой они сталкиваются с клетками, могущими препятствовать их выживанию и распространению. Так, еще в XX веке было показано, что НК-клетки могут захватывать и разрушать ЦОК в кровотоке до их экстравазации, предотвращая метастазирование (Hanna N., 1982). Роль этой популяции лимфоцитов в элиминации ЦОК подтверждается тем, что у больных метастатическим раком молочной железы, КРР и раком предстательной железы цитотоксическая активность НК-клеток обратно коррелирует с уровнем ЦОК (Santos M.F. et al., 2014).

В качестве стратегий выживания ЦОК в литературе описана гиперэкспрессия ими CD47, который связывается с SIRPα (Jiang P. et al., 1999), рецептором, ингибирующим макрофаги и Т-лимфоциты (Brown E.J. et al., 2001); продукция факторов, угнетающих цитотоксическую и фагоцитарную активность иммунокомпетентных клеток (Legrand N. et al., 2011); гиперэкспрессия PD-L1 (Tian M. et al., 2016; Wang X. et al., 2016); привлечение тромбоцитов, способных как механически, так и через выделение цитокинов блокировать активность натуральных киллеров (Pitroda S.P. et al., 2019) и др. Среди иммунологических

механизмов действия CD47, в частности, гипоекспрессия под его влиянием кальретикулина – шаперона, обеспечивающего выраженную цитотоксичность НК и фагоцитоз. Показано, что присутствие CD47+ ЦОК в костном мозге связано с прогрессированием РМЖ (Nagahara M. et al., 2010), выявлена роль CD47 в диссеминации неходжкинских лимфом и формировании их иммунорезистентности (Chao M.P. et al., 2011).

Если значимость макрофагов в канцерогенезе исследовалась в течение долгого времени, то моноциты, среди которых выделяют классические, неклассические и промежуточные, различающиеся по экспрессии CD14, CD16, CD62L, CD11c, CD18, HLA-DR, до недавнего времени привлекали меньше внимания исследователей. В настоящее время неклассическим моноцитам приписывается «патрулирующая» роль, которая осуществляется по механизму, связанному с рецептором фракталкина CX3CR1. Неклассические моноциты поглощают апоптотические клетки эндотелия и улавливают «сигналы опасности», исходящие из тканей; считается, что они трансформируются из классических через ядерный рецептор NR4A1 (Bharat A. et al., 2017). Они поглощают и опухолевый материал, который, например, в виде экзосом опухолевых клеток, может быть важной составляющей индукции противоопухолевого иммунного ответа. Однако опухолевые клетки защищаются от фагоцитоза путем экспрессии CD47, которая является признаком неблагоприятного прогноза, как показано при раке яичников, глиобластоме и НМРЛ; для последнего выявлена корреляция экспрессии этого рецептора с отдаленным метастазированием. Игрет ли роль в его развитии взаимодействие рецептора CD47 с его лигандом SIRP $\alpha$ , экспрессированном на циркулирующих моноцитах, остается предметом дискуссии (Olingy C.E. et al., 2019).

В исследовании Hamilton G. соавт. изучались взаимодействия между макрофагами и ЦОК путем культивирования ЦОК, выделенных от пациентов МРЛ распространенных стадий, в ЦОК-кондиционированных средах здоровых доноров, полученных из МНК периферической крови, которые впоследствии дифференцировались в моноциты/макрофаги, экспрессирующие маркеры TAM

CD14, CD163 и CD68. Был сделан вывод о том, что ЦОК могут обучать TAM, способствуя их распространению *in vivo* (Hamilton G. et al., 2015).

Экспрессия TLR2 и TLR4 на моноцитах, по-видимому, противоположным образом связана с их участием в ЦОК-опосредованном метастазировании, т.к. обратно коррелирует с уровнем ЦОК у больных метастатическим раком молочной железы, КРП и раком предстательной железы (Santos M.F. et al., 2014).

Кроме клеток врожденного иммунитета, за противоопухолевую иммунореактивность отвечают Т-лимфоциты адаптивного иммунитета, прежде всего, цитотоксические. Ye и соавт. продемонстрировали, что количество ЦОК у больных IV стадии немелкоклеточного рака легкого обратно коррелирует с количеством NK-клеток и CD3+, CD4+ и CD4+/CD8+ лимфоцитов и прямо - с наличием метастазов. Кроме того, высокие значения ЦОК коррелируют с повышенным количеством Tregs в крови. Авторами сделано предположение о возможности использования комбинации ЦОК и Tregs в качестве нового прогностического фактора прогрессирования опухолевого процесса (Ye L. et al., 2017). Описаны и другие факторы иммунной системы, способствующие диссеминации опухоли, не только на локальном, но и на системном уровне. Принято считать, что CD8+ Т-клетки проявляют цитотоксическую, т.е., противоопухолевую активность, однако, Mego и соавт. продемонстрирована прямая корреляция между количеством ЦОК и долей активированных IL-17-продуцирующих CD8+ Т-клеток (Mego M. et al., 2016). На экспериментальных моделях показано, что механизм такого действия IL-17 связан с активацией пути IL-6/Stat3 и высвобождением MMP-2/MMP-9, TNF- $\alpha$  и VEGF, следствием чего является индукция миграции опухолевых клеток и метастатический рост рака легкого у мышей (Pan B. et al., 2015; Wei L.E. et al., 2016).

Этап экстравазации ЦОК также связан с иммунными клетками и их молекулами. Связывание CD44 на мигрирующих опухолевых клетках с CD62 на эндотелиальных клетках отвечает за начальные этапы экстравазации. Кроме того, CD62 экспрессируется на тромбоцитах, и его взаимодействие с CD44 создает оболочку, которая защищает опухолевые клетки от цитотоксических

эффекторных клеток на моделях *in vivo* (Borsig L. et al., 2001). Оба маркера, как известно, являются рецепторами адгезии; CD44 экспрессирован также и на лимфоцитах, а лиганд для CD62 – на «наивных» и Тсм-клетках, что может опосредовать их участие в экстравазации ЦОК.

Итак, факторы иммунной системы играют существенную роль на всех этапах ЦОК-опосредованного метастазирования. Углубленное изучение взаимодействия опухолевых и иммунокомпетентных клеток, а также поиск возможных эффективных вмешательств в это взаимодействие является актуальной научной проблемой.

### **1.5.3. Прогностическая значимость циркулирующих опухолевых клеток**

Методы, способствующие выявлению злокачественного заболевания на ранней стадии и оценке прогрессирования опухоли, обладают большим потенциалом для улучшения выживаемости больных. Роль в прогнозировании риска прогрессирования заболевания методов «жидкостной биопсии», с помощью которой можно обнаружить и охарактеризовать ЦОК, не вызывает сомнения (Alix-Panabieres C., Pantel K., 2013; Cai X. et al., 2015).

Количество обнаруживаемых ЦОК у больных КРП с использованием системы CellSearch, невелико, и может не превышать порог в 3 ЦОК, в отличие от рака молочной железы, рака простаты (Sastre J. et al., 2008; Thorsteinsson M. et al., 2011).

Современные системы обнаружения демонстрируют наличие ЦОК только у 30–40% пациентов метастатическим КРП (Negin V.P. et al., 2010). Абсолютное количество ЦОК при КРП также оказалось ниже (1-2 ЦОК при мКРП против 3-5 ЦОК при метастатическом раке простаты и 6-7 ЦОК при метастатическом раке молочной железы. Более низкие значения ЦОК получены на ранних стадиях КРП (Torino F. et al., 2013). Hiraiwa K. и соавт. продемонстрировали присутствие ЦОК до операции у 18% пациентов с локализованным КРП, при этом после оперативного вмешательства ЦОК выявлены не были (Hiraiwa K. et al., 2008). Данные различия могут быть связаны с высокой экспрессией поверхностных

адгезионных молекул на ЦОК, что приводит к их флотации в виде агрегатов в дублетах или кластерах клеток опухоли, включающих дендритные клетки и лейкоциты (Molnar B. et al., 2001).

В других исследованиях ЦОК выявлены у 77% пациентов метастатическим КРР и у 57% пациентов I-III стадией заболевания (Wong S.C., et al., 2009). Показано, что обнаружение ЦОК при КРР коррелирует со стадией заболевания, независимо от используемых методов и маркеров (Sastre J. et al., 2008), тогда как корреляция с известными клиническими/патологическими прогностическими факторами, такими как размер опухоли и степень ее прорастания, сосудистая/перинеуральная инвазия, развитие острой кишечной непроходимости, степень дифференцировки опухоли, уровень дооперационного СЕА, остается неопределенной (Sastre J. et al., 2008).

Прогностическая значимость ЦОК у больных I-III стадий КРР была продемонстрирована в нескольких исследованиях (Garrigós N. et al., 2010; Peach G. et al., 2010). Частота выявления ЦОК варьировала от 4% до 57%, а их наличие после радикальной операции связано с худшим прогнозом у больных ранних стадий КРР (Thorsteinsson M., Jess P., 2011).

В физиологических условиях эпителиальные клетки отсутствуют в кровотоке (Riethdorf S. et al., 2018). Анатомия кровоснабжения толстой и прямой кишки позволяет обнаруживать ЦОК в разных отделах кровеносной системы: брыжеечных, портальных, периферических кровеносных сосудах. Показано преобладание по количеству и частоте выявления ЦОК в брыжеечных отделах в сравнении с центральными отделами, наиболее часто при локализации опухоли в нижних отделах, в сравнении со средним/высоким отделом прямой кишки (Rahbari N.N. et al., 2012). Эти данные подтверждают, что печеночный дренаж портальной системы может действовать как фильтр, снижая уровни ЦОК в системном кровотоке (Negin B.P. et al., 2010.). Несмотря на это, доступность образцов периферической крови позволяет использовать их в большинстве случаев для мониторинга и оценки прогностического потенциала ЦОК. Количество ЦОК в парных образцах периферической крови и крови из

брыжеечных сосудов у больных КРР позволяет предположить, что печень задерживает часть ЦОК (Deneve E. et al, 2013). Клетки Купфера представляют собой резидентные макрофаги печени, способные обнаруживать и задерживать ЦОК, а также удалять метастатические опухолевые клетки из паренхимы печени (Bayon L.G. et al, 1996). Являясь печеночными аналогами антиген-презентирующих клеток, клетки Купфера могут действовать как путем активации Т-клеток против ЦОК, так и путем распознавания и уничтожения опсонизированных опухолевых клеток (Bayon L.G. et al., 1996; Gül N. et al., 2014).

В некоторых исследованиях ЦОК рассматриваются как многообещающий неинвазивный диагностический и прогностический маркер при метастатическом КРР (Tsai W.S. et al., 2016). Другие исследования, напротив, описывают диссеминацию опухолевых клеток как их транзитное выделение (Hinz S. et al., 2015).

ЦОК, выявленные в разные временные точки, у больных КРР указывают на различные прогнозы в отношении выживаемости (Galizia G. et al., 2013). Fan T. и соавт. показали, что наличие ЦОК до начала лечения может являться потенциальным суррогатным маркером опухолевой нагрузки (Fan T. et al., 2009). По данным Galizia G. и др. высокие уровни ЦОК в послеоперационном периоде связаны с рецидивом опухоли и являются единственным независимым прогностическим фактором неблагоприятного исхода (Galizia G. et al., 2013). Matsusaka и соавторы обнаружили, что наличие менее 3 ЦОК через 2 недели после начала химиотерапии является показателем эффективности терапии (Matsusaka S. et al., 2011). По данным Peach G. и соавт. наличие ЦОК в крови через 24 ч после резекции кишки, в отличие от периоперационного уровня, являлось независимым прогностическим маркером рецидива и низкой выживаемости (Peach G. et al., 2010).

Koch M. и соавторы продемонстрировали прогностическую ценность ЦОК в пред-, интра- и послеоперационных образцах крови пациентов, перенесших лечебную (R0) резекцию метастазов в печень. По сравнению с оперативным вмешательством на первичной опухоли, резекция печеночных метастазов

вызывает более высокую частоту гематогенной диссеминации опухолевых клеток (Koch M. et al., 2005).

Наличие ЦОК имеет прогностическое значение для общей выживаемости и выживаемости до прогрессирования при КРР (Bork U. et al., 2015; Tan Y. et al., 2018). Рассмотрение прогностической значимости уровней ЦОК, суммированное в обзоре Burz C. и соавт. (Burz C. et al., 2018), показало, что при неметастатическом КРР присутствие ЦОК после операции позволяет достоверно прогнозировать прогрессирование заболевания (Jia S. et al., 2017), являясь фактором риска развития послеоперационных метастазов (Wang J.Y. et al., 2006). Наличие ЦОК после хирургического лечения служит фактором неблагоприятного прогноза бессобытийной выживаемости больных. Данные литературы характеризуют метод определения уровня ЦОК как имеющий в ряде случаев большую прогностическую значимость, чем традиционно применяемый уровень раково-эмбрионального антигена (Huang M.Y. et al., 2016). Более того, уровень ЦОК ассоциируется с такими клиническими исходами, как общая и бессобытийная выживаемость больных (Huang X. et al., 2015; Huang M.Y. et al., 2016). В плане биологии ЦОК представляется важным, что их высокие уровни коррелировали с развитием рецидива за счет их трансформации в опухолевые стволовые клетки (Mitra A. et al., 2015). В этой же работе приводятся данные о том, что ЦОК, являясь неотъемлемой частью метастатического каскада, может служить прогностическим и предиктивным фактором при ранних стадиях КРР и, кроме того, материалом для неинвазивной жидкостной биопсии, позволяющей определение таких клинически значимых мутаций, как VEGF, KRAS, являющихся основанием для назначения таргетной терапии. Авторы, однако, отмечают отсутствие согласия в плане метода определения ЦОК, времени и референсных значений, считая, что эти факторы нуждаются в уточнении и стандартизации.

В литературе отмечено прогностическое значение не только количества, но и фенотипических характеристик ЦОК. Так, при меланоме прогностическая значимость описана у маркеров MART-1, MAGE-A3 и PAX3, экспрессированных на ЦОК (Zhong X. et al., 2020). Экспрессия на поверхности ЦОК PD-L1,

способствует выживанию их в кровотоке за счет подавления иммунного ответа (Wang X. et al., 2016; Guibert N. et al., 2018). Применение ИКТ, направленных на систему PD-1/PD-L1, у больных НМРЛ с PD-L1-негативными ЦОК было эффективным, тогда как при PD-L1+ ЦОК у них наблюдалось прогрессирование процесса (Nicolazzo C. et al., 2016). При исследовании эффективности ниволумаба у больных раком органов головы и шеи показано, что ЦОК-позитивные больные имели меньшую бессобытийную продолжительность жизни, причем наличие PD-L1+ ЦОК было связано с худшим прогнозом (Kulasinghe A. et al., 2018). Высокая экспрессия PD-L1 на ЦОК при опухолях ЖКТ, рассматривается как фактор скрининга для терапии ингибиторами контрольных точек, а динамика уровня ЦОК – как метод мониторинга ответа на нее (Yue C. et al., 2018). Блокада PD-L1 способствует усилению противоопухолевого ответа, опосредованного эффекторами цитотоксичности (Т- и НК-лимфоцитами) в микроокружении опухоли, а также может осуществляться через прямые или непрямые эффекты PD-1+ В-лимфоцитов.

Итак, прогнозирование течения заболевания у больных КРР, по-видимому, связано не только с традиционно используемыми для этого характеристиками: стадией процесса, степенью дифференцировки, молекулярным подтипом опухоли, но и с наличием и количественным содержанием ЦОК, ОСК, микроокружением опухоли, в т.ч., иммунологическим, молекулами, опосредующими ЭМП, а также экспрессией микроРНК различных семейств в ткани опухоли и их присутствием в крови больных. Каждый из этих факторов потенциально может представлять мишень для противоопухолевого лечения.

Таким образом, несмотря на прогресс в ранней диагностике и улучшении эффективности адъювантной терапии, рецидивирование и метастазирование опухолевого процесса у больных КРР подчеркивает неадекватность существующих факторов в прогнозировании индивидуального риска неблагоприятного течения заболевания. Кроме того, выбор адъювантной химиотерапии основан не столько на специфической чувствительности резидуальных клеток к отдельным лекарственным препаратам, сколько на



индивидуальном прогностическом профиле пациентов. Не вызывает сомнения необходимость исследования прогностической роли ЦОК и ОСК, которые могут воспроизводить злокачественные признаки опухоли в отдаленных местах, а также являться мишенями для таргетных препаратов. Кроме того, клеточная и молекулярная многогранность опухоли и опухолевого микроокружения толстой кишки предполагает возможность разработки множества потенциальных мишеней для терапевтического воздействия, новых алгоритмов стратификации пациентов на группы риска и прогнозирования течения заболевания.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материал исследования

Данное исследование направлено на комплексный анализ профиля транскрипционной активности микроРНК и их генов-мишеней в опухоли, уровня ЦОК в периферической крови и профиля транскрипционной активности микроРНК изолированных ЦОК, экспрессии маркеров ОСК и эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевой ткани, анализа системного и локального иммунитета при различных уровнях ЦОК и ОСК для оценки влияния изученных параметров на общую выживаемость больных раком ободочной кишки и риск развития неблагоприятных исходов заболевания.

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.

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, свежесамороженная 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 2.1).



**Рисунок 2.1.** Дизайн исследования

Использовались следующие критерии включения больных в исследование: возраст  $\geq 18$  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.

## 2.2. Клинико-морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика больных раком ободочной кишки

Распространенность заболевания определялась согласно международной классификации по системе TNM (8 издание, 2017 год).

Так, на долю больных, включенных в исследование, II стадии приходилось 31,3%, III – 25,1%. Больных IV стадией в исследовании было большинство, 43,6%. Распределение больных колоректальным раком по стадии заболевания представлено в таблице 2.1.

**Таблица 2.1** – Распределение больных по стадии заболевания

Стадия заболевания	Количество больных (n=351)	
	абс. ч.	отн., %
II (T3-4N0M0)	110	31,3
III (T1-4N1-2M0)	88	25,1
IV (T1-4N0-2M1a)	153	43,6
Всего	351	100,0

Анализ больных по гендерному признаку не выявил существенных различий среди всех больных, включенных в исследование, где доля женщин составила 46,9%, мужчин – 52,1%. Соотношение количества больных внутри стадии по полу (женщины:мужчины) при II стадии составило 1:1, при III стадии 1:1,1, при IV – 1:0,8. Распределение больных по полу представлено в таблице 2.2.

**Таблица 2.2** – Распределение больных по полу, абс. ч. (%)

Пол больных	II стадия		III стадия		IV стадия	
	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %
Женщины (n=168)	54	49,1	46	52,3	68	44,4
Мужчины (n=183)	56	50,9	42	47,7	85	55,6
Всего (n=351)	n=110		n=88		n=153	

В исследование включены больные в возрасте от 42 до 86 лет, где средний возраст соответствовал  $64,2 \pm 3,7$  г. (таблица 2.3).

**Таблица 2.3** – Распределение больных по возрасту, абс. ч. (%)

Возраст больных	II стадия		III стадия		IV стадия	
	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %
30-50 лет	3	2,7	6	6,8	7	4,6
51-60 лет	38	34,5	27	30,7	47	30,7
61-70 лет	51	46,4	38	43,2	68	44,4
71-80 лет	18	16,4	13	14,8	22	14,4
81 год и старше	0	0	4	4,5	9	5,9
Всего	110	100,0	88	100,0	153	100,0

Так, большинство больных приходилось на возрастной интервал 61-70 лет, где их доля при II стадии составляла 46,4%, при III – 43,2, при IV – 44,4%. Больных старшей возрастной группы (81 год и старше) в нашем исследовании при II и III стадиях выявлено не было, тогда как при IV стадии их доля составила 5,9%. Доля больных в возрастной группе моложе 50 лет при III стадии в 2,5 раза и 1,5 раза больше количества больных аналогичного возраста при II и IV стадиях (при II – 2,7%, III – 6,8%, IV – 4,6%). При всех стадиях заболевания преобладали больные в возрастной группе старше 61 года (при II стадии их доля соответствовала 62,8%, при III – 62,5%, при IV стадии – 64,7%).

При анализе распределения больных по локализации опухолевого процесса выявлено преобладание больных с опухолью в сигмовидной кишке при всех стадиях заболевания, при этом максимальное их количество выявлено в III и IV стадиях, что в 1,5 раза выше, чем при II стадии. Распределение больных по расположению опухолевого процесса представлено в таблице 2.4.

Среди больных II стадии высокий процент приходился на опухоли, локализованные в восходящей ободочной кишке, печеночном изгибе ободочной кишки и поперечной ободочной кишке, 20,8%, 16,4% и 15,4% соответственно. Для больных III стадии заболевания наряду с локализацией опухоли в сигмовидной кишке, частой локализацией опухоли являлась поперечная ободочная кишка, восходящая ободочная кишка и селезеночный изгиб ободочной кишки (14,8%, 12,5% и 10,2% соответственно), тогда как среди больных IV стадии

- восходящая ободочная кишка, селезеночный изгиб ободочной кишки и нисходящая ободочная кишка (13,7%, 11,8% и 10,5%).

**Таблица 2.4** – Распределение больных по локализации опухоли в различных отделах толстой кишки, абс. ч. (отн., %)

Локализация опухоли	Всего		II стадия (n=110)		III стадия (n=88)		IV стадия (n=153)	
	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %
Слепая кишка	23	6,6	7	6,4	5	5,7	11	7,2
Восходящая ободочная кишка	55	15,7	23	20,8	11	12,5	21	13,7
Печеночный изгиб ободочной кишки	34	9,7	18	16,4	6	6,8	10	6,5
Поперечная ободочная кишка	42	12,0	17	15,4	13	14,8	12	7,8
Селезеночный изгиб ободочной кишки	33	9,4	6	5,5	9	10,2	18	11,8
Нисходящая ободочная кишка	34	9,7	11	10,0	7	8,0	16	10,5
Сигмовидная кишка	130	36,9	28	25,5	37	42,0	65	42,5

Опухоль в селезеночном изгибе ободочной кишки при II стадии оказалась самой редкой локализаций, с частотой в 5,5%. Наименьшая доля больных в 5,7% и 6,5% приходилась на локализации опухоли в слепой кишке при III стадии и печеночном изгибе ободочной кишки при IV стадии.

Нами проведен пересмотр гистологических препаратов опухоли ободочной кишки согласно критериям классификации опухолей толстой и прямой кишки, WHO 2019г. При анализе степени дифференцировки опухоли выявлено преобладание умеренно дифференцированных опухолей (G2) в 55,3%, наименьшая доля соответствовала высокодифференцированным опухолям (G1) – 15,4%, тогда как доля низкодифференцированных опухолей (G3) составила 29,3%. Доля опухолей низкой степени злокачественности в исследовании преобладала и в 2,4 превышала долю опухолей высокой степени злокачественности (70,7% против 29,3%). Распределение больных по степени дифференцировки и степени злокачественности опухоли отражены в таблицах 2.5 и 2.6.

**Таблица 2.5** – Распределение больных по степени дифференцировки опухоли, абс. ч. (%)

Степень дифференцировки опухоли	Всего		II стадия (n=110)		III стадия (n=88)		IV стадия (n=153)	
	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %
G1	54	15,4	15	13,7	13	14,8	26	17,0
G2	194	55,3	71	64,5	64	72,7	59	38,6
G3	103	29,3	24	21,8	11	12,5	68	44,4

Из представленных в таблице 2.5 данных видно, что преобладающими по степени дифференцировки во II и III стадиях являлись опухоли G2, 64,5% и 72,7% соответственно. В IV стадии чаще других встречались опухоли G3 степени дифференцировки, где их доля составила 44,4%, несколько реже, в 38,6% случаев встречались опухоли G2. Доля высокодифференцированных опухолей при II и IV стадиях была минимальной, составив 13,7% и 17,0% соответственно, тогда как в III стадии реже других встречались низкодифференцированные опухоли.

**Таблица 2.6** – Распределение больных по степени злокачественности опухоли, абс. ч. (%)

Степень злокачественности опухоли	Всего		II стадия (n=110)		III стадия (n=88)		IV стадия (n=153)	
	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %
Низкая степень	248	70,7	86	78,2	77	87,5	85	55,6
Высокая степень	103	29,3	24	21,8	11	12,5	68	44,4

При II и III стадиях преобладали опухоли низкой степени злокачественности, доля которых в 3,6 и 7 раза оказалась выше опухолей высокой степени злокачественности. В IV стадии доля опухолей высокой степени злокачественности незначительно преобладала над опухолями низкой степени злокачественности, составив 55,6% и 44,4%, соответственно.

Аденокарцинома кишечного типа, как гистологическая форма опухоли, в нашем исследовании преобладала, как среди всех больных, входящих в

исследование, так и при распределении по стадиям заболевания, составив в общей группе 81,0%, при II стадии – 86,4%, при III – 75,0%, при IV – 80,4%. Доля больных с гистологической структурой опухоли аденокарцинома в 20,3 раза превышала долю больных перстневидно-клеточным раком и в 5,4 раза долю больных, опухоль которых имела строение муцинозной аденокарциномы. При распределении по стадиям наблюдалась аналогичная тенденция, где опухолей по гистологической структуре, соответствующей перстневидно-клеточному раку, отмечено во II стадии – 3,6%, в III – 6,8% и IV – 2,6%. На долю больных с опухолью, соответствующей муцинозной аденокарциноме приходилось при II стадии – 10,0%, III – 18,2%, IV – 17,0%. Распределение больных колоректальным раком по гистологической структуре опухоли представлено в таблице 2.7.

**Таблица 2.7** – Распределение больных по гистологической структуре опухоли, абс. ч. (%)

Гистологическая структура опухоли	Всего		II стадия (n=110)		III стадия (n=88)		IV стадия (n=153)	
	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %	абс. ч.	отн., %
Аденокарцинома кишечного типа	284	81,0	95	86,4	66	75,0	123	80,4
Перстневидно-клеточный рак	14	4,0	4	3,6	6	6,8	4	2,6
Муцинозная аденокарцинома	53	15,0	11	10,0	16	18,2	26	17,0

Анализ распределения больных по уровню инвазии опухоли демонстрирует преобладание в исследовании больных, опухоль которых прорастала все слои стенки кишки с распространением в жировую клетчатку без поражения соседних органов (T3), доля которых составляла 57,3%. Опухоль с уровнем инвазии T1-T2 встречалась реже других, в 15,1% случаев. Полученные результаты распределения больных по TNM критериям классификации представлены в таблице 2.8. В исследовании в 2,0 раза чаще встречались больные с метастатическим поражением лимфоузлов, 67,0% против 33,0%. При этом доля больных с количеством метастатических лимфоузлов до 3-х включительно в 1,5 раза



превосходила долю больных, у которых выявлено поражение более чем 3-х лимфоузлов (40,5% против 26,5%).

**Таблица 2.8** – Распределение больных по TNM критериям классификации

Характеристики опухоли	Всего больных (n=351)	
	абс.	отн., %
Уровень инвазии опухоли		
pT1-T2	53	15,1
pT3	201	57,3
pT4	97	27,6
Статус лимфоузлов		
N0	116	33,0
N1	142	40,5
N2	93	26,5
Метастатический индекс поражения лимфоузлов		
≤ 0,25	64	27,2
> 0,25	171	72,8
Отдаленные метастазы		
M0	198	56,4
M1a	153	43,6

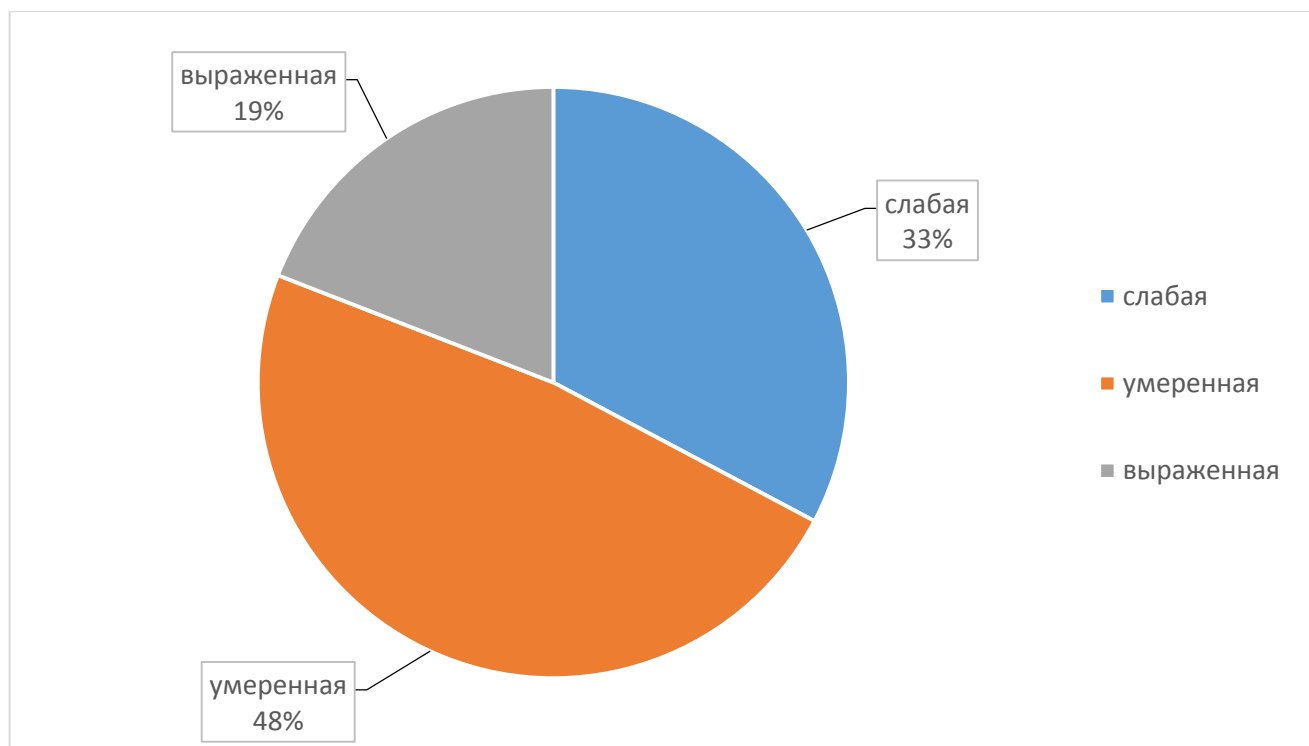
Нами был рассчитан метастатический индекс поражения лимфоузлов как соотношение количества пораженных лимфоузлов к общему числу исследованных. Была проведена категоризация соотношения лимфатических узлов, для оценки было выбрано предельное значение 0,25, поскольку 0,25 представляет количество метастатических лимфатических узлов из 12 исследованных лимфатических узлов (3/12), рекомендованных TNM системой классификации (Park I.J. et al., 2015). Метастатический индекс поражения лимфоузлов более 0,25 определялся в 2,7 раза чаще индекса поражения ≤ 0,25 (72,8% против 27,2%). В исследовании незначительно преобладали больные без метастатического поражения печени, 56,4% против 43,6%.

Нами оценены гистологические факторы неблагоприятного прогноза у больных, включенных в исследование. Так, наличие лимфоваскулярной и периневральной инвазии в опухоли выявлено в 89,7% и 83,8% случаев соответственно (таблица 2.9).

**Таблица 2.9** – Распределение больных по наличию лимфоваскулярной и периневральной инвазии в опухоли

Характеристики опухоли	Всего больных (n=351)	
	абс.	отн., %
Лимфоваскулярная инвазия		
есть	315	89,7
нет	36	10,3
Периневральная инвазия		
есть	294	83,8
нет	57	16,2

В исследовании преобладали больные, в опухоли которых отмечена умеренная степень лимфоцитарной инфильтрации, что составило 48%, тогда как больных со слабой и выраженной степенью лимфоцитарной инфильтрации было меньше в 1,5 и 2,5 раза соответственно (33,0% и 19,0%) (рисунок 2.2).



**Рисунок 2.2.** Диаграмма распределения больных колоректальным раком по степени лимфоцитарной инфильтрации опухоли, %

Мутации в гене *KRAS* выявлены у 163 (46,4%) из 351 исследованных больных, у 21,6% мутация G12D, у 15,9% – G13D. Мутация G12V, характерная для наиболее агрессивных опухолей обнаружена у 11 пациентов, у 7 из которых

выявлены регионарные и отдаленные метастазы. Частота мутаций G12S и G12E (*KRAS* ex2) составила 0,9%, а мутации A59E (*KRAS* ex3) и A146T (*KRAS* ex4) были выявлены у 2% пациентов (таблица 2.10).

**Таблица 2.10** – Спектр и частота мутаций в генах семейства *RAS* и *RAF*, и их ассоциация со стадией заболевания и метастазированием

Мутация (ген, экзон)	Количество пациентов (n=351)		Стадия заболевания	Статус N	Статус M
	абс.	отн., %			
<i>KRAS</i> ex2 G12D	22	6,2	III	+	0
<i>KRAS</i> ex2 G12D	54	15,4	IV	+	+
<i>KRAS</i> ex2 G13D	10	2,8	II	0	0
<i>KRAS</i> ex2 G13D	18	5,1	III	+	0
<i>KRAS</i> ex2 G13D	28	8,0	IV	+	+
<i>KRAS</i> ex2 G12S	3	0,9	II	0	0
<i>KRAS</i> ex2 G12V	7	2,0	IV	+	+
<i>KRAS</i> ex2 G12V	4	1,1	III	+	0
<i>KRAS</i> ex2 G12E	3	0,9	IV	+	+
<i>KRAS</i> EX3 A59E	7	2,0	II	0	0
<i>KRAS</i> EX4 A146T	7	2,0	II	0	0
<i>NRAS</i> ex2 G12A	10	2,8	III	+	0
<i>NRAS</i> ex2 G13C	10	2,8	II	0	0
<i>BRAF</i> V600	7	2,0	II	0	0
Всего мутаций в гене <i>KRAS</i>	163	46,4	II-IV	-/+	-/+
Всего мутаций	190	54,1	II-IV	-/+	-/+
Нет мутаций	161	45,9	II-IV	-/+	-/+

В нашем исследовании всем пациентам был проведен молекулярно-генетический анализ 2-го и 3-го экзона гена *NRAS*. В 20 случаях из 351 были выявлена мутации во 2-ом экзоне, что составило 5,6%: G12A у 10 пациентов и G13C у 10 пациентов. При обследовании 351 больных мутация в 15-м экзоне гена *BRAF* была выявлена у 7 человек, что составило 2%. Изменение в гене *BRAF* представлено единственным вариантом – заменой валина на глутаминовую кислоту в 600 кодоне (V600E). Это самая распространенная мутация в 15-м экзоне гена *BRAF* при КРР. В данном исследовании мутация V600E была обнаружено у 7 пациентов II стадии заболевания (таблица 2.10).

В данной работе при интерпретации данных проводили сравнительное исследование фрагментов 5 микросателлитных маркеров в опухолевом образце. Классификацию по критерию микросателлитной нестабильности проводили исходя из рекомендаций Рабочей группы по микросателлитной нестабильности (MSI) Национального института рака (США). Высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) обладали опухоли, если образец имел микросателлитную нестабильность по двум и более маркерам из панели. Опухоль с отсутствием микросателлитной нестабильности (MSS) не показывала вариабельности по длине микросателлитов при сравнении образца опухолевой и нормальной ткани. В группу низкого уровня микросателлитной нестабильности (MSI-L) относили образцы, в которых только один из пяти тестируемых маркеров демонстрировал MSI.

Микросателлитная нестабильность была диагностирована у 41 (11,7%) пациентов. Высокий уровень микросателлитной нестабильности (*MSI-H*) детектирован у 34 (9,7%) пациентов, у 7 (2%) определен статус низкой микросателлитной нестабильности (таблица 2.11).

**Таблица 2.11** – Уровень микросателлитной нестабильности в опухолевых тканях больных раком ободочной кишки

Уровень микросателлитной нестабильности	Количество пациентов (n=351)	
	абс.,	отн., %
MSI-H	34	9,7
MSI-H+ <i>BRAF</i>	4 (из 34)	1,1
MSI-H+ <i>KRAS</i> EX2	3 (из 34)	0,9
MSI-L	7	2,0
MSS	310	88,3

У 7 пациентов MSI-H сочеталась с мутациями: в 3 случаях с мутацией в гене *KRAS* (ex2) и в 4 случаях с мутацией в гене *BRAF*. Ткани опухоли у 310 пациентов оставались микросателлитно стабильными (MSS). Связи уровня микросателлитной нестабильности со стадией заболевания, регионарным или отдалённым метастазированием на данной выборке пациентов не проводилось из-за малого количества больных.

### 2.3. Методы исследования

#### Методика иммунологического исследования опухоли и периферической крови методом проточной цитометрии и ИФА

Иммунологическое исследование экспрессии маркеров в ткани опухоли проводили на свежееудаленном операционном материале. Для подготовки тканей использовали дезагрегирующее устройство BD Medimachine, время дезагрегации составляло 60 сек. Суспензию извлекали с помощью шприца и фильтровали через Filcon с 50 мкм порами. После центрифугирования суспензии 5 мин при 250g клетки инкубировали при комнатной температуре в темноте 20 минут с 5мкл моноклональных антител (Becton Dickinson, USA). Диагностическая панель включала CD4 FITC, CD127 PE, CD45 PerCP-Cy5.5, CD3 PE-Cy7, CD56 APC, CD25 APC-Cy7, CD16 PE, CD19 APC, CD45 APC-Cy7, CD45RA FITC, CD62L PE, CD45RO APC, CD8 APC-Cy7, CD44 FITC, CD133 PE, CD3 PerCP, CD8 PE-Cy7, CD335 APC, CD279 FITC, CD274 PerCP-Cy5.5, CD4 PE-Cy7, HLA-ABC FITC, HLA-E PE, CD326 APC.

Забор периферической крови для иммунологического исследования производился натощак с 8 до 10 часов утра до проведения оперативного вмешательства. В качестве антикоагулянта использовался гепарин (50 U/ml). Клетки инкубировали при комнатной температуре в темноте 20 минут с 5мкл моноклональных антител (Becton Dickinson, USA). Диагностическая панель антител включала CD3 FITC, CD16+56, CD45 PerCP-Cy5.5, CD4 PE-Cy7, CD19 APC, CD8 APC-Cy7, CD4 FITC, CD127 PE, CD3 PerCP, CD25 APC, CD45RA FITC, CD45RO PE, CD8 APC, CD62L PE, CD8 FITC, CD38 PE, HLA-DR PE-Cy7, Granzyme B FITC, CD16 PE, CD19 PerCP-Cy5.5, CD56 PE-Cy7, Perforin Alexa Fluor 647, CD45 APC-Cy7, CD335 APC, CD4 PE, CD8 PerCP-Cy5.5, CD69 PE-Cy7, CD95 APC. Подготовка проб осуществлялась по методике окрашивание-лизис-отмывка. Лизирование и отмывку проводили с использованием прибора Lyse-Wash assistant.

Анализ антигенной экспрессии проводили на проточном цитометре FACSCantoII (Becton Dickinson, USA). В случае ткани исследовалось не менее

1000 тыс. событий, крови - не менее 30 тыс. событий. Мониторинг стабильности работы прибора осуществлялся с помощью калибровочной системы 7-color Setup Beads (BD, USA). Долю клеток, положительных по тому или иному маркеру вычисляли в процентах. Обязательным условием являлась оценка экспрессии изучаемых маркеров на клетках внутреннего отрицательного контроля.

Для определения фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови использовали диагностические наборы Phagotest и Phagoburst производства ORPEGEN Pharma (BD Bioscience). К образцам крови исследуемого и контрольного образцов добавляли по 20 мкл суспензии опсонизированных и окрашенных флуорохромом (FITC) бактерий E.coli. После инкубации к обеим пробам добавляли по 100 мкл «гасящего» раствора, встряхивали на вортексе, затем вносили по 3 мл охлажденного до 4°C отмывочного раствора, встряхивали и центрифугировали в течение 6 минут (200 g, 2°C). Для определения активности кислородного взрыва в пробы вносили дополнительно по 20 мкл раствора fMLP (низкий контроль) и раствора PMA (высокий контроль) и после встряхивания и 10-минутной инкубации при 37° С добавляли 20 мкл раствора субстрата, перемешивали и инкубировали 10 мин при 37° С. Далее, после процедур отмывки-лизирования-отмывки-окрашивания, проводили анализ образцов на проточном цитометре.

Для оценки сывороточного уровня различных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, ИНФ- $\gamma$ , ИНФ- $\alpha$ ) использовали метод ИФА с тест-системами производства «Вектор-Бест» (Новосибирск) и «Цитокин» (С-Петербург), результаты выражали в пг/мл.

#### **Метод детекции и сепарации циркулирующих опухолевых клеток**

Детекцию ЦОК проводили с использованием системы Veridex CellSearch™, (JanssenDiagnostics, LLC). Кровь в объеме 8-10 мл забиралась в пробирки CellSave Preservative Tube, содержащие антикоагулянт ЭДТА, а также реагент для сохранения жизнеспособности опухолевых клеток. Забор крови осуществляли до проведения оперативного вмешательства. Для отделения клеток крови и опухолевых от плазмы, кровь смешивалась с рабочим буфером из набора

реагентов CellSearch® CTC kit и центрифугировалась при ускорении 800g в течение 10 минут. Далее образцы переносились в аппарат CellTracks® AutoPrep® System, который в автоматическом режиме, удаляя плазму крови и форменные элементы, иммуномагнитно обогащал образец микрочастицами железа, покрытыми антителами к маркерам адгезии эпителиальных клеток EpCAM, CD45 и цитокератинам 8,18,19. Качество работы системы оценивали с использованием стандартного контроля CTC control kit. Материал сканировали в анализаторе CellTracks® Analyzer II®. Оператором проводилась оценка клеток, положительно меченных по EpCAM, цитокератинам и DAPI и отрицательным по CD45. Максимальная разрешающая способность системы – детекция одной клетки в 7,5 мл крови. С учетом морфологических характеристик и экспрессии маркеров регистрировали циркулирующие опухолевые клетки. Общее число выявленных опухолевых клеток являлось конечным результатом.

Среди ЦОК-положительных пациентов 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®. 10 мл крови из пробирки CellSave Preservative Tube переносили в коническую центрифужную пробирку CELLSEARCH® на 15 мл, содержащую 6,5 мл PBS, 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% азида натрия. Образец центрифугировали при 800 g в течение 10 минут при комнатной температуре и обрабатывали в системе CELLTRACKS® AUTOPREP® в течение 1 часа. В результате иммуномагнитного обогащения опухолевые клетки, экспрессирующие молекулу адгезии эпителиальных клеток (EpCAM), без дополнительного окрашивания и подсчета клеток, а также после удаления лейкоцитов и других компонентов крови были выделены для последующих исследований.

#### **Метод иммуногистохимического исследования**

Материал для исследования фиксировали 10% нейтральным формалином в течение 24 ч., заливали в парафин, готовили срезы толщиной 3-4 мкм на ротационном микротоме Accu-Cut SRM 200 фирмы Sakura (Япония). Срезы

наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали вертикально в термостате при температуре 55-56°C в течение 10 ч.

Депарафинизацию, восстановление антигенной активности проводили в Thermo Scientific PT-модуле. Все этапы иммуногистохимической реакции, а также докраску гематоксилином проводили в иммуногистостейнере Thermo Scientific Autostainer 480 фирмы Thermo. В качестве системы детекции первичных антител была использована «Ultra Vision LP», а также «REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System».

Для иммуногистохимических реакций использовалась панель антител, представленная в таблице 2.12.

**Таблица 2.12** – Панель использованных в исследовании антител

Специфичность	Клон	Фирма	Разведение	Буфер для «демаскировки антигенов»
CD133	SP35	Cell Marque	1:100	PT Module Buffer 4, (100x-Tris EDTA pH=9,0)
CD44	SP7	Thermo scientific	1:250	PT Module Buffer 4, (100x-Tris EDTA pH=9,0)
ALDH1	C8/144B	Cell Marque	1:70	PT Module Buffer 4, (100x-Tris EDTA pH=9,0)
ZEB1	123C3.D5	Cell Marque	1:200	PT Module Buffer 4, (100x-Tris EDTA pH=9,0)

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. Оценка результатов иммуногистохимической реакции проводилась с применением светового микроскопа «AxioLab.A1» (Германия) при увеличении объектива  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ .

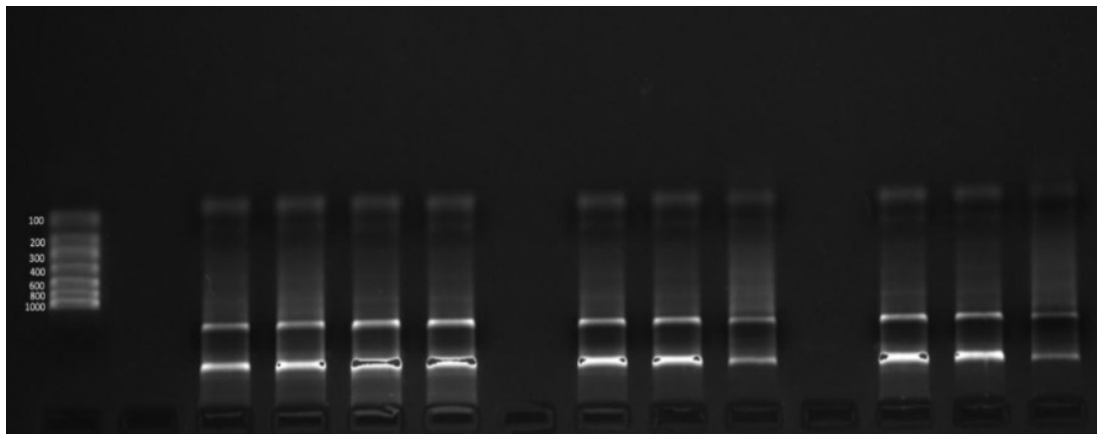
Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты оценивали между опухолевыми клетками, подсчет вели в 5 полях зрения при увеличении объектива  $\times 400$ , среднее значение лимфоцитов вычисляли как общее количество лимфоцитов, деленное на 5 (Rozek L.S. et al., 2016; Олейникова Н.А., Мальков П.Г., Данилова Н.В., 2020). Результаты представляли в виде качественной оценки инфильтрации: слабой



(<40), умеренной (40-80), выраженной ( $\geq 80$ ) (Nazemalhosseini-Mojarad E. et al., 2019).

### Молекулярно-генетические исследования

*Экстрагирование препаратов тотальной РНК.* Фрагменты тканей толстой кишки, удаленные во время оперативного вмешательства, измельчали одноразовым стерильным скальпелем и помещали в пробирки с лизирующим раствором, содержащем гуанидин изотиоцианат, цитрат натрия, саркозил и ДТТ. Пробирки охлаждали до 0°C и помещали в MagNa Lyser для гомогенизации. Дальнейшее выделение тотальной РНК осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции. После чего РНК для очистки от примесей геномной ДНК обрабатывали ДНК-азой-1. Качество тотальной РНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле по уровню интенсивности полос 18S и 28S (их соотношение 1:1 свидетельствует об отсутствии значительной деградации молекул РНК) (рисунок 2.3).



**Рисунок 2.3.** Визуализация в системе GelDoc XR PLUS результатов электрофореза РНК

*Определение уровня экспрессии микроРНК методом ПЦР в режиме реального времени.* Выделенную тотальную РНК подвергали обратной транскрипции совмещенной с реакцией полиаденилирования. Уровень полученной кДНК оценивали с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Дизайн синтетических олигонуклеотидов осуществляли с использованием алгоритма Balcells I. (Balcells I. et al., 2011). Реакционная смесь для обратной транскрипции содержала: 1x поли(А) буфер, 10 U/мкл Reverse Transcriptase

MMLV, 0,1 mM dNTPs), 0,1 mM АТФ, 1 μM RT-праймера, 0,5 U/мкл Poly(A)-полимеразы и 1 мкг тотальной РНК. Смесь инкубировали 15 минут при 16°C и 15 мин. при 42 °C, а затем обратную транскриптазу инактивировали нагреванием 90°C в течении 5 минут.

Уровень представленности транскриптов микроРНК определяли методом RT-qPCR. Амплификацию проводили в 20 мкл PCR-смеси: 1x PCR-буфер, 0,25 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 500 нМ прямого и обратного праймеров. Для амплификации использовали следующую программу: 2 минуты - 94°C, 50 циклов: 95°C - 10 секунд, 64°C -20 секунд.

Уровень экспрессии микроРНК ( $R_m$ ) рассчитывали по формуле  $R_m = E^{-\Delta\Delta Ct}$ . Нормализацию результатов проводили по референсным локусам и уровню экспрессии соответствующих микроРНК в образцах контрольной группы.

*Оценка транскрипционной активности генетических локусов.* Синтез кДНК осуществляли в реакционной смеси следующего состава: 5000 нМ случайных праймеров, 1x RT-буфер, 500 мкМ dNTP, 0,4 ед. акт./мкл ингибитора РНКаз, 5 ед. акт/мкл ревертазы MMLV и суммарная РНК. Программа синтеза была следующей: 40°C в течении 60 минут, 90°C в течение 5 минут.

Методом RT-qPCR определяли величины относительной экспрессии генетических локусов. В качестве референсных генов использовали – *GAPDH*, *ACTB* и *B2M*. ПЦР амплификацию проводили в реакционной смеси, состоящей из 1x PCR-буфера, 200 мкМ dNTP, 150 мкМ MgCl<sub>2</sub>, 600 нМ праймеров, 0,1 ед. акт./мкл Taq-полимеразы и 15-20 нг кДНК, в термоциклере CFX 96 (Bio-Rad, США) по следующему протоколу: 95°C – 240 секунд; 40 циклов: 95°C – 10 секунд, 58°C – 30 секунд и 72°C – 30 секунд. Транскрипционную активность генетических локусов (RE) рассчитывали по формуле  $RE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  (нормализация результатов проводилась по 3 референсным локусам (*GAPDH*, *ACTB* и *B2M*) и уровню экспрессии соответствующих генов мишеней в образцах контрольной группы).

*Дизайн синтетических олигонуклеотидов, расчёт эффективности амплификации и выбор стабильных референсных генов.* Все синтетические

олигонуклеотиды (праймеры) для ПЦР были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия). Для каждого генетического локуса и микроРНК проводился подбор 3-5 пар последовательностей олигонуклеотидов, из которых в конечное исследование брали только имеющие наиболее высокую эффективность обратной транскрипции и амплификации.

Эффективность обратной транскрипции ( $E_T$ ) рассчитывали по значениям пороговых циклов  $C(t)$ , полученных при амплификации синтетических аналогов микроРНК и мРНК, взятых в известной концентрации.

Эффективность амплификации ( $E_a$ ) определяли с помощью построения калибровочной кривой, используя для анализа разведения соответствующих кДНК.

Стабильность референсных генов определяли по алгоритму geNorm, предложенному Vandesompele и соавт. (2002). Первичный перечень референсов для микроРНК включал miR-191 (Peltier H.J., Latham G.J, 2008), экспрессия которой наиболее стабильна в 13 тканях, и U6 (традиционно используется в качестве эталона для нормализации данных по экспрессии микроРНК). Первичный перечень референсов для мРНК включал *GAPDH*, *ACTB*, *B2M* и *HMBS*. С помощью алгоритма geNorm для нормализации данных экспрессии микроРНК был выбран U6, для нормализации данных экспрессии мРНК - *GAPDH*, *ACTB* и *B2M*.

*Анализ данных, полученных методом ПЦР.* Анализ данных по экспрессии мРНК и микроРНК, полученных методом RT-qPCR, проводился на языке программирования Python (библиотека SciPy) (Jones E. et al., 2001): межгрупповые различия оценивались с использованием U-критерия Манна-Уитни и поправки Бонферрони.

### **Биоинформационный анализ данных**

*Анализ данных множественного параллельного секвенирования микроРНК.* Определение уровня экспрессии микроРНК с использованием технологии NGS представляет собой сравнение нуклеотидной последовательности секвенированных молекул кДНК в каждом образце с известными нуклеотидными

последовательностями микроРНК, представленными в базах данных miRBase/mirGeneDB. Число проанализированных молекул кДНК менялось от 143 тысяч до 1 миллиона на образец, из которых порядка 2% являлось зрелой микроРНК. Примененный к анализу данных подход основан на алгоритме, реализованном в miRanalyzer (Hackenberg M. et al., 2009).

*Алгоритм DESeq2.* Для анализа данных NGS по дифференциальной экспрессии микроРНК использовали алгоритм DESeq2. Программный код был реализован в среде программирования R i386 4.0.0 (Love M.I. et al., 2014). В алгоритме DESeq2 используются отрицательные биномиальные обобщенные линейные модели; оценка дисперсии и изменения логарифмической кратности. Была проведена нормализация сравниваемых библиотек методом RLE - Relative Log Expression, необходимая для учета влияния интегральной экспрессии микроРНК на экспрессию сравниваемых микроРНК. При оценке статистической значимости различий использовали тест Вальда. Метод оценки вероятности появления ложнопозитивных результатов (false discovery rate (FDR, Benjamini-Hochberg)) использовали для учета множественности сравнений.

*Поиск генов-мишеней* для исследуемых микроРНК проводился в программной вычислительной среде R 4.1.2 и пакета «multiMiR». Выбор отдавался тем парам микроРНК-ген, взаимодействия которых имели валидированный статус в базах данных miRecords, miRTarBase и TarBase. Анализ сигнальных путей выполнялся 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 by, США).

Оценку распределения величин и отличие от нормального распределения анализировали по критерию Шапиро-Уилка (модуль частотного анализа Statistica 12). При расчете вариационной статистики использовали модуль описательной статистики Statistica 12 с расчетом средней величины ( $M$ ), ее ошибки ( $m$ ), медианы ( $Me$ ) и межквартильного диапазона  $[Q_{25}; Q_{75}]$ . При наличии

нормального распределения показателей для оценки статистической значимости различий использовали критерий Стьюдента-Фишера, при отсутствии нормального распределения – критерий Манна-Уитни.

При сравнении средних величин независимых выборок критерием значимости различий было значение  $p \leq 0,05$ . Различие средних величин между двумя группами оценивали по критерию Манна-Уитни, в динамике наблюдения – с помощью критерия Вилкоксона (модуль Непараметрические критерии в программе Statistica 12). Различие средних величин между тремя и более группами оценивали по результатам дисперсионного анализа с применением непараметрического критерия Краскела-Уоллиса и попарного сравнения с учетом поправки на число сравниваемых групп (поправка по Бонферрони) (модуль Непараметрические критерии в программе Statistica 12).

Для коррекции множественного сравнения рассчитывалось значение  $Q$ , которое является аналогом FDR (False Discovery Rate) значения  $P$  (Benjamini and Hochberg, 1995). Мы применили метод Бенджамини-Хохберга, реализованный в функции «*p.adjust*» на языке R для преобразования значений  $P$  в значения  $Q$ .

Тесноту связи различных количественных показателей при нормальном распределении определяли с помощью корреляционного анализа с применением коэффициента Пирсона (модуль корреляционного анализа) и при распределении отличном от нормального или при номинальных переменных с помощью рангового коэффициента Спирмена (модуль Непараметрические критерии в программе Statistica 12).

Оценку различия долей качественных признаков между группами определяли по критерию Пирсона  $\chi^2$  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 после операции использовали метод логистической регрессии (модуль логит-регрессии в модуле Нелинейной аппроксимации зависимости в программе Statistica 12) и ROC анализа (одноименный модуль в MedCalc 19.3.0). ROC-анализ применяли для определения

разделительного уровня количественного показателя при выборе альтернативного заключения о риске неблагоприятного события (смерть, метастазирование). Диагностическую эффективность прогностических тестов оценивали с помощью анализа ROC-кривых и определения площади под ROC-кривой (AUC). Чем больше значение AUC, тем «лучше» способность диагностического теста распознавать высокий и низкий риск события.

Исследовали динамику выживаемости, свободной от неблагоприятных событий. Максимальный срок наблюдения за пациентами составил 90 мес. (7,5 лет) после операции. Кумулятивная доля бессобытийной выживаемости (свободной от летального исхода и неблагоприятных событий) рассчитывалась к началу последовательных временных интервалов и отражала вероятность того, что пациент переживет соответствующий интервал времени и повторное событие не разовьётся при условии, что к его началу он был жив и повторное событие не произошло. Анализ бессобытийной выживаемости пациентов проводили с использованием метода множительной оценки Каплана-Майера (для полных и неполных наблюдений). Построение кривых Каплана-Майера наглядно отражало параметры выживаемости в зависимости от группы пациентов и ряда учтенных факторов. Различия между подгруппами по выживаемости изучены по критерию log-rank теста. Множественное сравнение динамики кумулятивной выживаемости пациентов сразу трех групп осуществлено по критерию Пирсона  $\chi^2$ .

В работе с помощью метода регрессионного анализа Кокса была проведена оценка влияния изменений изучаемых лабораторных параметров (рассматривали как предикторы) на риск развития неблагоприятного события и выживаемость больных. На начальном этапе влияние каждого предиктора рассматривали по отдельности без учета вариант. Затем ограничивали круг наиболее значимых по влиянию предикторов путем пошагового анализа в комплекс связанных показателей. На заключительном этапе проводили оценку влияния комплекса лабораторных параметров на риск развития неблагоприятного события и выживаемость больных.

При проведении регрессионного анализа Кокса по влиянию различных факторов на выживаемость учитывались следующие величины:

- стандартизированный коэффициент регрессии  $\beta$  (Beta) - отражает кратность соотношения между возрастанием риска события и изменением величины предиктора на условную единицу. Размер условной единицы зависит от дисперсии или разброса анализируемых показателей. Между стандартизированным коэффициентом регрессии  $\beta$  и риском события пропорциональная связь. От его знака (+ или -) зависит, повышает (положительное значение коэффициента) или снижает (отрицательное значение) прирост величины предиктора риск события;

- статистическая значимость различия стандартизированного коэффициента регрессии  $\beta$  от нуля (отсутствие влияния) оценивается по статистике Вальда (Wald). Чем выше значение Wald, тем более весомый вклад предиктора в изменение риска события;

- отношение шансов или exponent позволяет определить, насколько изменяется риск события при наличии предиктора. Если exponent  $>1$ , то это свидетельствует о том, что предиктор повышает риск события (неблагоприятное воздействие предиктора на выживаемость), а если exponent  $<1$ , то предиктор имеет протективное влияние на выживаемость.

Для анализа направленности и силы сопряжения между изучаемыми показателями и неблагоприятными событиями, летальными исходами строили таблицы сопряженности и рассчитывали критерий  $\chi^2$  с непараметрической поправкой Мантеля-Ханзеля на правдоподобие.

Силу ассоциации между номинальными переменными и летальным исходом (таблица сопряжения 2x2) анализировали с помощью коэффициента контингенции (ассоциации).

Оценку чувствительности диагностических и прогностических методов проводили на основании расчета диагностической чувствительности и специфичности по стандартным методам доказательной медицины.

## **ГЛАВА 3. ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ**

### **3.1. Частота выявления циркулирующих опухолевых клеток у больных раком ободочной кишки и их связь с клинико-морфологическими факторами прогноза**

Несмотря на значительные успехи в диагностике и лечении отдаленные метастазы остаются главной причиной смерти пациентов со злокачественными новообразованиями. Метастазирование - сложный процесс, который можно обобщить в четыре основных этапа: отделение опухолевых клеток от первичной опухолевой массы, интравазация кровеносных сосудов и попадание их в кровеносную систему, миграция ЦОК в кровотоке в течение различного периода времени, экстравазация в метастатическом органе-мишени и/или ткани, адаптация к новой среде, пролиферация, начало роста метастатической опухоли (Romano G., 2017).

Одним из факторов, влияющих на вероятность и частоту метастазирования, является уровень ЦОК в крови. Процесс метастазирования происходит в основном лимфогенным и гематогенным путями. Кроме основных характеристик опухоли, определяющих ее метастатический потенциал, таких как локализация, гистологическое строение, пролиферативный потенциал, иммунофенотип, молекулярно-биологические особенности, важными являются и те, что обеспечивают циркуляцию опухолевых клеток в кровотоке (Кит О.И. и соавт., 2017).

Последние достижения в области молекулярной диагностики позволяют получать информацию об опухолях с помощью «жидкостной биопсии» из 2 различных источников циркулирующей генетической информации: циркулирующих опухолевых клеток и внеклеточной опухолевой ДНК (Germano G. et al., 2018).

В прошлом были предложены различные модели метастазирования, от предположения об общем клоне происхождения как первичной опухоли, так и



метастазов, до гипотез полностью независимого генеза метастазирования и первичной опухоли (Allgayer H. et al., 2020). В большинстве случаев солидного рака, включая колоректальный рак, диссеминированные опухолевые клетки в крови или костном мозге можно обнаружить даже на ранних стадиях развития первичной опухоли (Sai B., Xiang J., 2018).

Большинство ЦОК погибает в течение нескольких часов, и лишь небольшая часть обладает способностью инициировать опухоль (Toyoshima K. et al., 2015). Есть основания предполагать, что небольшая популяция ЦОК, выживших в кровотоке является основными клетками, ответственными за метастазирование, за счет своих миграционных особенностей и способности инициировать рост опухоли. Кроме того, они также вовлечены в развитие рецидива заболевания, оставаясь в кровотоке в состоянии покоя некоторое время (Islam F. et al., 2015).

Прогностическая и предиктивная ценность ЦОК была показана для метастатического и неметастатического КРР (Seeberg L.T. et al., 2015; Bork U. et al., 2015). Радикальное хирургическое вмешательство и эффективное лечение уменьшают количество ЦОК, но их стабильное количество или повышение в периферической крови коррелирует с прогрессированием заболевания и резистентностью к терапии (Hiraiwa K. et al., 2008; Veyrone L. et al., 2021). Было установлено, что наличие ЦОК в периферической крови тесно связано с низкой безрецидивной и общей выживаемостью (Rahbari N.N. et al., 2010). Наличие ЦОК после радикальной операции указывает на худший прогноз у пациентов с ранним КРР (Thorsteinsson M., Jess P., 2011). Также сообщалось, что у пациентов с КРР I-II стадии рецидив рака был в значительной степени связан с обнаружением изолированных опухолевых клеток в региональных лимфатических узлах (Mescoli C. et al., 2012).

Несмотря на прогресс в ранней диагностике и улучшение эффективности адъювантной терапии, у многих пациентов КРР наблюдается прогрессирование заболевания и возникновение рецидива. Это подчеркивает необходимость поиска прогностических факторов в прогнозировании индивидуального риска рецидива заболевания.

Нами было проведено изучение частоты выявления и количества циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови 299 больных раком ободочной кишки и их связи с различными клинико-морфологическими и генетическими особенностями опухоли.

Результаты исследования показали, что ЦОК у больных раком ободочной кишки различных стадий выявлены в 62,9% случаев (у 188 из 299) в количестве от 1 до 402 клеток, тогда как отсутствие опухолевых клеток в периферической крови больных отмечено в 37,1% случаев (111 из 299). Анализ выявленных ЦОК проводился для уровня клеток от 1 до 3 ЦОК и выше 3 ЦОК. На долю больных с выявленными ЦОК от 1 до 3 и выше 3 приходилось равное количество больных, составив 50% (94 из 188).

Данные по количеству больных II-IV стадий с различным уровнем ЦОК представлены в таблице 3.1.

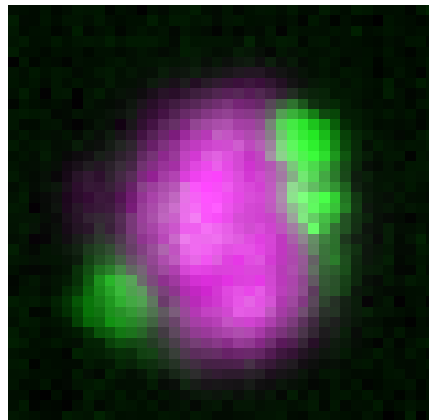
**Таблица 3.1** – Распределение больных раком ободочной кишки по уровню ЦОК в зависимости от стадии заболевания

Стадия заболевания	0 ЦОК		1-3 ЦОК		Более 3-х ЦОК		p ( $\chi^2$ )
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
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	

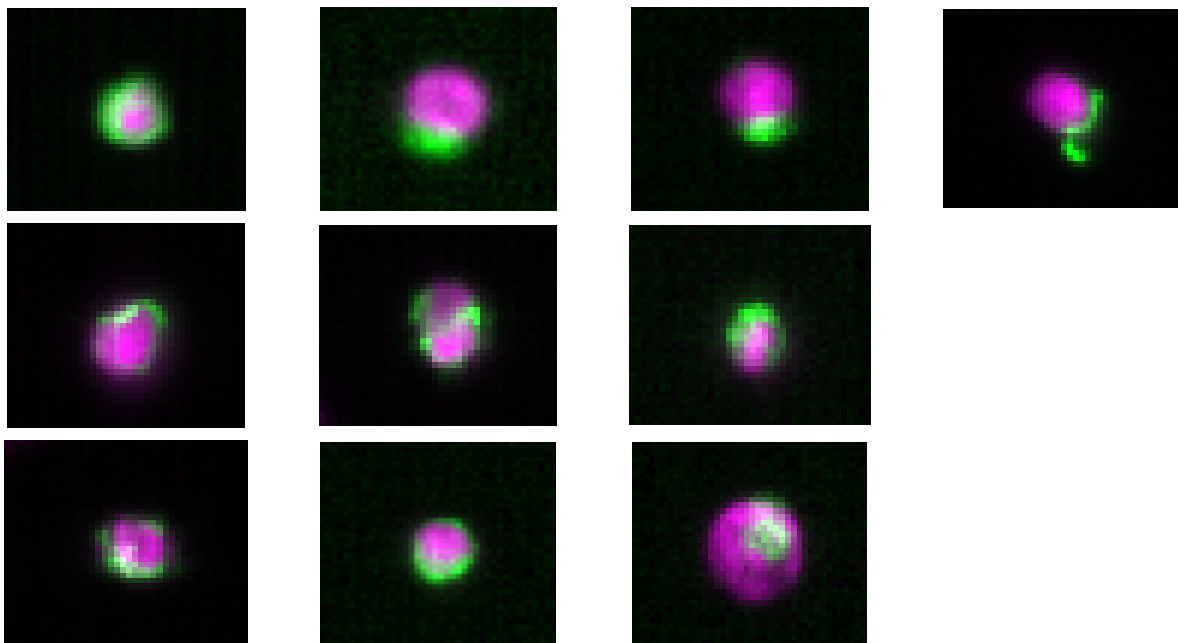
Из представленных в таблице 3.1 данных видно, что максимальной доля больных с отсутствием ЦОК была выявлена при II, составляя 60,9%, что превышало этот показатель III и IV стадий в 2,1 и 3,2 раза, соответственно. Доля больных с выявленными ЦОК II составила 39,1%, тогда как на долю таких больных III и IV стадий приходилось 71,6% и 81,2%. Частота выявления ЦОК в IV стадии возрастала в 2,1 раза в сравнении со II стадией и в 1,1 раза в сравнении с III стадией. В нашем исследовании в IV стадии преобладали больные с уровнем ЦОК свыше 3-х клеток, составляя 41,6%, что в 2,3 раза и 1,1 раза превосходило значения II и III стадий. Наиболее часто доля больных с уровнем ЦОК от 1 до 3 клеток выявлена также при IV стадии, что в 1,9 раза выше значений II стадии. Незначительные различия в частоте выявления от 1 до 3-х ЦОК выявлены в III и

IV стадиях. Нами выявлена статистически значимая связь количества ЦОК в периферической крови и стадии заболевания ( $p \leq 0,05$ ). Так, при увеличении стадии заболевания отмечено повышение частоты выявления ЦОК от II к IV стадиям и повышение доли больных с уровнем ЦОК выше 3.

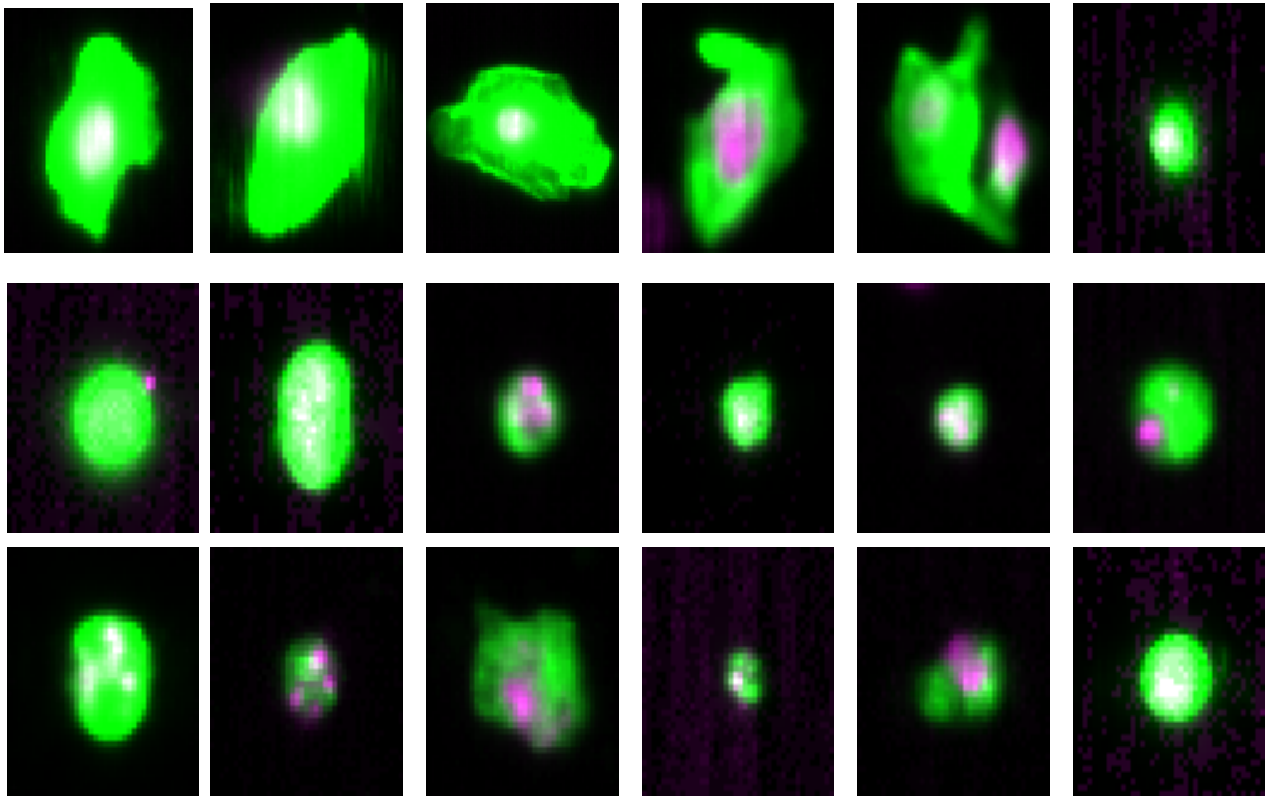
Разброс количества ЦОК при II стадии находился в пределах от 1 до 14 ЦОК, (Me:1; 1-14), при III стадии от 1 до 47 ЦОК, (Me:2; 1-47), при IV стадии от 1 до 402 ЦОК, (Me:2; 1-402). Полученные результаты количества ЦОК у больных различных стадий демонстрируют рисунки 3.1 - 3.3.



**Рисунок 3.1.** Больной А., 74 г. Диагноз: рак восходящего отдела ободочной кишки, G2 аденокарцинома, T3N0M0 ст. IIA. В периферической крови детектирована 1 ЦОК с иммунофенотипом CD45-CK8+CK18/19+



**Рисунок 3.2.** Больной У., 53 г. Диагноз: рак сигмовидной кишки, G3 аденокарцинома, T4N1M0, ст. III. В периферической крови детектированы 10 ЦОК с иммунофенотипом CD45-CK8+CK18/19+



**Рисунок 3.3.** Больная К., 78 л. Диагноз: рак сигмовидной кишки, G2 аденокарцинома, T4N2M1a, ст. IV. В периферической крови детектированы 18 ЦОК с иммунофенотипом CD45-CK8+CK18/19+, гетерогенные по морфологической структуре

Нами проанализирован уровень ЦОК по гендерному признаку. В таблице 3.2 отражено распределение количества больных в зависимости от уровня ЦОК в периферической крови и полом пациентов, не выявившее статистической значимости уровня ЦОК в зависимости от пола больных.

**Таблица 3.2** – Распределение больных в зависимости от количества ЦОК и пола

Пол больных	0 ЦОК		1-3 ЦОК		Более 3-х ЦОК		p ( $\chi^2$ )
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
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	

Наиболее часто в нашем исследовании ЦОК отсутствовали у больных в возрасте моложе 42-60 лет, где на их долю приходилось 43,8%, тогда как их наличие чаще встречалось в возрастной группе старше 70 лет, составляя 68,7%; несмотря на это, взаимосвязь между возрастом больных и уровнем ЦОК в нашем исследовании не была статистически значима (таблица 3.3).

**Таблица 3.3** – Распределение количества больных в зависимости от уровня ЦОК и возраста

Возраст больных, лет	0 ЦОК		1-3 ЦОК		Более 3-х ЦОК		p ( $\chi^2$ )
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
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	

В таблице 3.4 представлены данные по уровню выявленных ЦОК в зависимости от локализации опухоли.

**Таблица 3.4** – Анализ уровня ЦОК в зависимости от локализации опухоли

Локализация опухоли	0 ЦОК		1-3 ЦОК		Более 3-х ЦОК		p ( $\chi^2$ )
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Правая половина ободочной кишки (n=67)	21	31,3	24	35,9	22	32,8	p=0,246 ( $\chi^2=5.434$ )
Поперечно-ободочная кишка (n=93)	29	31,2	33	35,5	31	33,3	
Левая половина ободочной кишки (n=139)	61	43,9	37	26,6	41	29,5	

Как видно из данных, представленных в таблице 3.4, статистически значимых различий частоты выявления ЦОК в зависимости от локализации опухолевого процесса выявлено не было. Хотя, несколько чаще, в 1,4 раза ЦОК отсутствовали при локализации опухоли в левой половине ободочной кишки, в сравнении с другими отделами. При этом, частота выявления ЦОК в количестве 1-3 и более 3-х клеток при локализации опухоли в правой половине ободочной кишки и поперечно-ободочной кишке были практически одинаковы.

В нашем исследовании были выявлены различия по уровню ЦОК в зависимости от критериев классификации по системе TNM. Полученные результаты представлены в таблице 3.5.

Как демонстрируют данные, представленные в таблице 3.5, наиболее часто отсутствие ЦОК выявлено при pT1-T2, что в 1,2 и 4,4 раза выше данного показателя при pT3 и pT4, соответственно. Для pT4 характерным оказалась высокая частота выявления ЦОК, где на 7,4% чаще отмечалось присутствие от 1

до 3 ЦОК. Частота выявления от 1 до 3 – ЦОК и выше 3-х ЦОК при рТ3 не отличалась друг от друга. Несколько чаще, при рТ1-Т2 на 11,1% выявлены более 3-х ЦОК в сравнении с уровнем от 1 до 3-х клеток. При этом в 1,9 и 1,6 раза чаще ЦОК от 1-3 ЦОК и более 3-х ЦОК, определялись при рТ4, в сравнении с рТ1-Т2 и рТ3 ( $p \leq 0,05$ ).

**Таблица 3.5** – Анализ уровня ЦОК в зависимости от критериев TNM классификации

Характеристики опухоли	0 ЦОК		1-3 ЦОК		Более 3-х ЦОК		p ( $\chi^2$ )
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Уровень инвазии опухоли							
рТ1-Т2 (n=45)	24	53,3	8	17,8	13	28,9	p<0,001 ( $\chi^2=32,793$ )
рТ3 (n=172)	77	44,8	47	27,3	48	27,9	
рТ4 (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	

При анализе статуса лимфоузлов и уровня ЦОК выявлена статистически значимая взаимосвязь. Так, наиболее часто отсутствие ЦОК выявлено при N0, составляя 70,7%, тогда как наличие опухолевых клеток в периферической крови - при наличии поражения лимфоузлов, при N1 в 84,7% и при N2 в 83,3%. Половину случаев (50%) N2 составили больные с уровнем более 3-х клеток, тогда как максимальная частота выявления 1-3 ЦОК оказалась связана с N1 (46,0%). В целом, различия в выявлении ЦОК при метастатическом поражении лимфоузлов между собой выявлено не было. Доля больных с выявленными ЦОК при отсутствии метастатического поражения лимфоузлов в 2,9 и 2,8 раза меньше доли больных при N1 и N2 ( $p \leq 0,05$ ).

Наличие метастатического поражения печени в 2,1 раза повышает частоту выявления ЦОК: при метастазах в 60,1 раза чаще выявлены случаи с ЦОК более 3, в сравнении с M0 ( $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, проведенный нами анализ уровня ЦОК и критериев классификации по системе TNM показал статистически значимую связь по всем исследованным параметрам ( $p < 0,001$ ).

Представленные в таблице 3.6 данные не демонстрируют статистически значимой связи уровня ЦОК и гистологической структурой опухоли, а также уровня ЦОК и периневральной инвазии.

**Таблица 3.6** – Анализ частоты выявления ЦОК в зависимости от гистологических характеристик опухоли

Клинико-морфологические характеристики опухоли	0 ЦОК		1-3 ЦОК		Более 3-х ЦОК		p ( $\chi^2$ )
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
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 NOS (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	-	-	
Периневральная 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	

Анализ частоты выявления ЦОК в зависимости от степени дифференцировки опухоли демонстрирует отсутствие ЦОК или их наличие в количестве не более 3-х клеток в случаях G1 степени дифференцировки (таблица 3.6). Частота выявления ЦОК демонстрирует значимую связь со степенью

дифференцировки, где на долю больных с выявленными ЦОК при G1 приходится 13,0%, тогда как при G2 и G3, 67,9% и 79,5% соответственно ( $p \leq 0,05$ ). Такая же закономерность выявлена и для степени злокачественности опухоли, где наиболее часто ЦОК отсутствовали при низкой степени злокачественности опухоли (44,1%), тогда как их количество более 3-х клеток чаще встречалось при высокой степени злокачественности (46,5%) ( $p \leq 0,05$ ).

Напротив, при наличии лимфоваскулярной инвазии частота выявления опухолевых клеток в периферической крови была в 6,9 раза выше, чем при ее отсутствии. При этом случаев с ЦОК выше 3-х при отсутствии лимфоваскулярной инвазии нами зарегистрировано не было, а частота выявления ЦОК от 1 до 3 клеток при наличии инвазии опухоли сосудов в 3,4 раза выше, чем при ее отсутствии ( $p \leq 0,05$ ).

При умеренной и выраженной лимфоцитарной инфильтрации одинаково часто отмечено отсутствие ЦОК в крови, в 43,7% и 43,8% соответственно. Присутствие опухолевых клеток в периферической крови наиболее часто детектировалось в случае слабой лимфоцитарной инфильтрации, что в 1,4 раза выше частоты выявления ЦОК при умеренной и выраженной инфильтрации ( $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, исследование уровня ЦОК и клинико-морфологических характеристик опухоли продемонстрировало статистически значимую связь по некоторым параметрам: степени дифференцировки опухоли ( $p < 0,001$ ), степень злокачественности опухоли ( $p < 0,001$ ), лимфоваскулярной инвазии ( $p < 0,001$ ) и лимфоцитарной инфильтрации ( $p = 0,019$ ). Статистически значимой связи между периневральной инвазией, гистологической структурой и уровнем ЦОК выявлено не было.

Итак, в результате проведенного нами исследования по анализу частоты выявления и количества ЦОК в крови у больных раком ободочной кишки при различных клинико-морфологических характеристиках выявлены статистически значимые различия, определяющие инвазивный потенциал опухолевых клеток. Выявлена статистически значимая связь количества ЦОК в периферической крови



и стадии заболевания ( $p \leq 0,05$ ). Так, при увеличении стадии заболевания отмечено повышение частоты выявления ЦОК от II к IV стадиям и повышение доли больных с уровнем ЦОК выше 3. Показано сопряжение наличия ЦОК и их количества с уровнем прорастания опухоли в стенку кишки и подлежащие ткани, а также наличием метастатического поражения регионарных лимфоузлов и печени ( $p \leq 0,05$ ). 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 ( $p \leq 0,05$ ).

Локализация опухолевого процесса в различных отделах толстой кишки, пол и возраст больных не продемонстрировали значимых различий в зависимости от уровня ЦОК.

### **3.2. Влияние мутации в гене *KRAS* и уровня циркулирующих опухолевых клеток на прогрессирование рака ободочной кишки**

Как известно, мутации в гене *KRAS* ассоциированы с низкой общей выживаемостью при КРР и расцениваются как фактор негативного прогноза (Taieb J. et al., 2016). Наличие ЦОК, как показано в главе I, также служит отрицательным прогностическим признаком. Нами было выполнено исследование этих двух параметров у больных раком ободочной кишки различных стадий.

Проведенное нами исследование анализа мутационного статуса опухоли больных II-IV стадий, у которых в периферической крови 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. На долю больных II и III стадий с выявленными мутациями в гене *KRAS* приходилось, соответственно, 16,5% и 26,6% больных (23 из 139, и 37 из 139). При анализе количества ЦОК у больных с наличием мутации в гене *KRAS* получены следующие результаты (таблица 3.7).

**Таблица 3.7** – 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 ( $\chi^2$ )
	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	

Нами выявлены статистически значимые различия уровня ЦОК в крови и наличия мутации в гене *KRAS* в опухолевой ткани ( $p \leq 0,05$ ). Наиболее часто наличие мутации при отсутствии ЦОК выявлено во II стадии, в 56,5% случаев, тогда как доля больных с наличием мутации и отсутствием ЦОК в крови в IV стадии была наименьшей. Доля больных с наличием мутации и уровнем ЦОК от 1 до 3 клеток в III и IV стадиях была практически одинаковой, 37,8% и 38,0%, снижаясь во II стадии до 26,1%. 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.

Таким образом, проведенный анализ выявил у больных II стадии с наличием мутации в гене *KRAS* преобладание случаев с отсутствием ЦОК (более чем у 50% больных), доля больных с количеством ЦОК более 3-х являлась минимальной при этой стадии. Распределение доли больных по уровню ЦОК и наличию мутации в III стадии не имело выраженных отличий, как по отсутствию ЦОК, так и по их различному количеству, выявлено некоторое преобладание при уровне ЦОК от 1 до 3-х клеток. Напротив, у больных IV стадии и наличием мутации выявлено преобладание больных как с уровнем ЦОК от 1 до 3-х клеток, так и выше 3-х клеток, в сравнении с их отсутствием.

Ранее, нами было показано, что обнаружение ЦОК в периферической крови и активирующих мутаций в гене *KRAS* при раке ободочной кишки имеет ряд статистически доказанных взаимодействий: во-первых, чем больше количество ЦОК в крови, тем выше частота положительных мутаций *KRAS*, во-вторых, высокий процент ЦОК имеет прямую корреляцию с ранним метастазированием и

рецидивированием КРР (Кит О.И. и соавт., 2016). Нами разработан способ прогнозирования метастазирования при раке ободочной кишки (патент RU 2613142).

Данный способ заключается в том, что при отсутствии мутации гена *KRAS* и содержании циркулирующих опухолевых клеток более 10 в 7,5 мл крови прогнозируют метастазирование в 100% случаев, при наличии мутации гена *KRAS* и содержании циркулирующих опухолевых клеток более 5 в 7,5 мл крови прогнозируют метастазирование в 100% случаев.

Под наблюдением находилось 40 больных раком ободочной кишки без отдаленных метастазов (III стадии) в возрасте от 42 до 75 лет. Диагноз был верифицирован во всех случаях. Всем больным выполнена операция: резекция толстой кишки, в операционном материале проводилось исследование мутации гена *KRAS* в опухолевых клетках, в периферической крови - исследование уровня ЦОК. За больными проводилось интенсивное наблюдение. Каждые 3 месяца им проводили углубленное клиническое обследование, УЗИ органов брюшной полости, СРКТ или МРТ органов брюшной полости, рентгенографию или СРКТ органов грудной клетки.

При динамическом наблюдении в течение двух лет у больных с отсутствием мутации гена *KRAS* и уровнем ЦОК более 10 и больных с наличием мутации гена *KRAS* и уровнем ЦОК более 5 в 100% случаев за время наблюдения выявили развитие отдаленных метастазов и была определена связь повышенного уровня ЦОК и раннего метастазирования (в первые 18-24 месяца), преимущественно при наличии мутации гена *KRAS*.

Таким образом, в результате ретроспективного анализа данных о больных раком ободочной кишки III стадии и развития у них отдаленных метастазов, была выявлена связь повышенного уровня ЦОК и раннего метастазирования (в первые 18-24 месяца), так при наличии мутации гена *KRAS* и содержании циркулирующих опухолевых клеток более 5 в 7,5 мл крови метастазирование опухолевого процесса отмечено в 100% случаев (патент RU 2613142).

Приводим клинические примеры применения «Способа прогнозирования метастазирования при раке ободочной кишки».

### **Клинический пример 1.**

Больная Т., 1930 г.р., поступила в отделение абдоминальной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России с жалобами на запоры, примесь крови в кале, похудание, слабость.

При обследовании: ФКС – опухоль нисходящей ободочной кишки на 54 см от ануса. Гистоанализ: умереннодифференцированная аденокарцинома. Исследование мутации гена *KRAS* – мутации не обнаружено. Исследование циркулирующих опухолевых клеток крови выявило 2 клетки в 7,5 мл крови. При СРКТ органов брюшной полости выявлена опухоль в нисходящей ободочной кишке опухоль 8х6,7 см в диаметре.

После предоперационной подготовки выполнена операция: гемиколэктомия слева. Верификация процесса: гистоанализ – G3 аденокарцинома с прорастанием всех слоев стенки кишки, инвазией в жировую клетчатку, некрозы. В 2 лимфоузлах метастазы аденокарциномы.

Послеоперационный диагноз: рак нисходящей ободочной кишки T4N1M0, стадия III. Больной проведены курсы адьювантной химиотерапии по схеме FOLFOX. В течение срока наблюдения более 2 лет, при УЗИ и СРКТ контроле метастатического поражения отдаленных органов не выявлено.

### **Клинический пример 2.**

Больной У., 1962 г.р., поступил в отделение абдоминальной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России с жалобами на похудание, слабость, периодические боли в правой половине живота.

При обследовании: СРКТ – опухоль слепой кишки до 7 см, с инфильтрацией окружающей клетчатки. ФКС – опухоль слепой кишки. Гистоанализ – аденокарцинома. Исследование мутации гена *KRAS* – обнаружена мутация. Исследование циркулирующих опухолевых клеток крови выявило 10 клеток в 7,5 мл крови.

После предоперационной подготовки выполнена операция гемиколэктомия справа.

Верификация процесса: в слепой кишке – G3 аденокарцинома, инвазия всех слоев стенки кишки, жировой клетчатки, в 3 лимфоузлах метастазы аденокарциномы. Послеоперационный период протекал гладко.

Послеоперационный диагноз: рак слепой кишки T4N1M0, стадия III. Больному проведены курсы химиотерапии по стандартным протоколам лечения. При контрольном СРКТ - обследовании через год после операции у больного выявлено метастатическое поражение печени.

Полученные результаты позволяют заключить, что у больных с отсутствием мутации гена *KRAS* и содержанием ЦОК более 10 в 7,5 мл крови, а также с наличием мутации гена *KRAS* и содержанием ЦОК более 5 в 7,5 мл крови метастазирование в течение двух лет прогнозируется в 100% случаев. Использование данного способа позволяет прогнозировать течение опухолевого процесса, развитие отдаленных метастазов при раке ободочной кишки, индивидуализировать тактику лечения, проводить при необходимости химиотерапию, и уменьшить частоту развития отдаленных метастазов, прост в исполнении. Способ позволяет снизить затраты на лечение метастатического поражения при раке ободочной кишки (патент RU 2613142).

## **ГЛАВА 4. ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ НАЛИЧИИ И ОТСУТСТВИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ**

### **4.1. Характеристика факторов врожденного иммунитета больных раком ободочной кишки с различными стадиями заболевания и уровнем циркулирующих опухолевых клеток**

Кровоток является враждебным окружением для ЦОК, и, хотя, опухоль выбрасывает в него миллионы клеток ежедневно (Chang Y.S. et al., 2000), только единичные из них существуют достаточно продолжительное для их регистрации время. Это может быть связано с быстрым клиренсом, опосредованном НК-лимфоцитами, моноцитами и нейтрофилами. Тем не менее, в литературе высказывается и противоположное представление о том, что ЦОК способны к долгому выживанию в крови и инициации метастазов при условии формирования комплекса с нейтрофилами или моноцитами крови (Heeke S. et al., 2019). Дефект системы НК-клеток, относящихся к врожденному иммунитету, вызывает опухолевую прогрессию: например, у мышей-опухоленосителей в печени, богатой НК-клетками, их TRAIL-опосредованный апоптоз, способствует ее метастатическому поражению (Gkountela S. et al., 2019).

Наличие ЦОК оказывает влияние на факторы врожденного иммунитета при метастатическом раке молочной железы, предстательной железы, а также при колоректальном раке (Burz C. et al., 2018). В последнем случае установлена обратная взаимосвязь между уровнем ЦОК и цитотоксической активностью НК-клеток. ЦОК реализуют влияние на пути, опосредующие иммунный ответ, через угнетение Ki-67, c-myc,  $\beta$ -катенина и гиперэкспрессию CD47, что приводит к усилению метастатического каскада и сохранению ЦОК в крови в дормантном состоянии (Steinert G. et al., 2014). Их генетический профиль при этом оказался ближе к клеткам метастазов, чем первичной опухоли (Kidess-Sigal E. et al., 2016). Важнейшей стратегией выживания ЦОК в крови является экспрессия ими

иммуносупрессирующих молекул (PD-L1, CD47) (Wang X. et al., 2016), подавляющих и активность NK-клеток.

Фенотипически популяция натуральных киллеров разделяется по отсутствию/наличию экспрессии CD3–TCR рецептора на NK-клетки и NKT-лимфоциты (Stabile H. et al., 2017). Еще один вариант их классического деления основан на уровнях экспрессии CD16 и CD56 на CD56brightCD16dim и CD56dimCD16+. CD56dimCD16+ NK-клетки в крови составляют 90–95% всех натуральных киллеров, экспрессируют высокие уровни KIRs - маркера зрелых клеток CD57, и опосредуют перфорин/гранзим-зависимую и антитело-зависимую цитотоксичность, демонстрируя высокие уровни перфорина и выраженный киллерный эффект; CD56brightCD16dim NK в крови составляют 5–10%, характеризуются наличием NKG2A, низкими уровнями перфорина и высокой продукцией Th1-цитокинов IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (Bassani V. et al., 2019). Пока не решен вопрос о том, являются ли эти субпопуляции отдельными или представляют собой различные стадии созревания естественных киллеров (Michel T. et al., 2016). Есть данные, полученные *in vitro* и на моделях гуманизированных мышей, о том, что CD56bright NK-лимфоциты – незрелые клетки, способные дифференцироваться в CD56dim (Stabile H. et al., 2017; 2018).

У субпопуляций CD56dimCD16+ и CD56brightCD16dim NK-клеток описано различие по экспрессии CD62L и CCR7, уровень которой в первом случае высок, а во втором – низок; тем не менее, обе способны мигрировать из крови во вторичные лимфоидные органы, опухоли и очаги воспаления за счет наличия хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR3 (Hudspeth K. et al., 2016), хотя есть работы, подчеркивающие преимущественную значимость клеток CD56dimCD16+ для обеспечения цитотоксичности в тканях (Kannan G.S. et al., 2017; Nersesian S. et al., 2019). Однако в некоторых работах отмечено, что NK-клетки, присутствующие в тканях, развиваются локально (Sojka D.K. et al., 2014), причем описана отдельная субпопуляция децидуальных NK-клеток (dNK), способная к приобретению толерогенного и проангиогенного фенотипа (CD56superbrightCD16<sup>-</sup>VEGFhighPIGFhighCXCL8+) (Blois S.M. et al., 2011).

NKp46 (CD335) один из важнейших рецепторов, обеспечивающих цитотоксичность натуральных киллеров (Koch J. et al., 2013). Сигнал, проходящий через него, вызывает активацию NK-клеток как путем усиления продукции цитокинов, так и путем дегрануляции. На экспериментальной модели меланомы мышей обнаружено снижение NKp46 в крови и в селезенке опухоленосителей по сравнению с животными без опухолей (Isvoranu G. et al., 2019). В другой экспериментальной работе показано, что блокада PD-1/B7H1 пути с помощью ингибиторов контрольных точек стимулирует цитотоксичность CD335+ NK-клеток против стволовых клеток глиомы и может стать новым подходом к лечению (Huang B.Y. et al., 2015).

С учетом того, что ЦОК контактируют прежде всего с факторами врожденного иммунитета, нами были исследованы количественные и функциональные характеристики NK-клеточного и фагоцитарного звеньев при наличии и отсутствии ЦОК у больных раком ободочной кишки с различной распространенностью процесса.

#### **4.1.1. NK-клеточное звено у больных раком ободочной кишки с различными стадиями заболевания и различным уровнем циркулирующих опухолевых клеток**

Результаты, характеризующие цитотоксическое NK-клеточное звено вне зависимости от наличия или отсутствия ЦОК у больных раком ободочной кишки, представлены в таблице 4.1. Как видно из представленных в таблице 1 данных, их процентное содержание возрастает по мере увеличения распространенности опухолевого процесса, и у больных III стадии статистически значимо превышает показатель больных, имеющих II стадию заболевания ( $18,4 \pm 2,4$  против  $12,2 \pm 1,9$  %) ( $p \leq 0,05$ ). Статистически значимой разницы относительного содержания NK-клеток между II и IV, III и IV стадиями выявлено не было (доля NK-клеток в IV стадии составляла  $16,6 \pm 2,2\%$ ), хотя отмечена тенденция к увеличению доли CD16+56+клеток в IV стадии в сравнении со II.



Кроме того, не выявлено статистически значимых различий по количественным и функциональным показателям НК-клеток при различных стадиях рака ободочной кишки по показателям количества натуральных киллеров, содержащих перфорин, гранзим В, экспрессирующих CD335, а также уровней НК-клеток с различной экспрессией CD16 и CD56 (CD16dim56bright и CD16+56dim) и НКТ-клеток.

**Таблица 4.1** – Характеристика НК-клеточного звена иммунной системы у больных с различной распространенностью рака ободочной кишки вне зависимости от уровня ЦОК

Стадия	Доля клеток, %						
	CD16+56+	НК Т-лимфоциты	CD335+	CD16dim56bright	CD16+56dim	Granzyme B	Perforin
	от лимфоцитов		от НК-клеток				
II стадия	12,2±1,9	8,7±1,4	35,9±5,8	11,1±3,0	86,7±3,1	79,0±3,0	72,8±6,2
III стадия	18,4±2,4 ↑*	7,1±1,8	47,9±9,7	7,2±1,6	83,6±8,3	82,9±6,0	78,9±10,9
IV стадия	16,6±2,2	7,3±1,1	47,1±5,6	12,7±4,3	84,8±4,2	78,4±2,6	67,0±10,6

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

В таблице 4.2 представлены те же данные при наличии и отсутствии ЦОК, а также различного их количества вне зависимости от стадии заболевания. При наличии ЦОК отмечен статистически значимо более высокий уровень НКТ-клеток по сравнению с отсутствием ЦОК; при этом выявлены противоположные различия по уровню НК-лимфоцитов, который в данной группе оказался ниже, чем при отсутствии ЦОК. При ЦОК 1-3 и более 3-х клеток уровень НКТ-клеток также оказался статистически значимо выше, чем при 0 ЦОК. Отмечена тенденция к снижению доли НК-лимфоцитов при различных уровнях ЦОК в сравнении с их отсутствием. Наличие ЦОК сопровождается статистически более высокими уровнями CD16dim56bright клеток при более низком содержании CD16+56dim. Соотношение между клетками данных субпопуляций CD16+56dim/CD16dim56bright в 2,4 раза различается, составляя 6,3 для уровня >0 ЦОК и 15,3 для 0 ЦОК. Тенденцию к повышению демонстрирует также уровень CD335+ клеток при >0 ЦОК и 1-3 ЦОК, тогда как доля CD335+ клеток у больных с отсутствием ЦОК и более 3-х ЦОК была практически одинакова. Уровни

гранзим В- и перфорин-содержащих НК-клеток не различаются между наличием и отсутствием ЦОК, а также различными уровнями ЦОК.

**Таблица 4.2** – Характеристика 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+	CD16dim 56bright	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 ( $p \leq 0,05$ ).

В таблицах 4.3 - 4.5 приведены данные НК-клеточного звена иммунной системы у больных различных стадий при отсутствии и наличии различного уровня ЦОК. Как видно из представленных в таблице 4.3 данных, у больных II стадии обнаружено только одно статистически значимое различие в зависимости от наличия или отсутствия ЦОК, а также их различного уровня – уровень CD335+ НК-клеток, который при наличии ЦОК у больных был выше, и не зависел от их количества, чем при их отсутствии. Кроме того, выявлена тенденция к увеличению доли CD16dim56bright НК-клеток при наличии у больных ЦОК, и их количестве выше 3-х ЦОК, а также тенденция к снижению Granzyme В - экспрессирующих НК-клеток при наличии ЦОК и их количестве от 1 до 3 клеток.

**Таблица 4.3** – Показатели НК-клеточного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки II стадии при наличии/отсутствии ЦОК

Уровень ЦОК	Доля экспрессирующих клеток, %						
	CD16+56+	НК Т-лимфоциты	CD335+	CD16dim 56bright	CD16+ 56dim	Granzyme В	Perforin
	от лимфоцитов			от НК-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 ( $p \leq 0,05$ ).

Вычисление соотношения CD16+56dim/CD16dim56bright показало, что его значение при отсутствии ЦОК оказалось в 2,9 раза выше, чем при ЦОК более 0 (14,0 и 4,9 соответственно). При этом, соотношение CD16+56dim/CD16dim56bright при уровне ЦОК от 1-3 ЦОК против отсутствия ЦОК в 1,4 раза превышало данный показатель при уровне более 3-х ЦОК и отсутствии ЦОК (3,3 против 2,4).

Анализ показателей NK-клеточного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки III стадии при наличии/отсутствии ЦОК представлен в таблице 4.4. При III стадии заболевания выявлены статистически значимые различия по уровню NK-клеток, экспрессирующих Perforin при уровне ЦОК более 3-х клеток, в сравнении с отсутствием ЦОК. Кроме того, при уровне ЦОК более 3-х отмечена тенденция к снижению CD335+, а также повышению CD16+56dim NK-клеток в сравнении с отсутствием ЦОК (42,9±9,8% против 62,3±4,9%, 92,7±3,8% против 84,9±3,7%).

**Таблица 4.4** – 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 ( $p \leq 0,05$ );

Повышение в крови ЦОК более 3-х клеток сопровождалось снижением Granzyme B – экспрессирующих NK-клеток в сравнении с уровнем ЦОК от 1 до 3-х клеток (67,2±8,9% против 82,6±1,1%). Соотношение CD16+56dim/CD16dim56bright при отсутствии ЦОК у больных III стадии практически было одинаковым при наличии ЦОК и разном их уровне, составив при отсутствии ЦОК – 10,9, при их наличии – 10,6, при уровне от 1 до 3 ЦОК –

10,2. Несколько выше данный показатель был при уровне ЦОК более 3-х клеток – 12,5.

У больных IV стадией раком ободочной кишки обнаружены статистически значимые различия в экспрессии CD335+ в зависимости от наличия или отсутствия ЦОК, связанные со снижением их доли при наличии ЦОК. Выявлена тенденция к повышению Granzyme B клеток при уровне ЦОК выше 3-х в сравнении с 1-3 ЦОК (84,9±5,3% против 75,8±2,8%). Наличие ЦОК характеризуется статистически значимым снижением доли Perforin+ NK-клеток при наличии ЦОК, в основном при уровне их выше 3-х, в сравнении с отсутствием ЦОК (таблица 4.5).

**Таблица 4.5** – 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≤0,05).

Представленные в таблице 4.5 данные наглядно демонстрируют статистически значимые повышение и снижение доли CD16dim56bright и CD16+56dim NK-клеток соответственно, при наличии ЦОК в сравнении с их отсутствием у больных IV стадии раком ободочной кишки.

Соотношение CD16+56dim/CD16dim56bright при отсутствии ЦОК у больных IV стадии составило 38,7, тогда как при их наличии данное соотношение в 5,9 раза было меньше, составляя 6,6. При ЦОК от 1 до 3 клеток соотношение было несколько выше, чем при уровне ЦОК более 3-х, составляя соответственно, 8,2 и 5,5.

В таблицах 4.6 – 4.9 приведено сравнение исследованных показателей НК- звена у больных с разными стадиями заболевания и разным содержанием ЦОК.

Сравнение относительных значений CD16+56+ лимфоцитов и CD3+/CD16+56+ при различных стадиях заболевания, отсутствии ЦОК и наличии, в том числе при разных значениях представлено в таблице 4.6. Как видно из представленных в таблице 4.6 данных, нарастание стадии опухолевого процесса от II к IV сопровождается повышением доли CD16+56+ лимфоцитов при отсутствии ЦОК в крови, хотя разница значений не являлась статистически значимой. Напротив, доля НКТ-лимфоцитов снижается при увеличении стадии, где максимальное снижение отмечено при III стадии.

**Таблица 4.6** – Доля НК- и НКТ- лимфоцитов у больных раком ободочной кишки различных стадиях при наличии/отсутствии ЦОК

Уровень ЦОК	CD16+56+			CD3+/CD16+56+		
	II стадия	III стадия	IV стадия	II стадия	III стадия	IV стадия
0 ЦОК	13,9±2,9	16,9±3,7	18,5±2,6	10,6±2,3	4,6±2,3	7,2±1,4
>0 ЦОК	9,7±2,5	23,7±6,2 ↑*	17,7±2,2 ↑*	11,0±1,6	6,4±2,1	8,7±1,3
1-3 ЦОК	8,2±3,7	27,9±10,7	15,6±3,1	11,8±2,1	5,2±2,1 ↓*	9,3±2,1
ЦОК>3	11,8±3,8	18,1±3,7	20,0±3,2	10,1±2,8	7,9±4,7	7,9±1,2

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

Наличие ЦОК в крови ассоциировано с повышением доли CD16+56+лимфоцитов в 2,4 и 1,8 раза при III и IV стадиях в сравнении со II; разница являлась статистически значимой ( $p \leq 0,05$ ). При III стадии отмечена тенденция к снижению доли НКТ-лимфоцитов в III стадии в сравнении со II при ЦОК более 0.

Наличие в крови ЦОК от 1 до 3 клеток и более 3-х сопровождалось тенденцией к повышению доли CD16+56+ лимфоцитов при увеличении стадии; максимальные значения показателя отмечены в III стадии, что в 3,4 и 1,8 раза выше значений во II и IV стадиях. Анализ доли НКТ-лимфоцитов при наличии ЦОК от 1 до 3 клеток показал статистически значимое снижения доли

CD3+/CD16+56+ лимфоцитов при III стадии в сравнении со II, в 2,3 раза ( $p \leq 0,05$ ). При сравнении значений показателя в IV стадии выявлено его снижение в сравнении со II стадией, кроме того, отмечена тенденция к увеличению относительного содержания CD3+/CD16+56+ лимфоцитов в IV стадии в сравнении с III. Уровень ЦОК выше 3-х клеток сопровождался повышением и снижением доли CD16+56+ и CD3+/CD16+56+ лимфоцитов соответственно при увеличении стадии заболевания.

Нами проанализированы показатели CD16dim56bright и CD16+56dim лимфоцитов при различных стадиях рака ободочной кишки, отсутствии и наличии ЦОК. Полученные результаты представлены в таблице 4.7.

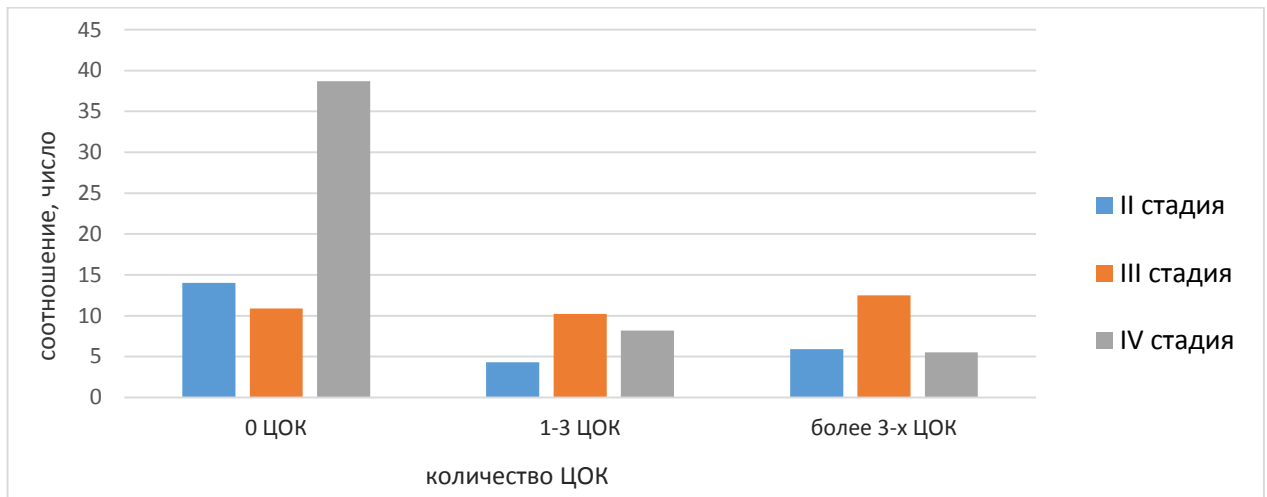
**Таблица 4.7** – Доля CD16dim56bright и CD16+56dim лимфоцитов у больных раком ободочной кишки различных стадиях при наличии/отсутствии ЦОК

Уровень ЦОК	CD16dim56bright			CD16+56dim		
	II стадия	III стадия	IV стадия	II стадия	III стадия	IV стадия
0 ЦОК	6,4±2,2	7,8±2,6	2,5±0,5	89,6±2,4	84,9±3,7	96,8±1,9 ↑*↑°
>0 ЦОК	16,5±5,3	8,5±0,9	12,3±5,1	81,4±5,5	89,7±3,5	81,2±6,0
1-3 ЦОК	18,4±9,3	8,7±1,3	9,7±3,5	79,1±9,6	88,6±0,6	79,4±7,3
ЦОК>3	14,2±2,5	7,4±2,5 ↓*	15,2±8,5	84,2±4,8	92,7±3,8	83,2±6,1

Примечания: \* - различия показателей статистически значимы по отношению к II стадии ( $p \leq 0,05$ ); ° - различия показателей статистически значимы по отношению к III стадии ( $p \leq 0,05$ ).

Из представленных в таблице 4.7 данных наглядно видно статистически значимое повышение доли CD16+56dim лимфоцитов при IV стадии в сравнении со II и III стадиями при отсутствии ЦОК. Напротив, по содержанию CD16dim56bright NK-клеток выявлена тенденция к их снижению при IV стадии в сравнении со II и III стадиями в случае отсутствия ЦОК в кровотоке. Напротив, наличие ЦОК в кровотоке и их уровень выше 3-х клеток сопровождался тенденцией к снижению CD16dim56bright NK-клеток в III стадии в сравнении со II.

Соотношение CD16+56dim/CD16dim56bright при отсутствии ЦОК и разном их количестве у больных раком ободочной кишки II-IV стадий представлено на рисунке 4.1.



**Рисунок 4.1.** Соотношение CD16+56dim/CD16dim56bright лимфоцитов у больных раком ободочной кишки II-IV стадий при различном уровне ЦОК

Так, соотношение CD16+56dim/CD16dim56bright при отсутствии ЦОК в IV стадии заболевания в 2,8 и 3,6 раза превышало данный показатель в II и III стадиях. Максимальные значения данного показателя при количестве ЦОК 1-3 клетки наблюдались у больных в III стадии, что в 2,4 и 1,2 раза было выше значения в II и IV стадиях соответственно. При уровне ЦОК соотношение CD16+56dim/CD16dim56bright у больных II и IV стадий было практически одинаковым, составляя 5,9 и 5,5, что в 2,1 и 2,3 раза было ниже данного соотношения в III стадии.

Кроме того, увеличение стадии заболевания при отсутствии ЦОК сопровождается статистически значимым повышением доли CD335+ лимфоцитов от II к IV стадии ( $p \leq 0,05$ ). Полученные результаты экспрессии CD335+ при различных стадиях опухолевого процесса, отсутствии и наличии ЦОК представлены в таблице 4.8.

**Таблица 4.8** – Доля CD335+лимфоцитов у больных раком ободочной кишки различных стадий при наличии/отсутствии ЦОК

Уровень ЦОК	II стадия	III стадия	IV стадия
0 ЦОК	18,4±4,7	62,3±4,9 ↑*	63,0±7,4 ↑*
>0 ЦОК	47,8±8,8	49,5±9,8	45,0±5,5
1-3 ЦОК	48,0±9,8	56,1±8,8	53,6±7,4
ЦОК>3	47,6±12,7	42,9±9,8	34,8±7,2

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

Нами также проанализированы показатели Granzyme B-содержащих и Perforin-содержащих натуральных киллеров при различных стадиях заболевания, отсутствии и наличии ЦОК, данные демонстрирует таблица 4.9.

Доля НК-клеток, содержащих Granzyme B, при IV стадии статистически значимо снижается в сравнении с III стадией при ЦОК от 1 до 3 клеток ( $p \leq 0,05$ ). Напротив, при уровне ЦОК более 3-х отмечена тенденция к повышению доли НК-клеток, содержащих Granzyme B в IV стадии в сравнении с III. При наличии ЦОК от 1 до 3 клеток выявлена тенденция к увеличению доли экспрессирующих Granzyme B НК-клеток при увеличении стадии заболевания со II к III.

**Таблица 4.9** – Доля Granzyme B-содержащих и Perforin-содержащих натуральных киллеров у больных раком ободочной кишки различных стадий при наличии/отсутствии ЦОК.

Уровень ЦОК	Granzyme B			Perforin		
	II стадия	III стадия	IV стадия	II стадия	III стадия	IV стадия
0 ЦОК	84,2±3,8	80,3±4,8	76,9±5,5	72,8±7,4	70,0±7,9	86,9±9,9°
>0 ЦОК	76,0±4,2	76,4±8,4	79,5±2,8	65,5±10,6	86,2±8,8	61,4±7,6 ↓°
1-3 ЦОК	73,4±6,3	82,6±1,1	75,8±2,8 ↓°	67,4±2,6	82,7±10,4	64,2±10,7
ЦОК>3	79,7±5,2	67,2±8,9	84,9±5,3	64,3±12,2	96,8±10,4 ↑*	58,7±10,1 ↓°

Примечания: \* - различия показателей статистически значимы по отношению к II стадии ( $p \leq 0,05$ ); ° - различия показателей статистически значимы по отношению к III стадии ( $p \leq 0,05$ ).

Доля НК-клеток, содержащих Granzyme B, при IV стадии статистически значимо снижается в сравнении с III стадией при ЦОК от 1 до 3 клеток ( $p \leq 0,05$ ). Напротив, при уровне ЦОК более 3-х отмечена тенденция к повышению доли НК-клеток, содержащих Granzyme B в IV стадии в сравнении с III. При наличии ЦОК от 1 до 3 клеток выявлена тенденция к увеличению доли экспрессирующих Granzyme B НК-клеток при увеличении стадии заболевания со II к III.

Доля НК-клеток, содержащих Perforin, имеет тенденцию к повышению при увеличении стадии со II к III, как в целом, при наличии ЦОК, так и при уровнях от 1 до 3 клеток и выше 3 ЦОК. Доля НК-клеток, содержащих Perforin, в IV стадии практически не отличалась от показателей II стадии, тогда как выявлены статистически значимое уменьшение доли НК-клеток, содержащих Perforin, у



больных IV стадии в сравнении с III при обнаружении ЦОК, за счет значений выше 3-х клеток ( $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, при нарастании стадии рака ободочной кишки вне зависимости от уровня ЦОК выявлено статистически значимое повышение уровня НК-клеток у больных III стадии в сравнении со II. Был также установлен ряд статистически значимых различий между больными с наличием и отсутствием ЦОК вне зависимости от стадии заболевания, связанных со снижением уровня НК- и возрастанием НКТ-клеток при наличии ЦОК. Кроме того, выявлено увеличение доли CD16dim56bright клеток при наличии ЦОК и их уровня более 3-х клеток, тогда как более высокие значения CD16+56dim клеток наблюдались при наличии ЦОК в количестве от 1 до 3-х клеток.

При II стадии наличие ЦОК вне зависимости от их количества сопровождалось статистически значимым повышением доли CD335+ клеток. При III стадии уровни ЦОК более 3-х клеток характеризовались статистически значимым повышением доли НК-клеток, экспрессирующих Perforin, в сравнении с отсутствием ЦОК. В IV стадии выявлено максимальное количество статистически значимых различий, а именно, наличие ЦОК сопровождалось снижением доли CD335+ клеток, повышением доли CD16dim56bright, снижением доли CD16+56dim снижением доли НК-клеток, экспрессирующих Perforin, что говорит о максимальном угнетении НК-звена при наиболее распространенном процессе, сопровождающемся наличием ЦОК.

При сравнении показателей в зависимости от отсутствия/наличия и разного уровня ЦОК при различных стадиях рака ободочной кишки обнаружено статистически значимое повышение НК-клеток в III и IV стадиях в сравнении со II при наличии ЦОК, а также снижение значений НКТ-клеток при наличии ЦОК от 1 до 3-х клеток в III стадии в сравнении со II. III стадия заболевания характеризовалась статистически значимым снижением доли CD16dim56bright клеток при уровне ЦОК более 3-х в сравнении со II стадией. Напротив, максимально высокие статистически значимые различия значений CD16+56dim клеток получены в IV стадии при отсутствии ЦОК, в сравнении со II и III

стадиями. Отсутствие ЦОК в III и IV стадиях сопровождалось статистически значимым повышением доли CD335+лимфоцитов, в сравнении со II стадией.

При IV стадии выявлены статистически более низкие значения доли НК-клеток, содержащих Granzyme B при уровне ЦОК от 1 до 3 клеток, а также доли НК-клеток, содержащих Perforin в отличие от III стадии. Напротив, при III стадии и уровне ЦОК более 3-х клеток выявлены статистически более высокие значения доли НК-клеток, содержащих Perforin, в отличие от II стадии.

Итак, полученные нами данные свидетельствуют о том, что наибольшее количество различий отмечено при разделении больных по наличию/отсутствию ЦОК вне зависимости от стадии. Наличие ЦОК характеризуется более высокими уровнями НКТ-клеток, хотя двойная градация по уровням ЦОК и по стадиям не выявила таких различий. При разделении по стадиям с учетом ЦОК максимальное количество отличий наблюдается у больных IV стадии. Они связаны с перераспределением субпопуляций натуральных киллеров в сторону повышения CD16dim56bright и снижения CD16+56dim, а также перфорин-содержащих клеток при нарастании уровня ЦОК.

В настоящее время в литературе сложилось двойственное мнение о роли НКТ-клеток при опухолях. Еще в начале XXI века считалось, что большая их часть обладает высоким цитолитическим потенциалом (Van Kaer L., 2004; Сепиашвили Р.И. и соавт., 2005). В дальнейшем накапливалось все больше данных о не столь однозначной функции НКТ-клеток, возможно, за счет их гетерогенности, отмеченной как у больных, так и у здоровых доноров, у которых уровень субпопуляции НКТ с фенотипом CD3+CD16/CD56+ составляет в среднем 7,1% с разбросом от 2,5 до 11,9%. Среди CD3- НК-клеток выявлены перфорин-содержащие CD56dimCD16dim и перфорин-негативные субпопуляции: CD56dimCD16bright, CD56-CD16+, CD56brightCD16- (Табакон Д.В., Заботина Т.Н., Борунова А.А. и соавт., 2017). Появились сведения об иммуносупрессивных свойствах НКТ-клеток, экспрессирующих CD8+ (Zhou L. et al., 2008), и позволяющих предположить их у CD28+CD57+ (Борисов А.Г., Савченко А.А., Кудрявцев И.В. и соавт., 2017).

В свете изложенного полученные нами различия по уровням NK- и NKT-клеток позволяют оценить их как более неблагоприятные при наличии ЦОК.

У обследованных нами больных для всех стадий раком ободочной кишки при наличии ЦОК оказался характерен более высокий уровень CD16dim56bright NK-клеток, а результаты, полученные по экспрессии CD335, перфорина и гранзима В, также характеризуют угнетение NK-клеточного звена при нарастании распространенности опухоли и уровня ЦОК.

#### **4.1.2. Фагоцитарное звено у больных раком ободочной кишки с различными стадиями заболевания и различным уровнем циркулирующих опухолевых клеток**

В литературе описаны многосторонние и неоднозначные взаимосвязи между уровнями и активностью гранулоцитов, моноцитов и ЦОК (Leone K. et al., 2018). Поскольку эти клетки белой крови относятся к факторам врожденной иммунной системы и обладают способностью к удалению генетически чужеродных клеток с помощью различных механизмов, предполагается их вклад в клиренс ЦОК. Так, показано, что экспрессия TLR2 и TLR4 моноцитами крови обратно коррелирует с уровнем ЦОК при РМЖ, КРР и раке предстательной железы (Santos M. F. et al., 2014). В эксперименте установлена роль моноцитов в препятствовании метастазирования опухолевых клеток в легкие путем защиты метастатических ниш с помощью секреции хемокинов CCL3, CCL4 и CCL5, привлекающих и активирующих NK-клетки (Hanna R.N. et al., 2015). Такая протективная функция приписывается авторами неклассическим «патрулирующим» моноцитам (Auffray C. et al., 2007), тогда как роль классических считается скорее протуморогенной.

Хотя есть экспериментальные данные о том, что нейтрофилы, как и моноциты накапливаются в премеастатических нишах в легких и с помощью продукции перекиси водорода способны к киллингу мигрирующих туда ЦОК, ингибируя таким образом метастазирование (Granot Z. et al., 2011), другие публикации свидетельствуют о том, что они, напротив, обладают туморогенным

действием (Pantel K. et al., 2016). IL-6, IL-1 $\beta$ , продуцируемые, в частности, нейтрофилами, повреждают ДНК, угнетают апоптоз и старение опухолевых клеток, вследствие чего являются инициаторами и промоторами канцерогенеза (Szczerba B.M. et al., 2019). Нейтрофилы поддерживают циркуляцию опухолевых клеток и стимулируют метастазирование через иммуносупрессию под влиянием гиперпродукции G-CSF (Kersten K. et al., 2017) и усиление неоангиогенеза (Coffelt S.B. et al., 2016).

Первичная опухоль способна секретировать G-CSF, стимулирующий гранулоцитопоз и миграцию нейтрофилов, участвующих в метастазировании опухоли (Shojaei F. et al., 2009). Выделение опухолевыми клетками IL-8, вовлекает нейтрофилы во взаимодействие с ЦОК, что стимулирует экспрессию рецепторов адгезии (интегринов и селектина) на эндотелии капилляров и способствует экстравазации ЦОК в органах-мишенях метастазирования (Spicer J.D. et al., 2012).

Результаты, характеризующие фагоцитарное звено врожденного иммунитета вне зависимости от наличия или отсутствия ЦОК у больных различных стадий, представлены в таблице 4.10.

**Таблица 4.10** – Характеристика фагоцитарного звена иммунной системы у больных с различной распространенностью рака ободочной кишки вне зависимости от уровня ЦОК

Показатели, %	Стадия заболевания		
	II	III	IV
Нейтрофилы	76,2 $\pm$ 2,0	79,8 $\pm$ 2,6	76,2 $\pm$ 1,8
Моноциты	4,7 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,3
% фагоцитирующих гранулоцитов	94,1 $\pm$ 2,1	85,3 $\pm$ 4,5	81,9 $\pm$ 4,1 $\downarrow$ *
% фагоцитирующих моноцитов	86,3 $\pm$ 4,1	81,8 $\pm$ 4,5	77,4 $\pm$ 3,9
Кисл. взрыв гранулоцитов (E.coli)	95,7 $\pm$ 1,5	72,7 $\pm$ 15,1	88,7 $\pm$ 6,7
Кисл. взрыв гранулоцитов (lowstim)	2,9 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 0,8	6,4 $\pm$ 1,3 $\uparrow$ * $\uparrow$ $^\circ$
Кисл. взрыв гранулоцитов (highstim)	88,9 $\pm$ 8,5	98,4 $\pm$ 0,8	93,0 $\pm$ 3,4
Кисл. взрыв моноцитов (E.coli)	79,8 $\pm$ 3,1	60,3 $\pm$ 15,2	66,3 $\pm$ 5,2 $\downarrow$ *
Кисл. взрыв моноцитов (lowstim)	5,4 $\pm$ 1,3	3,2 $\pm$ 1,2	14,0 $\pm$ 4,9 $\uparrow$ $^\circ$
Кисл. Взрыв моноцитов (high stim)	68,4 $\pm$ 12,3	78,1 $\pm$ 8,1	55,4 $\pm$ 8,1 $\downarrow$ $^\circ$

Примечания: \* - различия показателей статистически значимы по отношению к II стадии ( $p \leq 0,05$ );  $^\circ$  - различия показателей статистически значимы по отношению к III стадии ( $p \leq 0,05$ ).

Как видно из таблицы 4.10, при увеличении распространенности рака ободочной кишки не отмечено изменения относительного содержания в крови гранулоцитов и моноцитов, однако, при исследовании их функциональной активности такие различия выявлены. Так, по результатам Phagotest происходит снижение процента фагоцитирующих гранулоцитов, статистически значимое для IV стадии по сравнению с II. Одновременно по результатам Phagoburst отмечено повышение показателя кислородного взрыва гранулоцитов под действием низкостимулирующего агента – хемотактического пептида fMLF (*N*-formyl-MetLeuPhe) при отсутствии его изменений под действием высокостимулирующего - фоболмиристацетата (ФМА) и *E.coli*.

Результаты тех же тестов для моноцитов продемонстрировали снижение активности реакций кислородного взрыва в них при генерализованном раке по сравнению с местно-распространенным. Если при III стадии снижение продукции супероксид-аниона под действием *E.coli* по сравнению со II стадией сопровождалось некоторым повышением показателя Phagoburst- теста при стимуляции ФМА и снижением ответа на fMLF, то при IV стадии наблюдалось статистически значимое угнетение кислородного взрыва под действием *E.coli* и ФМА при выраженном повышении ответа на fMLF.

В таблице 4.11 представлены те же данные при наличии и отсутствии ЦОК вне зависимости от стадии заболевания.

**Таблица 4.11** – 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
1	2	3	4	5
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 ( <i>E.coli</i> )	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

1	2	3	4	5
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 ( $p \leq 0,05$ ).

Как видно из таблицы 4.11, между некоторыми показателями отмечены статистически значимые различия: так, наличие ЦОК характеризуется более высоким процентом фагоцитирующих моноцитов в тесте Phagotest, а также части как моноцитов, так и нейтрофилов, способной развивать кислородный взрыв при стимуляции fMLF в тесте Phagoburst. При этом по показателям кислородного взрыва, стимулируемым ФМА и E.coli, индивидуальная вариабельность данных не позволила получить статистически значимые различия, хотя эти параметры имели тенденцию к более высоким значениям у больных с наличием ЦОК больных по сравнению с больными, у которых ЦОК отсутствовали.

В таблицах 4.12 – 4.14 приведены показатели фагоцитарного звена иммунной системы больных различных стадий в зависимости от отсутствия/наличия ЦОК.

**Таблица 4.12** – Показатели фагоцитарного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки II стадии при наличии/отсутствии ЦОК

Показатели, %	Уровень ЦОК			
	0 ЦОК	>0 ЦОК	1-3 ЦОК	ЦОК>3
% 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 гранулоцитов (highstim)	73,2±26,7	96,9±1,6	99,2±0,6	97,8±1,9
Кисл. взрыв моноцитов (E.coli)	74,3±7,9	82,6±2,4	77,0±3,1	85,4±1,0 ↑°
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

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

Как видно из таблицы 4.12, при II стадии заболевания у больных с наличием ЦОК и их уровне от 1 до 3 клеток наблюдается более высокий показатель нейтрофильного кислородного взрыва при фагоцитозе *E.coli* в сравнении с больными, у которых ЦОК не выявлены ( $p \leq 0,05$ ). Кроме того, отмечен ряд стимулирующих эффектов значений ЦОК выше 3-х клеток в сравнении с ЦОК от 1 до 3 клеток на систему фагоцитоза, а именно, повышение процента фагоцитирующих моноцитов и их способности продуцировать супероксид-анион (по данным Phagoburst-теста с *E.coli*) ( $p \leq 0,05$ ).

**Таблица 4.13** – Показатели фагоцитарного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки III стадии при наличии/отсутствии ЦОК

Показатели, %	Уровень ЦОК			
	0 ЦОК	>0 ЦОК	1-3 ЦОК	ЦОК>3
% 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 ( <i>E.coli</i> )	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 ( <i>E.coli</i> )	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

Как видно из таблицы 4.13, при III стадии рака ободочной кишки не выявлено различий между пробами с наличием и отсутствием ЦОК по количеству фагоцитирующих гранулоцитов и моноцитов, но отмечены различия по активности реакций кислородного взрыва в них. Так, при наличии ЦОК определяются более высокие показатели кислородного взрыва нейтрофилов в Phagoburst-тесте, как при значениях от 1 до 3-х ЦОК, так и более 3 ЦОК, поставленном со всеми использованными стимуляторами. Что касается моноцитов, то отмечена тенденция к стимуляции продукции ими супероксид-аниона при наличии ЦОК, хотя отличие оказалось статистически незначимым из-за высокой индивидуальной вариабельности результатов.

**Таблица 4.14** – Показатели фагоцитарного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки IV стадии при наличии/отсутствии ЦОК

Показатели, %	Уровень ЦОК			
	0 ЦОК	>0 ЦОК	1-3 ЦОК	ЦОК>3
% 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 ( $p \leq 0,05$ ).

IV стадия заболевания с наличием ЦОК характеризуется статистически значимыми угнетением гранулоцитарного фагоцитоза наряду с повышением интенсивности реакций кислородного взрыва, статистически значимо отличающихся по показателям моноцитов, стимулированных E.coli ( $p \leq 0,05$ ).

Итак, наши данные свидетельствуют о том, что по мере нарастания распространенности рака ободочной кишки происходит снижение гранулоцитарного фагоцитоза и кислородного взрыва в моноцитах, стимулированных E. coli, наряду с усилением кислородного взрыва в гранулоцитах и моноцитах после стимуляции fMLF. Вне зависимости от стадии у больных с наличием ЦОК по сравнению с отсутствием ЦОК наблюдались сходные изменения: повышение кислородного взрыва в моноцитах и гранулоцитах под действием fMLF, тем не менее, отмечено повышение процента фагоцитирующих моноцитов, что может говорить об активации врожденного иммунитета.

Раздельный анализ показателей фагоцитоза по стадиям заболевания выявил, что наличие ЦОК у больных сопровождается стимуляцией фагоцитоза при местно-распространенном процессе и угнетением при генерализованном, однако, и в последнем случае сохраняется и даже нарастает способность гранулоцитов и моноцитов генерировать активные формы кислорода.

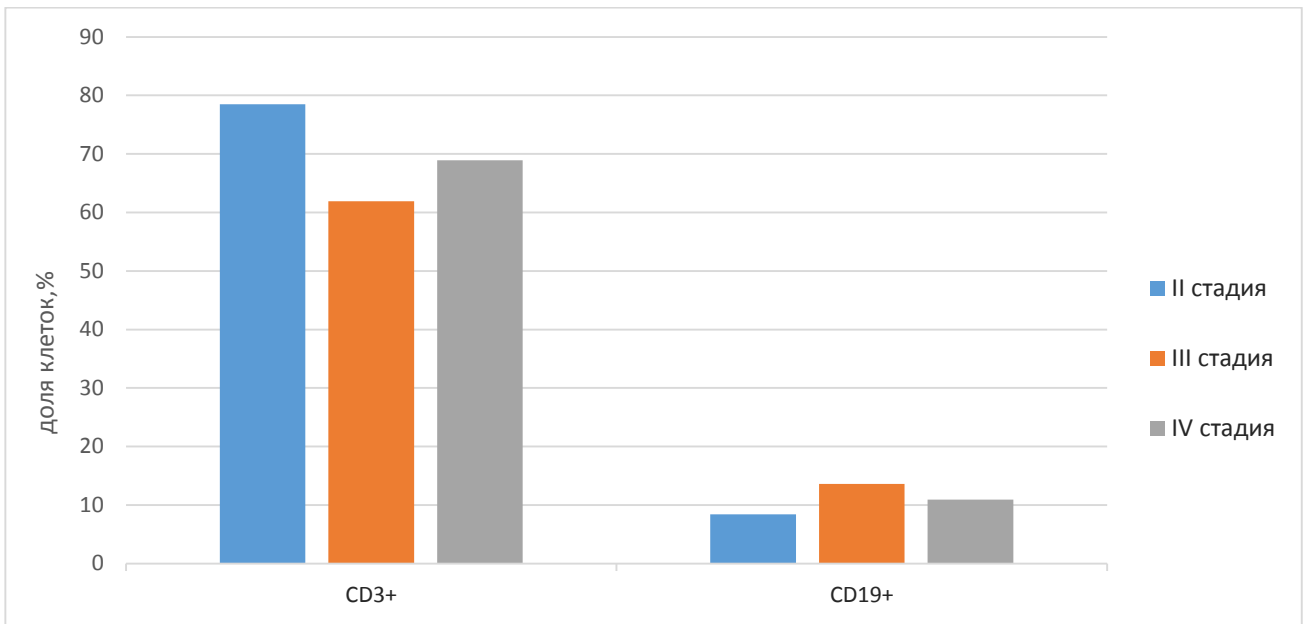


## **4.2. Характеристика факторов адаптивного иммунитета больных раком ободочной кишки с различными стадиями заболевания и уровнем циркулирующих опухолевых клеток**

Поскольку адаптивный иммунитет является не менее важным в осуществлении противоопухолевой защиты и находится в тесной связи с врожденным, он также подвержен влиянию, которое растущая опухоль реализует через ЦОК. Так, для ингибирования Т-клеточной цитотоксичности ЦОК способны включать механизм FAS/FASL, вследствие чего для CTL снижается порог апоптоза (Gordon N. et al., 2009; Strauss L. et al., 2009). Сами ЦОК при этом могут избегать атаки иммунокомпетентных клеток путем секреции растворимого FASL (Hallermalm K. et al., 2004). При наличии ЦОК у больных РМЖ была обнаружена высокая экспрессия FAS на Th (Gruber I. et al., 2013), за счет чего и наблюдалась лимфопения, хотя остается неясной, является ли она следствием действия именно ЦОК или вызвана иммуносупрессией, индуцированной первичной опухолью (Leone K. et al., 2018).

Результаты, характеризующие Т- и В-звено иммунной системы больных раком ободочной кишки при различных стадиях вне зависимости от наличия или отсутствия ЦОК представлены в таблицах 4.15 -4.16 и на рисунке 4.2.

Как видно из рисунка 4.2, общий уровень Т-лимфоцитов статистически значимо ниже при III и IV стадиях рака ободочной кишки, в сравнении со II стадией ( $78,5 \pm 2,2\%$  при II стадии,  $61,9 \pm 5,2\%$  при III,  $68,9 \pm 1,9\%$  при IV стадии). Статистически значимой разницы показателя Т-лимфоцитов между III и IV стадиями выявлено не было. Уровни В-лимфоцитов не имели значимых различий, хотя отмечена тенденция к повышению значений при нарастании стадии заболевания, причем максимальные значения выявлены в III стадии ( $8,4 \pm 0,8\%$  при II стадии,  $13,6 \pm 2,5\%$  при III,  $10,9 \pm 1,4\%$  - IV стадии).



**Рисунок 4.2.** Относительное содержание Т- и В-лимфоцитов в крови больных раком ободочной кишки различных стадий

В таблице 4.15 представлена характеристика Т-хелперно-индукторного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки разных стадий вне зависимости от уровня ЦОК.

**Таблица 4.15** – Характеристика Т-хелперно-индукторного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки разных стадий вне зависимости от уровня ЦОК

Стадия заболевания	Доля экспрессирующих клеток, %						
	CD3+CD4+	T-reg от CD4+	CD3+CD4+ +CD38+	CD3+CD4+ HLA-DR+	CD3+CD4+ CD25+	CD3+CD4+ +C95+	CD3+CD4+ +CD69+
II стадия	40,7±3,1	8,6±1,2	35,1±3,5	11,1±0,8	13,9±2,9	73,0±3,6	7,1±1,5
III стадия	33,5±3,4	7,3±0,7	33,1±3,9	7,6±1,2 ↓*	13,9±5,8	74,6±4,3	13,8±8,3
IV стадия	35,1±2,0	7,3±0,4	29,7±2,3	10,8±0,9 ↑°	17,2±1,8	77,5±2,3	7,0±0,7

Примечания: \* - различия показателей статистически значимы по отношению к II стадии ( $p \leq 0,05$ ); ° - различия показателей статистически значимы по отношению к III стадии ( $p \leq 0,05$ ).

Как видно из таблицы 4.15, статистически значимые различия показателей Т-хелперно-индукторного звена иммунитета при различных стадиях вне зависимости от уровня ЦОК выявлены только по одному показателю – доле активированных лимфоцитов с фенотипом CD3+CD4+HLA-DR+, отмечено

снижение от II к III стадии, и увеличение от III к IV стадии ( $p \leq 0,05$ ). Кроме того, отмечена тенденция к снижению доли CD3+CD4+ лимфоцитов при нарастании стадии опухолевого процесса.

По мере увеличения стадии от II к III происходит снижение процента CD8+ лимфоцитов, хотя статистически значимых различий не отмечено. При увеличении стадии от III к IV выявлено статистически значимое повышение доли активированных CD3+CD8+ лимфоцитов, коэкспрессирующих маркеры активации CD38 и HLA-DR. Данные представлены в таблице 4.16.

**Таблица 4.16** – Характеристика Т-цитотоксического звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки разных стадий вне зависимости от уровня ЦОК

Стадия заболевания	Доля экспрессирующих клеток, %					
	CD3+CD8+	CD3+CD8+ CD38+	CD3+CD8+ HLA-DR+	CD3+CD8+ CD25+	CD3+CD8+C D95+	CD3+CD8+C D69+
II стадия	33,2±3,6	25,5±3,9	24,2±2,9	3,4±0,7	79,2±3,5	5,1±0,9
III стадия	24,1±4,1	20,1±1,3	17,6±3,7	4,8±0,9	82,4±2,3	12,5±7,1
IV стадия	27,5±1,7	27,1±2,5 °	26,7±2,6 °	3,7±0,5	82,3±1,6	6,1±0,8

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

Данные, представленные в таблице 4.17, демонстрируют различия уровней Т-лимфоцитов памяти, затрагивающие Т-цитотоксическое, но не Т-хелперно-индукторное звено, а именно, увеличение их количества при IV стадии по сравнению с II ( $p \leq 0,05$ ).

**Таблица 4.17** – Характеристика Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов у больных раком ободочной кишки вне зависимости от уровня ЦОК

Стадия заболевания	Показатели, % от CD4+		Показатели, % от CD8+	
	CD45RA- /CD45RO+	CD45RA+ /CD62L+	CD45RA- /CD45RO+	CD45RA+ /CD62L+
II стадия	63,4±3,6	14,2±2,4	27,8±2,4	12,2±2,9
III стадия	66,2±2,0	14,3±2,4	33,1±4,3	9,9±1,6
IV стадия	64,3±2,7	11,5±1,5	39,5±2,9 ↑*	8,1±1,1

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

Таким образом, нарастание стадии заболевания характеризуется тенденцией к снижению уровня CD3+CD4+ Т-лимфоцитов и статистически значимым снижением в этой популяции активированных (CD3+CD4+HLA-DR+) лимфоцитов в III стадии в сравнении со II, а также статистически значимым повышением их доли в IV стадии в сравнении с III. Кроме того, увеличение стадии заболевания характеризуется тенденцией к снижению доли CD3+CD8+ лимфоцитов в III стадии в сравнении со II, и статистически значимым увеличением уровня CD3+CD8+ лимфоцитов с маркерами активации CD38 и HLA-DR в IV стадии в сравнении с III стадией, а также нарастанием среди CD3+CD8+ субпопуляции лимфоцитов клеток памяти.

В таблицах 4.18 – 4.20 представлены данные параметров иммунного статуса больных раком ободочной кишки вне зависимости от стадии заболевания при наличии разного уровня ЦОК и их отсутствии. Как видно из таблиц 4.18 и 4.19, обнаружены статистически значимое снижение доли CD3+CD4+ лимфоцитов при наличии ЦОК, за счет образцов с показателем выше 3-х клеток ( $p \leq 0,05$ ) (таблица 4.18).

**Таблица 4.18** – Характеристика Т-хелперно-индукторного звена иммунной системы у больных с наличием и отсутствием ЦОК вне зависимости от стадии заболевания

Уровень ЦОК	Доля экспрессирующих клеток, %						
	CD3+ CD4+	T-reg от CD4+	CD3+CD4+ CD38+	CD3+CD4+ HLA-DR+	CD3+CD4+ CD25+	CD3+CD4+ +C95+	CD3+CD4+ +CD69+
0 ЦОК	41,8±2,8	7,9±1,0	31,5±3,0	9,9±1,2	17,1±3,1	74,7±3,2	6,6±1,2
>0 ЦОК	34,7±1,8 ↓*	7,6±0,5	31,8±2,1	10,6±0,7	15,3±1,8	76,2±2,1	8,2±1,4
1-3 ЦОК	36,1±2,4	7,9±0,7	34,2±3,1	11,0±1,0	14,2±2,0	74,1±3,0	9,4±2,4
ЦОК>3	32,9±2,9 ↓*	7,1±0,4	28,8±2,7	10,1±1,0	16,9±3,4	78,9±2,8	6,7±1,2

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

При наличии ЦОК наблюдается статистически значимое повышение доли CD3+CD8+CD69+ лимфоцитов ( $p \leq 0,05$ ), а при высоких значениях ЦОК (более 3-х

клеток) – тенденция к увеличению доли CD3+CD8+ лимфоцитов и их активированной субпопуляции CD3+CD8+CD69+ (таблица 4.19).

**Таблица 4.19** – Характеристика Т-цитотоксического звена иммунной системы у больных с наличием и отсутствием ЦОК вне зависимости от стадии заболевания

Уровень ЦОК	Доля экспрессирующих клеток, %					
	CD3+CD8+	CD3+CD8+ CD38+	CD3+CD8+ HLA-DR+	CD3+CD8 +CD25+	CD3+CD8+ CD95+	CD3+CD8+ CD69+
0 ЦОК	25,4±2,6	23,7±3,7	25,7±4,6	3,9±0,9	80,1±2,2	4,4±0,6
>0 ЦОК	29,8±1,9	26,2±2,1	24,3±1,9	3,7±0,4	81,9±1,7	8,7±2,0 ↑*
1-3 ЦОК	29,2±2,8	27,6±3,4	25,5±2,5	3,6±0,6	81,3±2,4	7,3±2,1
ЦОК>3	30,5±2,4	24,5±2,2	22,8±2,8	3,9±0,5	82,8±2,5	7,0±1,3

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

Не выявлено статистически значимых различий между содержанием Т-клеток памяти, а также наивных Т-лимфоцитов, принадлежащих к обеим основным субпопуляциям, в зависимости от наличия или отсутствия ЦОК, данные представлены в таблице 4.20.

**Таблица 4.20** – Характеристика Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов у больных с наличием и отсутствием ЦОК вне зависимости от стадии заболевания

Уровень ЦОК	Показатели, % от CD4+		Показатели, % от CD8+	
	CD45RA- /CD45RO+	CD45RA+ /CD62L+	CD45RA- /CD45RO+	CD45RA+ /CD62L+
0 ЦОК	63,2±3,7	15,5±2,7	36,9±3,8	9,5±2,2
>0 ЦОК	64,5±2,2	11,7±1,2	34,7±2,4	9,6±1,3
1-3 ЦОК	64,7±3,2	11,5±1,6	32,5±3,3	8,6±1,3
ЦОК>3	64,3±3,2	12,0±2,0	37,3±3,2	10,7±2,4

Анализ показателей Т-звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки различных стадий и уровня ЦОК демонстрируют таблицы 4.21 – 4.23.

Так, при уровне ЦОК более 3-х клеток у больных II стадии выявлено статистически значимое снижение доли CD3+CD4+CD25+ лимфоцитов, как в сравнении с уровнем ЦОК менее 3-х клеток, так и при их отсутствии. Напротив,

при уровне ЦОК более 3-х отмечено статистически значимое повышение доли CD3+CD8+CD25+ лимфоцитов в сравнении с их количеством до 3-х клеток, а также тенденция к повышению данной субпопуляции в сравнении с отсутствием ЦОК. Наличие ЦОК у больных II стадии продемонстрировало тенденцию к увеличению доли CD3+CD4+HLA-DR+ и CD3+CD8+ лимфоцитов, а уровень от 1 до 3 клеток кроме обозначенных выше тенденций к повышению, характеризовался тенденцией к снижению доли CD3+CD4+ лимфоцитов (таблица 4.21).

**Таблица 4.21** – Показатели Т-звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки II стадии при наличии/отсутствии ЦОК

Показатели, %	Уровень ЦОК			
	0 ЦОК	>0 ЦОК	1-3 ЦОК	ЦОК>3
CD3+	76,1±3,5	79,9±2,8	81,3±4,1	77,8±4,2
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+/CD45RA-/CD45RO+	60,7±6,8	65,0±4,3	66,7±6,7	60,9±3,8
CD3+/CD4+/CD45RA+/CD62L+	14,6±3,7	14,0±3,3	14,3±4,1	13,5±6,2
CD3+/CD4+/CD38+	36,6±4,7	34,2±5,0	30,9±7,7	39,2±4,7
CD3+/CD4+/HLA-DR+	9,7±0,9	11,9±1,1	12,1±1,3	11,7±2,3
CD3+/CD4+/CD25+	17,7±6,0	11,3±2,8	14,3±3,7	5,3±1,1↓*↓°
CD3+/CD4+/C95+	70,2±6,1	74,7±4,5	77,4±7,1	70,8±4,8
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+/CD45RA-/CD45RO+	31,3±4,3	25,8±2,8	24,1±3,7	28,2±4,6
CD3+/CD8+/CD45RA+/CD62L+	11,8±4,1	12,4±4,2	7,8±2,9	19,3±8,9
CD3+/CD8+/CD38+	23,4±5,8	26,7±5,4	31,5±8,2	19,6±4,9
CD3+/CD8+/HLA-DR+	21,1±4,3	26,1±3,9	25,6±5,6	26,9±6,0
CD3+/CD8+/CD25+	3,3±1,1	3,5±0,8	2,5±1,0	5,5±0,9↑°
CD3+/CD8+/CD95+	79,1±4,9	79,2±5,1	80,0±7,7	78,0±6,4
CD3+/CD8+/CD69+	5,2±0,8	5,0±1,4	3,4±1,1	7,4±2,8

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

Как видно из данных, представленных в таблице 4.22, наличие ЦОК у больных III стадии рака ободочной кишки характеризуется статистически значимым снижением доли CD3+CD4+ лимфоцитов, повышением доли

активированных CD3+CD4+HLA-DR+ лимфоцитов, повышением доли активированных CD3+CD8+CD25+( $p \leq 0,05$ ).

**Таблица 4.22** – Показатели Т-звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки III стадии при наличии/отсутствии ЦОК

Показатели, %	Уровень ЦОК			
	0 ЦОК	>0 ЦОК	1-3 ЦОК	ЦОК>3
CD3+	65,9±4,6	61,4±6,1	53,0±8,6	72,5±1,4 ↑°
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+/CD45RA-/CD45RO+	67,0±1,9	66,2±2,0	62,5±2,1	69,9±1,2 ↑°
CD3+/CD4+/CD45RA+/CD62L+	14,8±3,1	14,3±2,4	13,1±1,5	15,5±4,9
CD3+/CD4+/CD38+	22,8±5,1	34,6±4,2	40,2±4,2 ↑*	27,1±6,4
CD3+/CD4+/HLA-DR+	4,1±0,9	8,1±1,2 ↑*	8,5±1,8 ↑*	7,6±2,0
CD3+/CD4+/CD25+	4,7±2,3	15,8±6,4	6,9±1,9	27,5±12,6
CD3+/CD4+/CD95+	86,5±6,0	72,9±4,6	65,5±3,1 ↓*	82,7±6,5 ↑°
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+/CD45RA-/CD45RO+	34,7±3,8	33,0±4,3	36,5±6,1	29,4±6,4
CD3+/CD8+/CD45RA+/CD62L+	9,8±1,4	9,9±1,6	10,0±2,0	9,7±2,8
CD3+/CD8+/CD38+	22,8±1,9	19,7±1,5	19,8±2,4	19,6±2,0
CD3+/CD8+/HLA-DR+	17,1±3,5	17,6±4,2	23,8±5,5	9,3±2,4 ↓°
CD3+/CD8+/CD25+	1,8±0,8	5,3±1,0 ↑*	6,7±1,4 ↑*	3,4±0,5 ↓°
CD3+/CD8+/CD95+	89,3±2,4	81,4±2,4 ↓*	81,6±2,6 ↓*	81,1±5,3
CD3+/CD8+/CD69+	12,4±6,1	12,5±7,1	19,1±14,3	5,9±1,7

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

Кроме того, наличие ЦОК от 1 до 3 клеток у больных III стадии заболевания характеризовалось статистически значимым повышением уровня активированных CD3+CD4+ лимфоцитов с маркерами CD38 и HLA-DR и снижением – с маркером CD95. Отмечено также статистически значимое повышение доли CD3+CD8+CD25+ ( $p \leq 0,05$ ). Уровни ЦОК более 3-х клеток характеризовались статистически значимыми различиями в сравнении с уровнем ЦОК от 1 до 3 клеток: снижением CD3+CD8+HLA-DR+ и CD3+CD8+CD25+, а также повышением CD3+, CD3+/CD4+/CD45RA-/CD45RO+, CD3+CD4+CD95+, CD3+CD8+ ( $p \leq 0,05$ ). Кроме того, уровни ЦОК выше 3 клеток при III стадии

характеризовались статистически значимым снижением доли CD3+CD4+ и повышением CD3+CD8+ в сравнении с отсутствием ЦОК ( $p \leq 0,05$ ) (таблица 4.22).

**Таблица 4.23** – Показатели Т-звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки IV стадии при наличии/отсутствии ЦОК

Показатели, %	Уровень ЦОК			
	0 ЦОК	>0 ЦОК	1-3 ЦОК	ЦОК>3
CD3+	67,7±3,2	69,3±2,4	70,4±3,8	68,0±2,8
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+/CD45RA-/CD45RO+	65,4±4,1	63,9±3,3	63,9±4,7	64,0±5,0
CD3+/CD4+/CD45RA+/CD62L+	16,5±4,2	10,1±1,4	9,8±1,9	10,5±2,2
CD3+/CD4+/CD38+	28,7±4,2	30,0±2,7	33,8±4,0	25,5±3,2
CD3+/CD4+/HLA-DR+	10,8±2,1	10,8±1,0	11,3±1,6	10,2±1,4
CD3+/CD4+/CD25+	18,7±3,4	16,7±2,2	16,4±2,9	17,1±3,7
CD3+/CD4+/C95+	76,7±3,8	77,8±2,8	75,3±4,1	80,9±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+/CD45RA-/CD45RO+	41,7±5,7	38,8±3,4	35,4±5,1	42,8±4,2
CD3+/CD8+/CD45RA+/CD62L+	7,6±2,3	8,3±1,3	8,7±1,9	7,9±2,0
CD3+/CD8+/CD38+	24,2±5,9	27,9±2,8	28,1±4,7	27,7±2,8
CD3+/CD8+/HLA-DR+	30,4±7,9	25,5±2,4	25,9±3,5	25,0±3,3
CD3+/CD8+/CD25+	4,6±1,4	3,3±0,4	3,2±0,6	3,5±0,7
CD3+/CD8+/CD95+	79,5±2,2	83,5±2,0	81,8±2,6	85,0±3,1
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 ( $p \leq 0,05$ ).

Как видно из представленных в таблице 4.23 данных у больных IV стадии заболевания с наличием ЦОК выявлено одно статистически значимое различие в сравнении с отсутствием ЦОК, повышение доли CD3+CD8+CD69+ лимфоцитов ( $p \leq 0,05$ ). Уровни ЦОК выше 3 клеток характеризуются тенденцией к снижению доли CD3+CD4+ и их популяции активированных лимфоцитов с маркеров CD38 в сравнении с уровнем ЦОК до 3-х клеток.

Статистически значимых различий по содержанию В-лимфоцитов в зависимости от стадии или наличия/отсутствия ЦОК не зарегистрировано, несмотря на отмеченную тенденцию к снижению доли В-лимфоцитов в III стадии



при уровне ЦОК более 3 клеток в сравнении как с их отсутствием, так и с уровнем от 1 до 3 клеток. Полученные данные представлены в таблице 4.24.

**Таблица 4.24** – Характеристика В-клеточного звена иммунной системы у больных раком ободочной кишки в зависимости от стадии и уровня ЦОК

Стадия заболевания	Показатель, % при различном уровне ЦОК			
	0 ЦОК	>0 ЦОК	1-3 ЦОК	ЦОК>3
II стадия	8,5±1,2	8,3±1,1	8,6±1,3	7,9±2,3
III стадия	13,8±2,4	13,6±2,9	17,2±4,1	8,8±2,3
IV стадия	10,7±3,6	11,1±1,6	10,9±2,7	11,1±,5

Итак, при анализе показателей адаптивного иммунитета по стадиям нам удалось отметить ряд особенностей, касающихся, в основном, активированных Т-лимфоцитов. Судя по полученным данным, уровень ЦОК оказывает негативное влияние на показатели адаптивного, прежде всего, Т-клеточного, иммунитета, особенно выраженное при III стадии рака ободочной кишки.

### 4.3. Характеристика сывороточных цитокинов у больных раком ободочной кишки различных стадий и уровнем циркулирующих опухолевых клеток

Результаты, характеризующие цитокиновый состав сыворотки крови у больных раком ободочной кишки исследованных стадий вне зависимости от наличия или отсутствия ЦОК, представлены в таблице 4.25.

**Таблица 4.25** – Уровни цитокинов у больных различных стадий рака ободочной кишки вне зависимости от уровня ЦОК

Стадии	Уровни цитокинов (пг/мл)						
	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\gamma$
II стадия	8,5±2,5	11,4±4,0	27,0±9,0	4,2±0,7	0,6±0,3	1,1±0,6	4,7±0,8
III стадия	4,4±0,8	63,9±11,4 $\uparrow$ *	45,8±9,4	9,6±3,9	0,9±0,6	2,4±0,5	5,9±3,8
IV стадия	13,1±6,8	39,8±7,9 $\uparrow$ *	67,0±20,9	11,4±3,8	1,2±0,3	1,4±0,5	6,1±4,6

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

Как видно из представленных в таблице 4.25 данных, выявлены статистически значимые различия только по уровню IL-6 между II и III - IV стадиями ( $p \leq 0,05$ ). Кроме того, при III стадии в сравнении со II отмечены

тенденции к снижению уровня IL-1 $\beta$  и повышению уровня IFN- $\alpha$ . Напротив, при генерализации процесса, уровень IFN- $\alpha$  имел тенденцию к снижению в сравнении с местнораспространенным процессом.

В таблице 4.26 представлены те же данные при наличии и отсутствии ЦОК вне зависимости от стадии заболевания.

**Таблица 4.26** – Уровни цитокинов у больных с наличием и отсутствием ЦОК вне зависимости от стадии заболевания

Уровень ЦОК	Уровни цитокинов (пг/мл)						
	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\gamma$
0 ЦОК	10,7 $\pm$ 3,2	41,5 $\pm$ 17,7	29,9 $\pm$ 11,5	8,5 $\pm$ 2,7	1,8 $\pm$ 0,6	0,9 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 0,5
>0 ЦОК	10,6 $\pm$ 4,2	26,6 $\pm$ 4,9	70,7 $\pm$ 18,2	8,3 $\pm$ 2,9	1,0 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 1,3
1-3ЦОК	6,4 $\pm$ 1,8	31,2 $\pm$ 6,8	65,8 $\pm$ 22,5	5,3 $\pm$ 1,0	1,3 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 1,9
ЦОК>3	25,3 $\pm$ 12,2	18,3 $\pm$ 5,7	35,4 $\pm$ 9,7	12,8 $\pm$ 5,1	0,4 $\pm$ 0,1 $\downarrow$ * $\downarrow$ $^\circ$	2,7 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 0,6 $\downarrow$ * $\downarrow$ $^\circ$

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

Как видно из представленных в таблице 4.26 данных, при значениях ЦОК выше 3 клеток определяется снижение уровня TNF- $\alpha$ , как при сравнении с отсутствием ЦОК, так и с уровнем от 1 до 3 клеток ( $p \leq 0,05$ ). Значения ЦОК выше 3-х клеток характеризуются тенденцией к снижению уровня IL-6 и IL-8 в сравнении с уровнем ЦОК от 1 до 3 клеток, а также снижением IFN- $\gamma$  в сравнении с отсутствием ЦОК и их уровнем от 1 до 3 клеток.

Результаты оценки цитокинового статуса больных в зависимости от наличия/отсутствия ЦОК представлены в таблице 4.27.

**Таблица 4.27** – Уровни цитокинов у больных с наличием и отсутствием ЦОК при различных стадиях рака 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 $\beta$	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- $\alpha$	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- $\alpha$	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- $\gamma$	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 ( $p \leq 0,05$ ).

Как видно из таблицы 4.27, два показателя имеют статистически значимые различия у больных II стадии с отсутствием и наличием ЦОК, а именно, IL-10 и TNF- $\alpha$ , которые при наличии ЦОК были ниже ( $p \leq 0,05$ ). Кроме того, наличие ЦОК у больных II стадии связано с тенденцией к снижению IL-1 $\beta$ , а у больных IV стадии – с статистически значимым повышением уровня IL-8 ( $p \leq 0,05$ ).

Итак, наблюдаемое нами повышение в крови уровня IL-6 при регионарном и отдаленном метастазировании (у больных III и IV стадий) еще раз подчеркивает его роль в распространении опухоли. Отмеченное нарастание уровня хемокина IL-8 у больных с IV стадией происходит преимущественно при наличии ЦОК.

Как известно, цитокины участвуют в формировании провоспалительного и проонкогенного микроокружения опухоли, что частично отражается и на изменении их сывороточного содержания. В обзоре В.М. Перельмутера и соавт. отмечено, что тип иммуновоспалительных реакций, обусловленный клеточным и цитокиновым спектром микроокружения опухоли, определяет вероятность развития эпителиально-мезенхимального перехода, возникновение инвазивных свойств опухолевых клеток, формирование опухолевых и премеастатических ниш, чувствительность или резистентность к химиотерапии (Перельмутер В.М. и др., 2017). В ткани многих солидных опухолей обнаружены высокие уровни не только IL-6, IL-8, IL-10, считающихся ростостимулирующими (Бережная Н.М., Чехун В.Ф., 2005), но и других провоспалительных цитокинов: IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , роль которых обычно рассматривается в контексте противоопухолевого действия (Wu S.T. et al., 2011; Sim G.C. et al., 2014). Некоторые авторы высказывают идеи о поиске новых мишеней в иммунном микроокружении опухоли, среди которых могут быть не только клетки, проявляющие супрессорную активность, но и цитокины. IL-10 считается иммуносупрессивным и проонкогенным цитокином – продуктом Treg (Finsterbusch M. et al., 2011; Dennis K.L. et al., 2013). В литературе есть сообщения о его неоднозначной роли в противоопухолевом иммунитете, но ряд авторов не только указывают на его противоопухолевые свойства (как антагониста провоспалительных цитокинов посредством поляризации Th0 в Th2, но и предлагают методы иммунотерапии опухолей с его применением (Dennis

K.L. et al., 2013; Mannino M.H. et al., 2015). Нарастание тканевых уровней провоспалительных цитокинов, их стимулирующая роль в неоангиогенезе и индукции ЭМП описаны при различных опухолях: меланоме кожи (Златник Е.Ю. и соавт., 2019), колоректальном раке (Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю. и др., 2012), раке яичника (Златник Е.Ю., Неродо Г.А., Бахтин А.В. и др., 2014), орофарингеальном раке (Златник Е.Ю., Светицкий П.В., Новикова И.А. и др., 2015) и других. IL-1 $\beta$  также участвует в ЭМП, стимулируя связывание Zeb1 с E-box, что приводит к угнетению экспрессии E-кадгерина (Dohadwala M. et al., 2010); кроме того, как показано на культурах рака легкого, он активирует гены MMP-1,3,10. На примере РМЖ, КРР, почечно-клеточного рака показано, что TNF- $\alpha$  также индуцирует ЭМП через NF- $\kappa$ B или АКТ/GSK-сигнальные пути и регулирует экспрессию Twist и Snail (Wu S.T. et al., 2011).

Хемокины, к которым относится IL-8, принадлежат к суперсемейству цитокиноподобных белков, регулирующих миграцию лейкоцитов и играющих важную роль в homing-эффекте. IL-8, в т.ч., продуцируемый самими опухолевыми клетками, способен привлекать нейтрофилы и таким образом облегчать себе путь гематогенного метастазирования.

Поскольку у больных с наличием ЦОК IV стадии раком ободочной кишки нами выявлена тенденция к повышению уровня хемокина IL-8, мы предполагаем, что у них могут быть задействованы вышеописанные механизмы.

## **ГЛАВА 5. ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В ОПУХОЛЯХ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ (КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ)**

### **5.1. Анализ экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток и эпителиально-мезинхимального перехода**

Значительную роль в развитии и прогрессировании колоректального рака играют так называемые стволовые клетки опухоли (cancer stem cells, CSC), способные к самоподдержанию и мультипотентной дифференцировке. Эпителий кишечника подвержен постоянной и быстрой регенерации благодаря кишечным стволовым клеткам. Считается, что это обстоятельство значительно увеличивает риск возникновения ОСК и, как следствие, злокачественного новообразования толстой кишки (Fanali C. et al., 2014). Уже давно постулируется, что внутриопухолевая гетерогенность и ассоциированная с опухолью микросреда способствуют прогрессированию заболевания и влияют на выживаемость пациентов (Oskarsson T. et al., 2014).

Как и нормальные стволовые клетки, ОСК обладают мультилинейным потенциалом дифференцировки и дают начало иерархично организованной клеточной популяции (Li W.J. et al., 2021).

ОСК отличаются от остальных клеток тремя особенностями: способностью к неограниченному самообновлению, способностью воссоздавать полный пул опухолевых клеток в «материнской» опухоли, наличием фенотипа, характеризующегося экспрессией уникального набора маркеров (Puglisi M.A. et al., 2013).

Хотя 70-80% рака толстой кишки можно радикально удалить, у большинства пациентов наблюдается рецидив заболевания или метастазы, и они умирают в течение 5 лет, несмотря на адъювантную химиотерапию и хирургическое лечение (Saunders M. et al., 2006). Клетки, инициирующие опухоль (ТИС) или опухолевые стволовые клетки (ОСК), считаются одними из наиболее

важных факторов ограниченной эффективности лечения (Zeuner A. et al., 2014). Предыдущие исследования показали, что рак толстой кишки является заболеванием стволовых клеток. ОСК функционально ответственны за возникновение рецидива опухоли, метастазирование и химиорезистентность и отличаются выраженной гетерогенностью (Pang R. et al., 2010).

ОСК обладают способностью к самообновлению и дифференцировке (Aderetti D.A. et al., 2018). Фенотип ОСК может отличаться при различных подтипах рака, а также меняться в процессе роста и развития злокачественной опухоли. В ответ на стресс или проведенное лечение опухолевые клетки без фенотипа стволовых могут дедифференцироваться в ОСК, а ОСК, в свою очередь, могут дифференцироваться во все типы опухолевых клеток или в ОСК с метастазирующим потенциалом (Ayob A.Z. et al., 2018).

CD44 считается маркером ОСК некоторых солидных опухолей, в том числе молочной железы, поджелудочной железы, опухолей головы и шеи, гепатоцеллюлярного рака, немелкоклеточного рака легкого и КРР (Yeung T.M., 2010). CD44 является адгезивным белком, который участвует во взаимодействиях клетка–клетка и клетка–межклеточный матрикс посредством своего лиганда – гиалуроновой кислоты. CD44 также вовлечен в рециркуляцию лимфоцитов, активацию лимфоцитов, миелопоэз, лимфопоэз и ангиогенез (Sneath R.J. et al., 1998).

Показано, что CD44-положительные клетки обладают большей туморогенностью, имеют больший потенциал пролиферации, способность к формированию колоний, меньшую склонность к апоптозу и повышенную резистентность к лекарственному воздействию по сравнению с CD44-отрицательными клетками (Wang J.Y. et al, 2012).

Противоречивые данные получены относительно роли CD44 в прогрессии опухоли и образовании метастазов при раке толстой кишки (Du L. et al. 2008). Снижение экспрессии CD44, по одним данным, коррелирует с уменьшением метастатического потенциала клеток КРР (Harada N. et al., 2001), по другим – это приводит к увеличению метастатического и миграционного потенциалов (Dallas

M.R. et al., 2012). Показано, что низкокодифференцированные опухоли толстой кишки имеют более высокий уровень экспрессии CD44 по сравнению с высококодифференцированными, а гиперэкспрессия этого маркера ассоциирована с уменьшением выживаемости пациентов (Ma L. et al., 2019). Кроме того, показано, что клетки CD44+, выделенные из тканей толстой кишки, демонстрируют высокую онкогенность в модели ксенотрансплантата и более высокую способность к клональному образованию *in vitro* (Du L. et al., 2008; Rassouli F.B. et al., 2016).

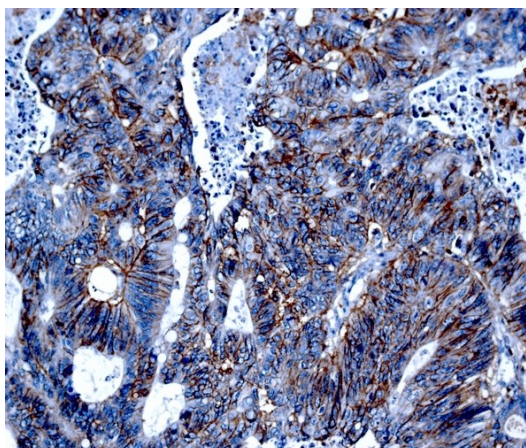
Экспрессия белка CD44 имеет мембранную локализацию и в нашем исследовании определялась как положительная, когда окрашивание CD44 было выявлено в 10% и более всех опухолевых клеток. Кроме того, нами была оценена интенсивность окрашивания клеточной мембраны: отсутствие окрашивания - 0, 1+ - слабое, 2+ - умеренное, 3+ - сильное окрашивание. При наличии интенсивности окрашивания 2+ и 3+ случай рассматривался как позитивный (Liu D. et al., 2014).

В нашем исследовании у больных раком ободочной кишки различных стадий отрицательная экспрессия CD44+ была выявлена у 161 из 299 больных (53,8%), тогда как положительная у 138 из 299 (46,2%). Распределение положительной экспрессии CD44+ у больных выявило некоторые особенности, демонстрирующие статистически значимую связь между стадией заболевания и экспрессией CD44 (таблица 5.1). При увеличении стадии заболевания отмечено увеличение позитивной экспрессии в 1,2 раза, 1,3 и 1,5 раза, соответственно, между II-III, III-IV, II-IV стадиями ( $p < 0.05$ ).

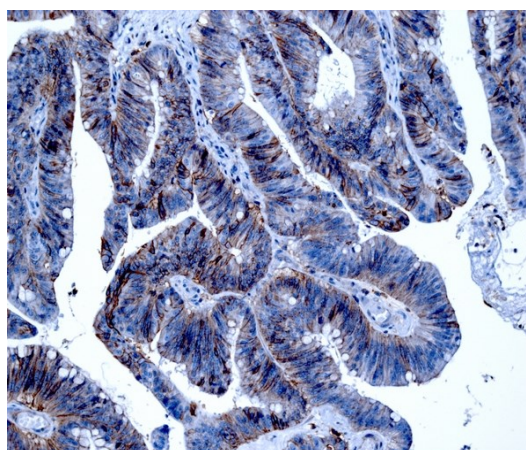
**Таблица 5.1** – Распределение экспрессии CD44 у больных раком ободочной кишки различных стадий

Стадии заболевания	Экспрессия CD44				p
	CD44 +		CD44 -		
	отн., %	абс.	отн., %	абс.	
II стадия (n=110)	38,2	42	61,8	68	p=0,027 ( $\chi^2=7,229$ )
III стадия (n=88)	44,3	39	55,7	49	
IV стадия (n=101)	56,4	57	44,6	44	

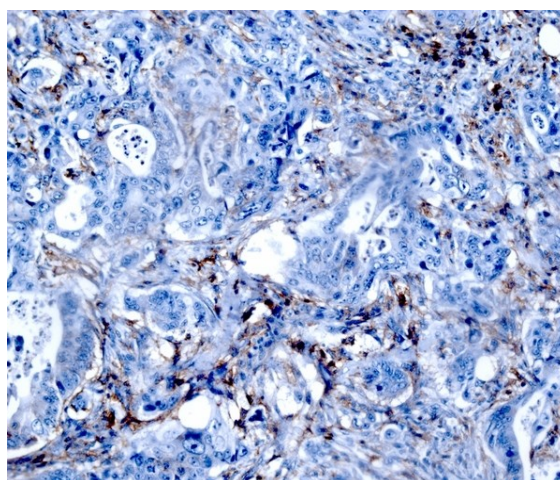
Разброс количества позитивных клеток по экспрессии CD44 в опухолях рака ободочной кишки находился в пределах от единичных до 40% (рисунок 5.1 – 5.4).



**Рисунок 5.1.** Экспрессия CD44. Сильное окрашивание клеточной мембраны опухолевых клеток, 3+. Ув. x200

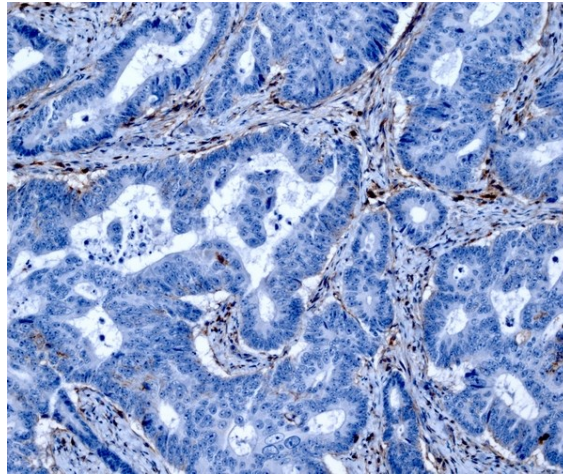


**Рисунок 5.2.** Экспрессия CD44. Умеренное окрашивание клеточной мембраны части опухолевых клеток, 2+. Ув. x200



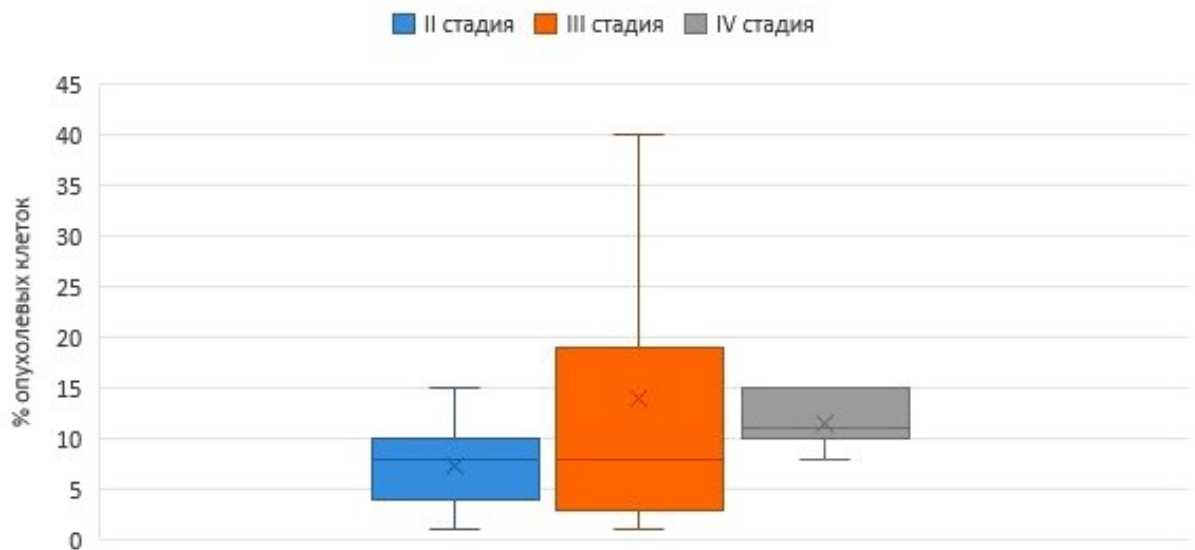
**Рисунок 5.3.** Экспрессия CD44. Слабое окрашивание клеточной мембраны единичных опухолевых клеток, 1+. Ув. x200





**Рисунок 5.4.** Экспрессия CD44. Отсутствие окрашивания клеточной мембраны опухолевых клеток. Экспрессия CD44 выявлена в строме опухоли, инфильтрирующих опухоль лимфоцитах. Ув. x200

Разброс клеток по экспрессии CD44 при различных стадиях рака ободочной кишки представлен на рисунке 5.5.



**Рисунок 5.5.** Диаграмма размаха экспрессии CD44 опухолевыми клетками при II-IV стадиях рака ободочной кишки

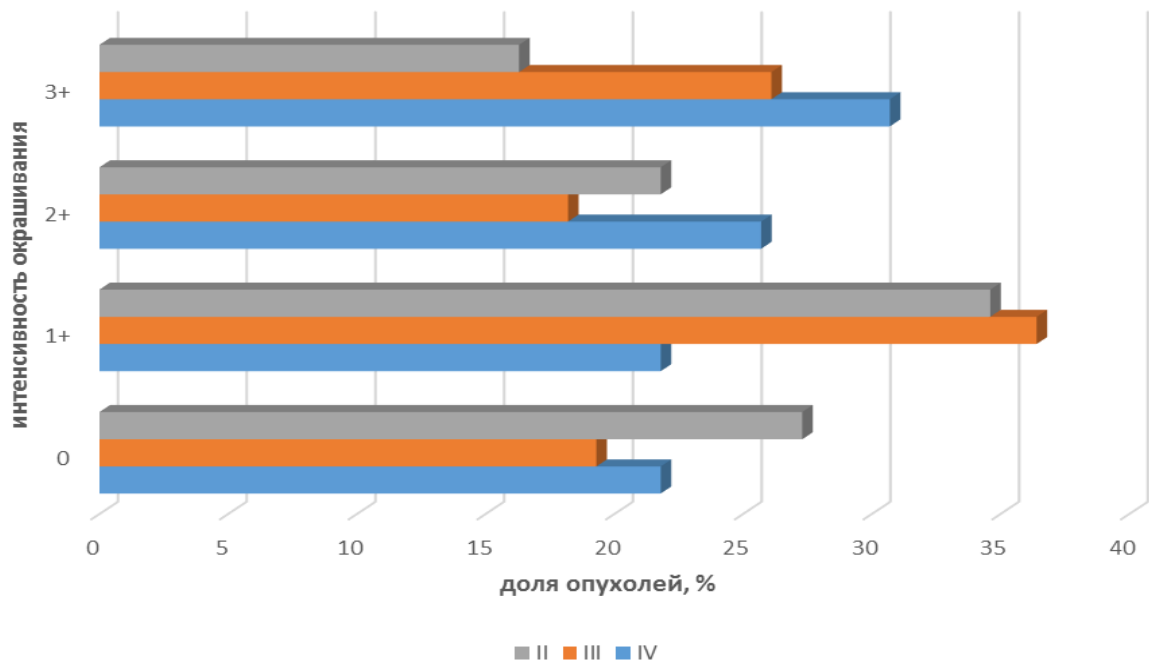
Так, при II стадии разброс CD44 находился в пределах от единичных до 15% всей площади опухоли (Me:8). При III стадии разброс позитивных клеток по экспрессии CD44 находился в пределах от единичных до 40% (Me:8), тогда как в опухолях IV стадии – от 8 % до 15% (Me:12).

При анализе интенсивности экспрессии CD44 в опухолях рака ободочной кишки получены следующие данные, которые наглядно демонстрирует таблица

5.2 и рисунок 5.6. Как видно из представленных данных, статистически значимой связи между стадией заболевания и интенсивностью окрашивания опухолевых клеток CD44 выявлено не было.

**Таблица 5.2** – Интенсивность экспрессии CD44 в опухолях рака ободочной кишки различных стадий

Стадии заболевания	Интенсивность экспрессии								p
	0		1+		2+		3+		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
II стадия (n=110)	30	27,3	38	34,6	24	21,8	18	16,3	p>0,05
III стадия (n=88)	17	19,3	32	36,4	16	18,2	23	26,1	
IV стадия (n=101)	22	21,8	22	21,8	26	25,7	31	30,7	



**Рисунок 5.6.** Доля опухолей с различной интенсивностью экспрессии CD44

Нами проведена оценка распределения экспрессии CD44 в зависимости от гистологических характеристик опухоли (таблица 5.3). Так, доля положительной экспрессии не зависела от степени дифференцировки опухоли, хотя при G1 и G3 дифференцировки положительных случаев отмечено менее 50%, тогда как при G2 доля положительной и отрицательной экспрессии находилась практически на одинаковом уровне. Тогда как при сравнении со степенью злокачественности, в опухолях низкой степени злокачественности, к которым относятся G1 и G2

опухоли, экспрессия CD44+ встречалась в 2,7 раза реже, чем в опухолях высокой степени злокачественности (G3 степени дифференцировки в нашем исследовании) ( $p < 0,05$ ).

Одинаково часто положительная экспрессия CD44 отмечалась при аденокарциноме без уточнения и перстневидно-клеточном раке. Значительно реже положительная экспрессия CD44 отмечена при муцинозной аденокарциноме, в сравнении с другими гистологическими типами. Для данного типа аденокарциномы характерным оказалось преобладание отрицательной экспрессии CD44 в сравнении с положительной в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ).

Наличие таких неблагоприятных гистологических признаков опухоли как лимфоваскулярная и периневральная инвазия характеризовались преобладанием положительной экспрессии CD44 в 3,7 раза и 2,0 раза соответственно ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 5.3** – Анализ экспрессия CD44 в опухоли различных гистологических характеристик

Клинико-морфологические характеристики опухоли	Всего больных (n=299)		Экспрессия CD44				p
			CD44+		CD44-		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Степень дифференцировки опухоли							
G1	46	15,4	17	37,0	29	63,0	p=0,109 ( $\chi^2=4,448$ )
G2	165	55,2	85	50,6	80	49,4	
G3	88	29,4	36	40,9	52	59,1	
Степень злокачественности опухоли							
Низкая степень	211	70,6	65	30,8	146	69,2	p<0,001 ( $\chi^2=67,955$ )
Высокая степень	88	29,4	73	83,0	15	17,0	
Гистологическая структура опухоли							
Аденокарцинома NOS	242	81,0	119	49,2	123	50,8	p=0,042 ( $\chi^2=6,357$ )
Перстневидно-клеточный рак	12	4,0	6	50,0	6	50,0	
Муцинозная аденокарцинома	45	15,0	13	28,9	32	71,1	
Лимфоваскулярная инвазия							
Есть	269	90,0	134	49,8	135	50,2	p<0,001 ( $\chi^2=14,453$ )
Нет	30	10,0	4	13,3	26	86,7	
Периневральная инвазия							
Есть	251	83,9	126	50,2	125	49,8	p=0,002 ( $\chi^2=10,296$ )
Нет	48	16,1	12	25,0	36	75,0	
Лимфоцитарная инфильтрация							
Слабая	98	32,8	58	59,2	40	40,8	p<0,001 ( $\chi^2=14,365$ )
Умеренная	144	48,2	64	44,4	80	55,6	
Выраженная	57	19	16	28,1	41	71,9	

В нашем исследовании наиболее часто положительная экспрессии CD44 встречалась при слабой степени лимфоцитарной инфильтрации в опухоли. Минимальная положительная экспрессии выявлена при выраженной степени лимфоцитарной инфильтрации. Так, увеличение степени инфильтрации опухолевых клеток лимфоцитами характеризовалось снижением положительной экспрессии CD44 в 1,3 раза от слабой до умеренной, в 1,6 раза от умеренной к выраженной и в 2,1 раза от слабой степени лимфоцитарной инфильтрации к выраженной ( $p < 0.05$ ). Как видно из представленных в таблице 5.3 данных, статистически значимая связь выявлена между экспрессией CD44 и степенью злокачественности опухоли ( $p < 0,001$ ), гистологической структурой опухоли ( $p = 0,042$ ), лимфоваскулярной инвазией ( $p < 0,001$ ), периневральной инвазией ( $p = 0,002$ ) и лимфоцитарной инфильтрацией ( $p < 0,001$ ). Значимой связи между степенью дифференцировки опухоли и экспрессией CD44 выявлено не было (таблица 5.4).

При сопоставлении локализации опухоли в различных отделах толстого кишечника и экспрессии CD44, продемонстрировано, что положительная экспрессия CD44 не отличалась практически между отделами кишки и во всех случаях была несколько ниже 50%. Полученные данные представлены в таблице 5.4.

**Таблица 5.4** – Анализ экспрессии CD44 в зависимости от локализации опухоли

Локализация опухоли	Всего больных (n=299)		Экспрессия CD44				p
			CD44+		CD44-		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	Отн., %.	
Правая половина ободочной кишки	67	22,4	30	44,8	37	55,2	p=0,951 ( $\chi^2=0,102$ )
Поперечно-ободочная кишка	93	31,1	44	47,3	49	52,7	
Левая половина ободочной кишки	139	46,5	64	46,0	75	54,0	

Из представленных в таблице 5.4 данных не продемонстрировано статистической значимости экспрессии CD44 в опухоли в зависимости от локализации опухоли в толстой кишке.

Изучение особенностей экспрессии CD44 при различном уровне инвазии показало нарастание доли положительных случаев с увеличением степени инвазии. Так, максимальная экспрессия выявлена при распространении опухоли в окружающие органы и ткани или серозную оболочку кишки (T4), что превосходило уровень инвазии в мышечный слой (T2) и прорастание всех слоев стенки и жировой клетчатки без поражения соседних органов (T3) в 2,0 и 1,6 раза соответственно ( $p < 0.05$ ).

В нашем исследовании превалирующая экспрессия CD44 отмечалась при наличии метастатического поражения лимфатических узлов, и превышала данный показатель в 2,7 раза при отсутствии метастазов в лимфоузлы. Зависимости в уровне экспрессии от количества пораженных лимфатических узлов нами не выявлено, одинаково часто отмечена положительная экспрессия в случаях поражения от 1 до 3 лимфоузлов и более чем 3 регионарных лимфатических узлов ( $p < 0.05$ ).

Нами в исследовании был рассчитан метастатический индекс поражения лимфоузлов как соотношение количества пораженных к общему числу исследованных. Была проведена категоризация соотношения лимфатических узлов, для оценки было выбрано предельное значение 0,25, поскольку 0,25 представляет количество метастатических лимфатических узлов на основе изучения 12 лимфатических узлов (3/12), рекомендованных TNM системой стадирования (Park I.J., 2015). Распределение положительной экспрессии CD44 характеризовалось повышением в 2,6 раза доли опухолей при индексе метастатического поражения более 0,25 ( $p < 0,05$ ).

Преимущественно положительной экспрессией CD44 в 97% характеризовались опухоли при наличии отдаленных метастазов, что в 4,8 раза превосходило аналогичный показатель при отсутствии метастатического поражения печени ( $p < 0.05$ ).

Результаты проведенного анализа экспрессии CD44 и критериев классификации опухолей по системе TNM представлены в таблице 5.5. Проведенная сравнительная оценка экспрессии CD44 с глубиной инвазии

опухоли, наличием поражения регионарных лимфоузлов, метастатическим индексом поражения лимфоузлов и наличием отдаленных метастазов выявила статистически значимую связь всех сравниваемых параметров ( $p < 0,001$ ).

**Таблица 5.5** – Анализ экспрессии CD44 в зависимости от критериев классификации опухолей по системе TNM

Характеристики опухоли	Всего больных (n=299)		Экспрессия CD44				p
			CD44+		CD44-		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Уровень инвазии опухоли							
pT1-T2	45	15,1	15	33,3	30	66,7	p<0,001 ( $\chi^2=18,304$ )
pT3	172	57,5	69	40,1	103	59,9	
pT4	82	27,4	54	65,9	28	34,1	
Статус лимфоузлов							
N0	116	38,9	26	22,4	90	77,6	p<0,001 ( $\chi^2=42,982$ )
N1	111	37,0	68	61,3	43	38,7	
N2	72	24,1	44	61,1	28	38,9	
Метастатический индекс лимфоузлов							
≤ 0,25	50	27,3	14	28,0	36	72,0	p<0,001 ( $\chi^2=31,940$ )
> 0,25	133	72,7	98	73,7	35	26,3	
Отдаленные метастазы							
M0	198	66,2	40	20,2	158	79,8	p<0,001 ( $\chi^2=158,850$ )
M1a	101	33,8	98	97,0	3	3,0	

Еще одним маркером для идентификации опухолевых клеток с фенотипом стволовых является экспрессия поверхностного клеточного маркера CD133. CD133 экспрессируется эмбриональными стволовыми клетками человека и редко обнаруживается на клетках нормальных тканей (Kim W.T. et al., 2017). Его экспрессия выявляется на клетках с повышенными онкогенными свойствами и способностью образовывать сфероиды (Brugnoli F., et al., 2019).

По данным авторов, экспрессия CD133 была связана с мутациями в генах *KRAS* и *BRAF*. Был сделан вывод, что экспрессия CD133 активируется при раке толстой кишки, который имеет гиперактивированный RAS-RAF-MEK-ERK путь, как следствие мутаций в *KRAS* или *BRAF* (Horst D. et al., 2009). Поскольку мутации в генах *KRAS* или *BRAF* связаны с прогнозом, было сделано предположение, что экспрессия CD133 скорее зависит от мутационного статуса пути RAS-RAF (Orian-Rousseau V., 2010).

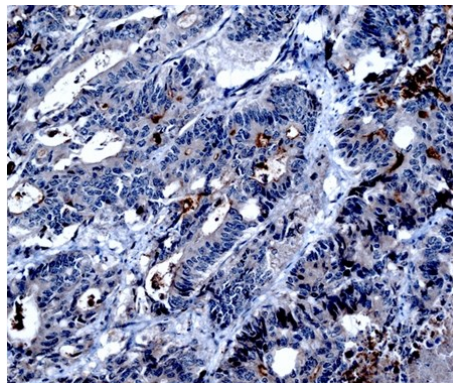
Антитела к белку CD133 окрашивают мембрану опухолевых клеток, и его экспрессия определялась как положительная, когда окрашивание было выявлено в более 5% всей опухоли. Кроме того, нами оценивалась и интенсивность окрашивания клеточной мембраны: 0 - отсутствие окрашивания, 1+ - слабое, 2+ - умеренное, 3+ - сильное окрашивание.

Положительная экспрессия CD 133 отмечалась в 57,5% (172 из 299 больных), тогда как отрицательная – несколько реже, составив 42,5% (127 из 299 больных). При II и III стадиях доля CD133-положительных опухолей практически не отличалась между собой, составив 53,6% и 51,1% соответственно, тогда как в IV стадии отмечен рост таких опухолей в 1,3 раза в сравнении со II и III стадиями. Нами выявлена статистически значимая связь между стадиями опухолевого процесса и экспрессией CD133 ( $p < 0.05$ ). Полученные данные отражены в таблице 5.6.

**Таблица 5.6** – Экспрессия CD133 в опухоли больных раком ободочной кишки различных стадий

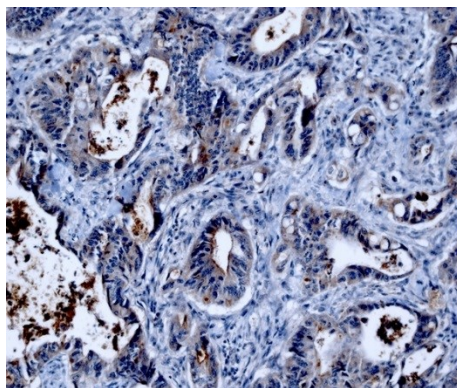
Стадии заболевания	Экспрессия CD133				p
	CD133 +		CD133 -		
	отн., %	абс.	отн., %	абс.	
II стадия (n=110)	53,6	59	46,4	51	p=0,047 ( $\chi^2=6,122$ )
III стадия (n=88)	51,1	45	48,9	43	
IV стадия (n=101)	67,3	68	32,7	33	

Разброс доли позитивных клеток по экспрессии CD133 в опухолях ободочной кишки находился в пределах от единичных до 25% всей площади опухоли (рисунок 5.7 – 5.10).

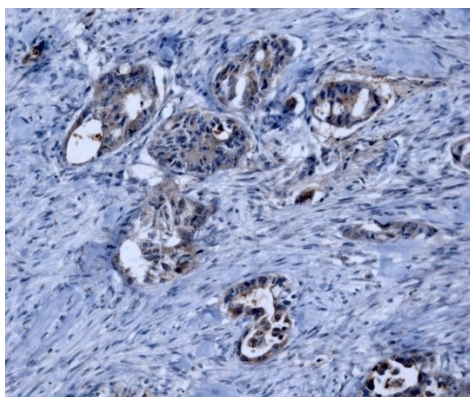


**Рисунок 5.7.** Экспрессия CD133. Сильное окрашивание более 5% опухолевых клеток, 3+. Ув. x200

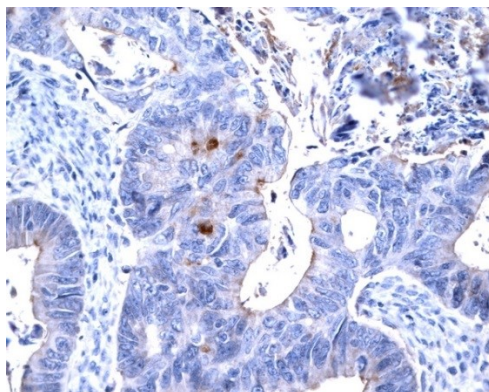




**Рисунок 5.8.** Экспрессия CD133. Умеренное окрашивание более 5% опухолевых клеток, 2+. Ув. x200



**Рисунок 5.9.** Экспрессия CD133. Слабое окрашивание более 5% опухолевых клеток, 1+. Ув. x200

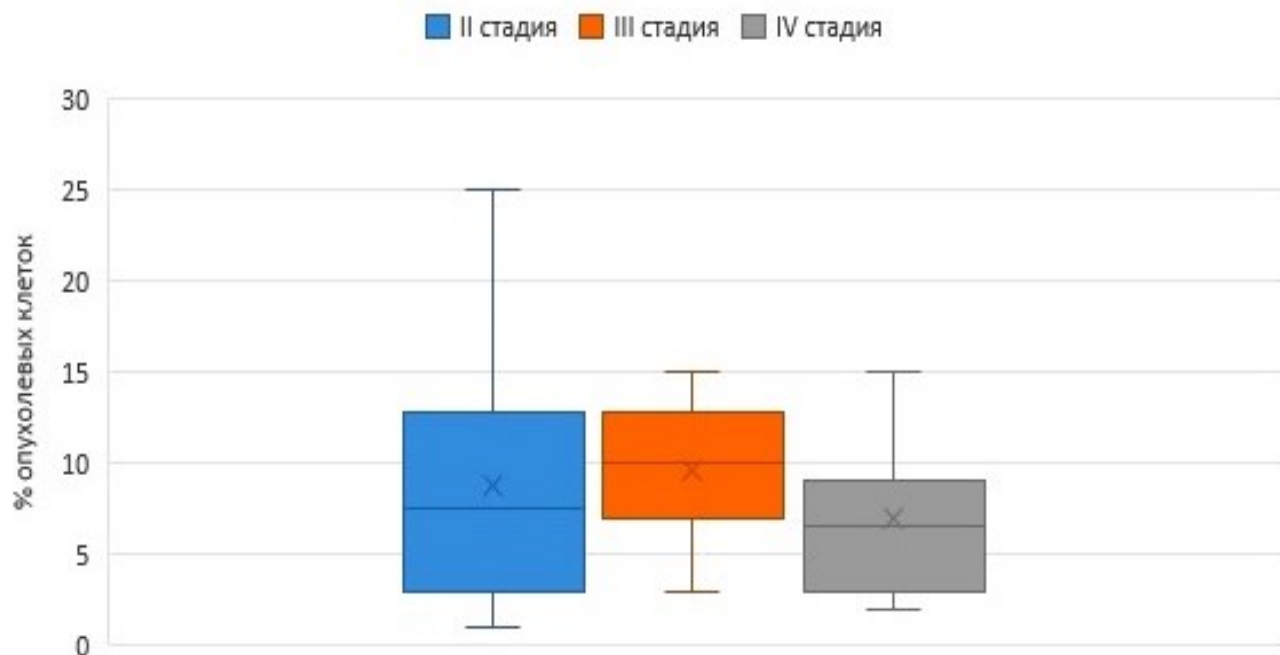


**Рисунок 5.10.** Экспрессия CD133. Слабое окрашивание единичных опухолевых клеток, 1+. Ув. x400

При II стадии разброс CD133 находился в пределах от единичных до 25% всей площади опухоли (Me:7). При III стадии разброс позитивных клеток по экспрессии CD133 находился в пределах от 3 до 15% (Me:10), в опухолях IV стадии – от 2 % до 15% (Me:6.5).



Разброс клеток по экспрессии CD133 при различных стадиях рака ободочной кишки представлен на рисунке 5.11.



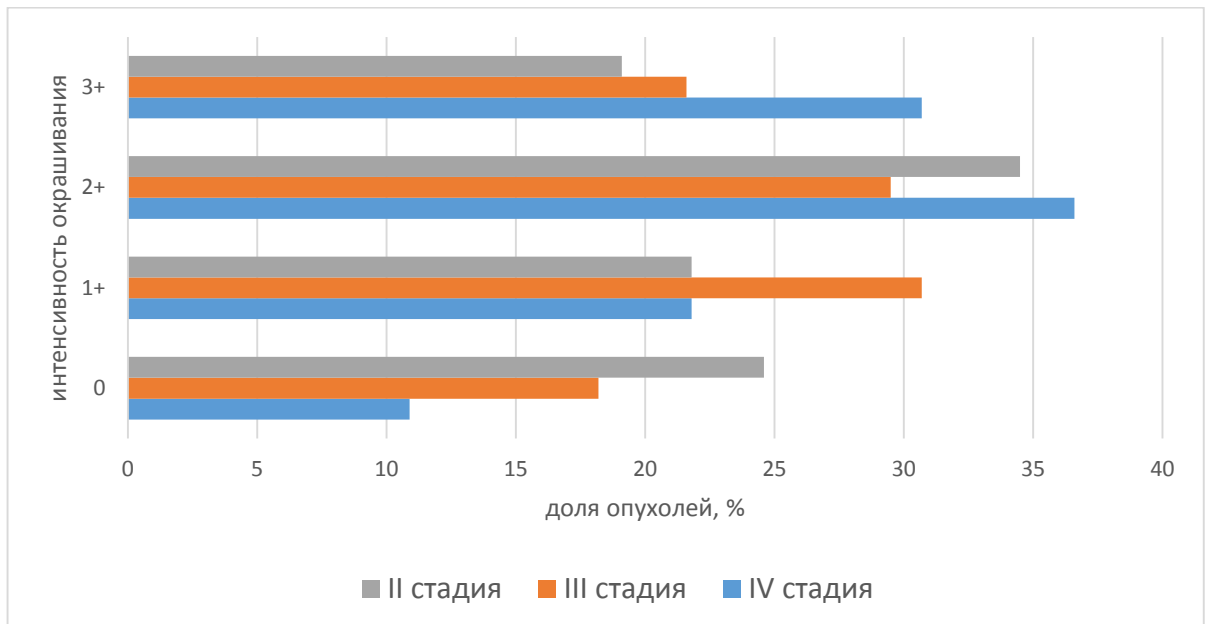
**Рисунок 5.11.** Диаграмма размаха экспрессии CD133 опухолевыми клетками при II-IV стадиях рака ободочной кишки

При анализе интенсивности экспрессии CD133 в опухолях получены следующие данные, представленные в таблице 5.7 и на рисунке 5.12.

**Таблица 5.7** – Интенсивность экспрессии CD133 в опухолях ободочной кишки различных стадий

Стадии заболевания	Интенсивность экспрессии								p
	0		1+		2+		3+		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
II стадия (n=110)	27	24,6	24	21,8	38	34,5	21	19,1	p>0,05
III стадия (n=88)	16	18,2	27	30,7	26	29,5	19	21,6	
IV стадия (n=101)	11	10,9	22	21,8	37	36,6	31	30,7	

Как видно из представленных в таблице 5.7 и на рисунке 5.12 данных, статистически значимой связи между интенсивностью окрашивания опухолевых клеток CD133 и стадией заболевания выявлено не было.



**Рисунок 5.12.** Интенсивность экспрессии CD133 в опухолях больных раком ободочной кишки

При анализе экспрессии CD133 в зависимости от гистологических особенностей опухоли не выявлена статистически значимая связь между степенью дифференцировки опухоли, степенью злокачественности и долей положительной экспрессии CD133 в опухолях. При этом максимальная экспрессия CD133 наблюдалась при высокодифференцированных опухолях (G1) и низкой степени злокачественности, составив соответственно 60,9% и 59,7%. Доля положительных опухолей по экспрессии CD133 являлась одинаковой для опухолей низкой степени дифференцировки и высокой степени злокачественности, составив по 52,3%.

Наиболее часто положительная экспрессия наблюдалась в случаях аденокарциномы и перстневидноклеточного рака, по 61,2% и 66,7%, что превышало положительную экспрессию в случаях муцинозной аденокарциномы в 1,7 и 1,9 раза соответственно ( $p < 0,05$ ).

Наличие лимфоваскулярной и периневральной инвазии в опухоли в 1,5 и 1,6 раза повышало частоту выявления положительной экспрессии CD133 ( $p < 0,05$ ).

Слабая лимфоцитарная инфильтрация превалировала в случаях положительной экспрессии CD133, составляя 71,4%, при этом максимальная доля

отрицательной экспрессии приходилась на опухоли с выраженной инфильтрацией опухоли лимфоцитами, составив 57,9% ( $p < 0.05$ ).

При анализе гистологических характеристик опухоли и уровня экспрессии CD133 не выявлено статистически значимых отличий при различной степени дифференцировки опухоли и различной степени злокачественности. Гистологические характеристики опухоли, такие как, структура опухоли ( $p = 0,005$ ), лимфоваскулярная ( $p = 0,041$ ), периневральная инвазии ( $p = 0,003$ ), а также, лимфоцитарная инфильтрация ( $p < 0,001$ ), напротив, продемонстрировали статистическую значимость от экспрессии CD133 ( $p < 0.05$ ). Полученные данные продемонстрированы в таблице 5.8.

**Таблица 5.8** – Анализ экспрессии CD133 в зависимости от гистологических характеристик опухоли

Клинико-морфологические характеристики опухоли	Всего больных (n=299)		Экспрессия CD133				p
			CD133+		CD133-		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Степень дифференцировки опухоли							
G1	46	15,4	28	60,9	18	39,1	p=0,487 ( $\chi^2=1,440$ )
G2	165	55,2	98	59,4	67	40,6	
G3	88	29,4	46	52,3	42	47,7	
Степень злокачественности опухоли							
Низкая степень	211	70,6	126	59,7	85	40,3	p=0,236 ( $\chi^2=1,408$ )
Высокая степень	88	29,4	46	52,3	42	47,7	
Гистологическая структура опухоли							
Аденокарцинома NOS	242	81,0	148	61,2	94	38,8	p=0,005 ( $\chi^2=10,606$ )
Перстневидно-клеточный рак	12	4,0	8	66,7	4	33,3	
Муцинозная аденокарцинома	45	15,0	16	35,6	29	64,4	
Лимфоваскулярная инвазия							
Есть	269	90,0	160	59,5	109	40,5	p=0,041 ( $\chi^2=4,192$ )
Нет	30	10,0	12	40,0	18	60,0	
Периневральная инвазия							
Есть	251	83,9	154	61,4	97	38,6	p=0,003 ( $\chi^2=9,384$ )
Нет	48	16,1	18	37,5	30	62,5	
Лимфоцитарная инфильтрация							
Слабая	98	32,8	70	71,4	28	28,6	p<0,001 ( $\chi^2=13,965$ )
Умеренная	144	48,2	78	54,2	66	45,8	
Выраженная	57	19	24	42,1	33	57,9	

При анализе экспрессии CD133 и локализации опухоли в разных отделах толстого кишечника показано, что положительная экспрессия CD133 несколько чаще наблюдалась при локализации опухоли в правых и левых отделах кишки, хотя разница не имела статистической значимости. Полученные данные представлены в таблице 5.9.

**Таблица 5.9** – Анализ экспрессии CD133 в зависимости от локализации опухоли

Локализация опухоли	Всего больных (n=299)		Экспрессия CD133				p
			CD133+		CD133-		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Правая половина ободочной кишки	67	22,4	40	59,7	27	40,3	p=0,525 ( $\chi^2=1,293$ )
Поперечно-ободочная кишка	93	31,1	49	52,7	44	47,3	
Левая половина ободочной кишки	139	46,5	83	59,7	56	40,3	

Анализ экспрессии CD133 в зависимости от уровня инвазии демонстрирует высокие значения положительной экспрессии при распространении опухоли на все слои стенки и жировой клетчатки без поражения соседних органов (T3) (64,0%) и при прорастании опухоли в окружающие органы и ткани или серозную оболочку кишки (T4) (59,8%) ( $p<0,05$ ). При этом, при уровне инвазии T1-T2 преобладали в 2,5 раза чаще опухоли с отсутствием CD133 ( $p<0,05$ ).

В нашем исследовании максимальная экспрессия CD133 встречалась при наличии метастатического поражения более 3 регионарных лимфатических узлов, и превышала данный показатель в 1,3 раза в случаях поражения от 1 до 3 лимфоузлов и в 1,6 раза в случаях при отсутствии метастазов в лимфоузлы ( $p<0,05$ ). Полученные данные представлены в таблице 5.10. Как видно из таблицы 5.10, индекс метастатического поражения лимфоузлов при индексе  $> 0,25$ , в сравнении с индексом  $\leq 0,25$  незначительно снижался, не имея статистически значимой связи.

Преобладающей положительной экспрессией CD133 характеризовались опухоли при наличии отдаленных метастазов, где на их долю приходилось 87,1%,

что в 2,1 раза превосходило этот показатель при отсутствии метастатического поражения печени.

**Таблица 5.10** – Анализ экспрессии CD133 в зависимости от критериев классификации опухоли по системе TNM

Характеристики опухоли	Всего больных (n=299)		Экспрессия CD133				p
			CD133+		CD133-		
	абс.	отн. %	абс.	отн. %	абс.	отн. %	
Уровень инвазии опухоли							
pT1-T2	45	15,1	13	28,9	32	71,1	p<0,001 ( $\chi^2=18,179$ )
pT3	172	57,5	110	64,0	62	36,0	
pT4	82	27,4	49	59,8	33	40,2	
Статус лимфоузлов							
N0	116	38,9	55	47,4	61	52,6	p=0,002 ( $\chi^2=12,480$ )
N1	111	37,0	64	57,7	47	42,3	
N2	72	24,1	53	73,6	19	26,4	
Метастатический индекс лимфоузлов							
≤ 0,25	50	27,3	27	54,0	23	46,0	p=0,087 ( $\chi^2=2,945$ )
> 0,25	133	72,7	90	45,2	43	54,8	
Отдаленные метастазы							
M0	198	66,2	84	42,4	114	57,6	p<0,001 ( $\chi^2=54,705$ )
M1a	101	33,8	88	87,1	13	12,9	

Таким образом, проведенный анализ уровня экспрессии CD133 и критериев классификации по системе TNM выявил статистически значимую связь между уровнем инвазии опухоли ( $p<0,001$ ), статусом лимфоузлов ( $p=0,002$ ) и дистантными метастазами ( $p<0,001$ ). Тогда как связь между метастатическим индексом лимфоузлов и экспрессией CD133 не имела статистической значимости ( $p=0,087$ ).

Экспрессия ALDH опухолевыми клетками часто используется для идентификации ОСК. Экспрессия ALDH1 идентифицирует ОСК при плоскоклеточном раке головы и шеи, раке легких, простаты, поджелудочной железы и раке молочной железы (Vassalli G. 2019). Наличие ALDH1-позитивных

клеток связано с плохим прогнозом при раке шейки матки, молочной железы, легких (Yao T., 2014). ALDH1 действует как промотор, индуцируя эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) в опухолевых клетках (Charafe-Jauffret E. et al. 2013). ALDH1 участвует в клеточной дифференцировке и пролиферации и обеспечивает устойчивость к алкилирующим химиотерапевтическим агентам (Singh S. et al., 2015). Повышенное количество ALDH1-положительных клеток было обнаружено в крипах пациентов с хроническим язвенным колитом, состоянием, которое предрасполагает к развитию рака по пути воспаление-дисплазия-рак. ALDH1-положительные клетки, выделенные от этих пациентов, после ксенотрансплантации претерпевали переход в опухолевые стволовые клетки, а также *in vitro* образовывали онкосферы (Carpentino J.E., et al., 2009).

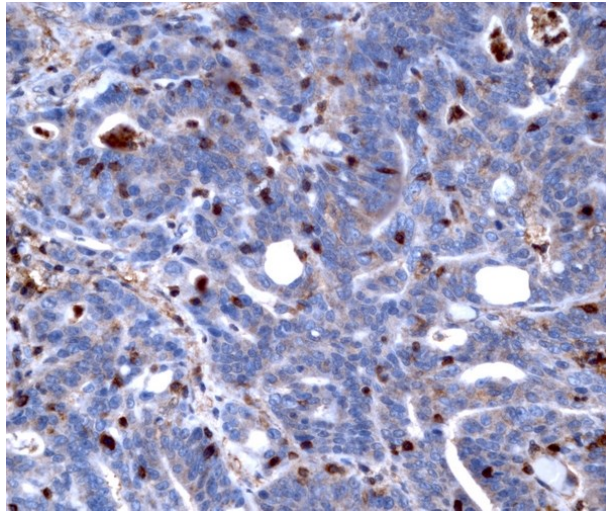
У больных раком ободочной кишки различных стадий положительная экспрессия ALDH1+ отмечена у 157 из 299 больных (52,5%), при этом отрицательная – у 142 из 299 (47,5%). При анализе экспрессии ALDH1 в опухоли выявлены особенности, демонстрирующие статистически значимую связь между стадией заболевания и экспрессией ALDH1 (таблица 5.11). Данные, представленные в таблице 5.11 демонстрируют увеличение позитивной экспрессии ALDH1+ при увеличении стадии заболевания в 1,4 раза, 1,2 и 1,6 раза, соответственно, между II-III, III-IV, II-IV стадиями ( $p < 0,05$ )

**Таблица 5.11** – Распределение экспрессии ALDH1 в опухоли у больных раком ободочной кишки различных стадий

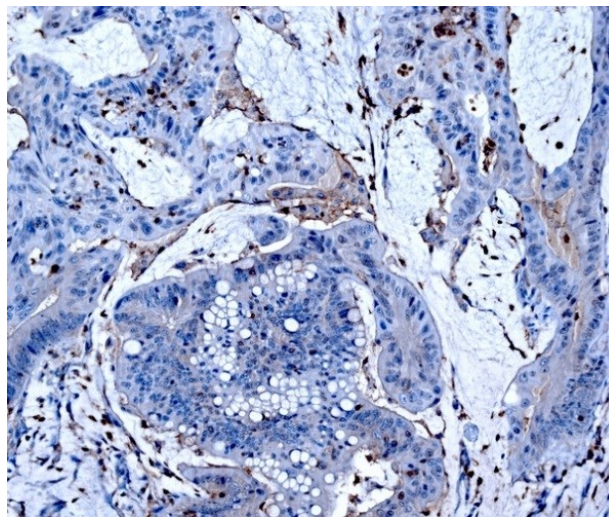
Стадии заболевания	Экспрессия ALDH1				p
	ALDH1 +		ALDH1 -		
	отн., %	абс.	отн., %	абс.	
II стадия (n=110)	40,0	44	60,0	66	p=0,003 ( $\chi^2=12,032$ )
III стадия (n=88)	55,7	49	44,3	39	
IV стадия (n=101)	63,4	64	36,6	37	

Разброс количества позитивных клеток по экспрессии ALDH1 в опухолях находился в пределах от единичных до 25% (рисунок 5.13 – 5.15).

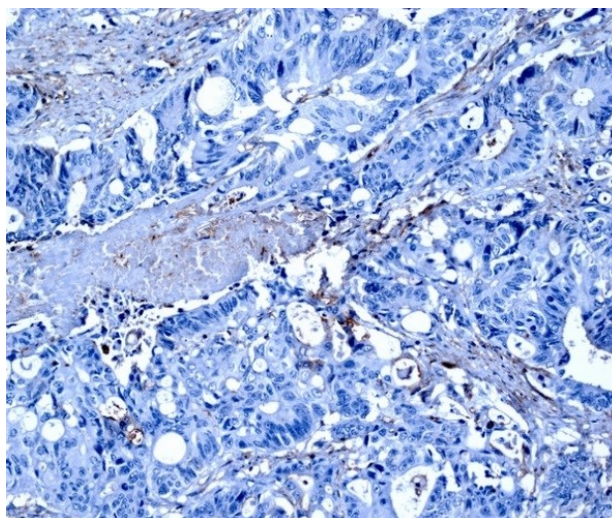




**Рисунок 5.13.** Выраженная экспрессия ALDH1. Ув. x400

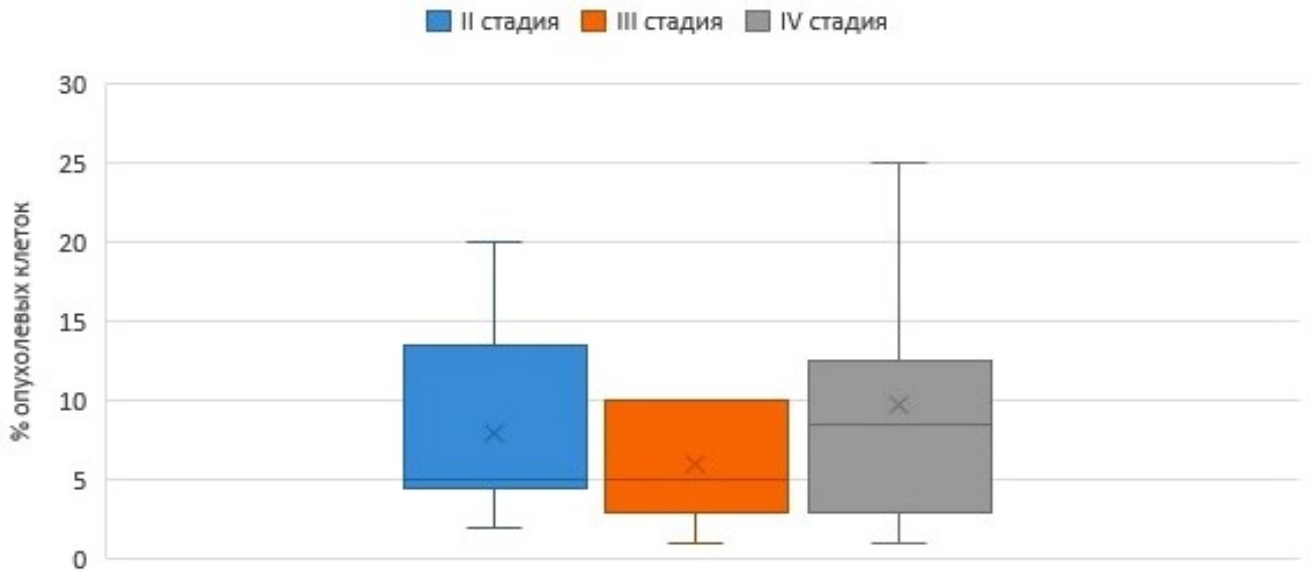


**Рисунок 5.14.** Экспрессия ALDH1 единичными опухолевыми клетками. Ув. x200



**Рисунок 5.15.** Отсутствие экспрессии ALDH1 опухолевыми клетками. Ув. x200

Разброс клеток по экспрессии ALDH1 в опухоли при различных стадиях рака ободочной кишки представлен на рисунке 5.16.



**Рисунок 5.16.** Диаграмма размаха экспрессии ALDH1 опухолевыми клетками при II-IV стадиях рака ободочной кишки

Так, при II стадии разброс ALDH1 находился в пределах от единичных до 20% (Me:5). При III стадии разброс позитивных клеток по экспрессии ALDH1 находился в пределах от единичных до 10% (Me:5), тогда как в опухолях IV стадии – от единичных клеток до 25% (Me:8.5).

Анализ экспрессии ALDH1 в опухолях различных гистологических характеристик представлен в таблице 5.12. Нами выявлено нарастание количества положительной экспрессии в зависимости от степени дифференцировки опухоли. Так при G3 дифференцировке положительных случаев выявлено в 1,5 раза и 4,7 раза больше в сравнении с G2 и G1 соответственно. При этом, в опухолях G1 и G2 преобладала ALDH1-отрицательная экспрессия, которая отмечалась в 1,6 и 2,0 раза чаще, чем ALDH1-положительная экспрессия. В опухолях низкой степени дифференцировки (G3), напротив, практически все опухоли экспрессировали ALDH1, превышая доли отрицательных по экспрессии в 21,2 раза ( $p < 0,05$ ). При сравнении со степенью злокачественности, статистически значимо в опухолях



низкой степени злокачественности экспрессия ALDH1+ встречалась в 2,8 раза реже, чем в опухолях высокой степени злокачественности ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 5.12** – Анализ экспрессии ALDH1 в зависимости от различных гистологических характеристик опухоли

Клинико-морфологические характеристики опухоли	Всего больных (n=299)		Экспрессия ALDH1				p
			ALDH1+		ALDH1-		
	абс.	отн., %	абс.	отн, %	абс.	отн., %	
Степень дифференцировки опухоли							
G1	46	15,4	18	39,1	28	60,9	p<0,001 ( $\chi^2=92,715$ )
G2	165	55,2	55	33,3	110	66,7	
G3	88	29,4	84	95,5	4	4,5	
Степень злокачественности опухоли							
Низкая степень	211	70,6	73	34,6	138	65,4	p<0,001 ( $\chi^2=92,231$ )
Высокая степень	88	29,4	84	95,5	4	4,5	
Гистологическая структура опухоли							
Аденокарцинома NOS	242	81,0	127	52,5	115	47,5	p=0,979 ( $\chi^2=0,043$ )
Перстневидно-клеточный рак	12	4,0	6	50,0	6	50,0	
Муцинозная аденокарцинома	45	15,0	24	53,3	21	46,7	
Лимфоваскулярная инвазия							
Есть	269	90,0	142	52,8	127	47,2	p=0,772 ( $\chi^2=0,084$ )
Нет	30	10,0	15	50,0	15	50,0	
Периневральная инвазия							
Есть	251	83,9	140	55,8	111	44,2	p=0,010 ( $\chi^2=6,698$ )
Нет	48	16,1	17	35,4	31	64,6	
Лимфоцитарная инфильтрация							
Слабая	98	32,8	82	83,7	16	16,3	p<0,001 ( $\chi^2=59,506$ )
Умеренная	144	48,2	59	41,0	85	59	
Выраженная	57	19	16	28,1	41	71,9	

В зависимости от гистологической структуры опухоли не было найдено статистически значимой связи с уровнем экспрессии. Стоит отметить, что доля положительных случаев была сравнимой между аденокарциномой без уточнений и муцинозной аденокарциномой, составляя чуть более половины всех случаев. Доля положительной и отрицательной экспрессии ALDH1 при перстневидно-клеточном раке была одинаковой, составляя 50%.

Связь между лимфоваскулярной инвазией и экспрессией ALDH1 не была статистически значимой. Наличие периневральной инвазии, напротив, в 1,6 раза чаще сопровождалось положительной экспрессией, составляя 55,8% против 35,4% при ее отсутствии ( $p < 0,05$ ).

В нашем исследовании выявлено снижение экспрессии с увеличением степени лимфоцитарной инфильтрации опухоли. Наиболее часто положительная экспрессия ALDH1 встречалась при слабой степени лимфоцитарной инфильтрации в опухоли, составляя 83,7%, что в 3 раза превышало уровень положительной экспрессии при выраженной степени лимфоцитарной инфильтрации (28,1%). Инфильтрация опухолевых клеток лимфоцитами характеризовалась снижением положительной экспрессии ALDH1 в 2,0 раза от слабой к умеренной, в 1,5 раза от умеренной к выраженной ( $p < 0,05$ ).

Как наглядно представлено в таблице 5.12, статистически значимая связь выявлена между экспрессией ALDH1 и степенью дифференцировки опухоли ( $p < 0,001$ ), периневральной инвазией ( $p = 0,010$ ) и лимфоцитарной инфильтрацией ( $p < 0,001$ ). Значимой связи между гистологической структурой опухоли ( $p = 0,979$ ) и лимфоваскулярной инвазией ( $p = 0,772$ ) и экспрессией ALDH1 выявлено не было.

Локализация опухоли в различных отделах толстой кишки не показала статистически значимой связи с уровнем экспрессии ALDH1. Полученные результаты демонстрирует таблица 5.13.

**Таблица 5.13** – Анализ экспрессии ALDH1 в зависимости от локализации опухоли

Локализация опухоли	Всего больных (n=299)		Экспрессия ALDH1				p
			ALDH1+		ALDH1-		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Правая половина ободочной кишки	67	22,4	40	59,7	27	40,3	p=0,349 ( $\chi^2=2,109$ )
Поперечно-ободочная кишка	93	31,1	49	52,7	44	47,3	
Левая половина ободочной кишки	139	46,5	68	48,9	71	51,1	

Анализ результатов экспрессии ALDH1 в зависимости от критериев классификации опухолей по системе TNM представлены в таблице 5.14.

**Таблица 5.14** – Анализ экспрессии ALDH1 в зависимости от критериев классификации по системе TNM

Характеристики опухоли	Всего больных (n=299)		Экспрессия ALDH1				p
			ALDH1+		ALDH1-		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Уровень инвазии опухоли							
pT1-T2	45	15,1	21	46,7	24	53,3	p=0,018 ( $\chi^2=8,084$ )
pT3	172	57,5	82	47,7	90	52,3	
pT4	82	27,4	54	65,9	28	34,1	
Статус лимфоузлов							
N0	116	38,9	58	50,0	58	50,0	p=0,788 ( $\chi^2=0,478$ )
N1	111	37,0	60	54,1	51	46,9	
N2	72	24,1	39	54,2	33	45,8	
Метастатический индекс лимфоузлов							
≤ 0,25	50	27,3	27	54,0	23	46,0	p=0,987 ( $\chi^2=0,000$ )
> 0,25	133	72,7	72	54,1	61	45,9	
Отдаленные метастазы							
M0	198	66,2	71	35,9	127	64,1	p<0,001 ( $\chi^2=65,161$ )
M1a	101	33,8	86	85,1	15	14,9	

Анализ экспрессии ALDH1 при различном уровне инвазии показал нарастание доли положительных случаев при увеличении степени инвазии. Так, наибольшая экспрессия выявлена при распространении опухоли в окружающие органы и ткани или серозную оболочку кишки (T4), что превосходило уровень инвазии на мышечный слой (T2) и прорастанием всех слоев стенки и жировой клетчатки без поражения соседних органов (T3) в 1,4 раза ( $p<0.05$ ). Сравнение экспрессии при pT1-T2 и pT3 демонстрирует незначительное превышение более 50% доли ALDH1- над ALDH1+, тогда как при pT4 выявлена обратная закономерность, где соотношение ALDH1+/ ALDH1- составило 1,9.

Не обнаружена статистически значимая связь между уровнем экспрессии ALDH1 и наличием или отсутствием поражения лимфатических узлов. Доля положительной экспрессии ALDH1 была на одном уровне и при различном

количестве метастатических лимфоузлов. Положительная экспрессия ALDH1 при индексе метастатического поражения  $> 0,25$  и  $\leq 0,25$  не имела статистически значимых различий и составляла 54,1% и 54,0% соответственно.

Превалирующей положительной экспрессией ALDH1 в 85,1% характеризовались опухоли при наличии отдаленных метастазов, что в 2,4 раза превышало данный показатель при отсутствии метастатического поражения печени.

Изучение экспрессии ALDH1 выявило статистически значимую связь с глубиной инвазии опухоли ( $p=0,018$ ) и наличием отдаленных метастазов ( $p<0,001$ ). Статистически значимой связи экспрессии ALDH1 и статусом поражения регионарных лимфоузлов, а также метастатическим индексом не выявлено.

ЭМП имеет фундаментальное значение для метастазирования злокачественных опухолей, приводя к увеличению подвижности клеток и их инвазии. Подвижность ОСК может быть обусловлена приобретением ими временного фенотипа ЭМП в дополнение к стволовоклеточному фенотипу, что позволяет им образовывать метастатические колонии; это представление легло в основу концепции мигрирующих стволовых клеток (Cai Z. et al., 2018). Обратный процесс МЭП в отдаленном метастатическом органе позволяет ОСК колонизировать орган и формировать макрометастаз, сходный с первичной опухолью. Эта концепция подтверждается тем, что как ЭМП, так и стволовоклеточный фенотип регулируются эмбриональными путями, такими как сигнальный путь Wnt и TGF- $\beta$  (Cai Z. et al., 2018).

Стволовоклеточный опухолевый потенциал поддерживается также и пластичностью ОСК и не-ОСК, вызывающих развитие рецидива опухоли. Пластичность регулируется гетерогенным опухолевым микроокружением (Poltavets V. et al., 2018). Пластичность клеток – это характеристика, которая обеспечивает надежную регенерацию тканей, поддержание гомеостаза (Aloia L. et al., 2016) и характеризует способность опухоли к самообновлению (Yuan S., 2019). Этот фенотип тесно связан с ЭМП (Gupta P.V. et al., 2019). Переход от

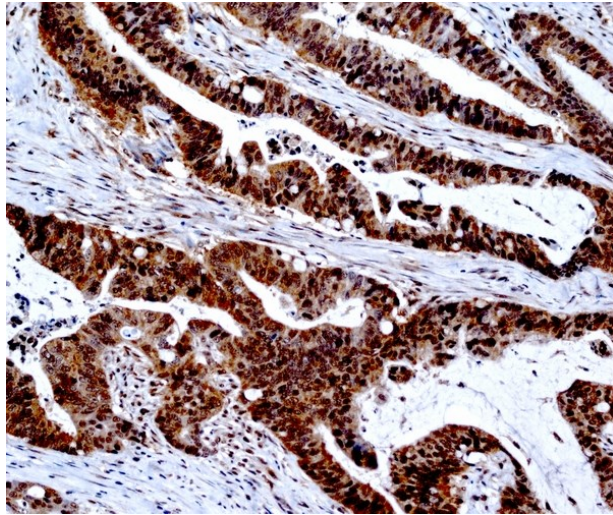
эпителиального к мезенхимальному состоянию связан с определенными регуляторными сетями и экспрессией генов, которые специфичны для эпителиального, мезенхимального или гибридного состояния (Gupta P.V. et al., 2019; Yuan S. et al., 2019).

ZEB1 является главным регулятором EMT, и его дерегуляция наблюдается при различных типах рака и других патологических процессах (Caramel J. et al., 2018; Simeone P. et al., 2019). В последние годы стало понятно, что ZEB1 экспрессируется различными иммунными клетками, как миелоидных, так и лимфоидных линий, включая дендритные клетки, макрофаги, моноциты, В, Т и NK клетки (Scott C.L. et al., 2019). В экспериментальных работах продемонстрировано, что Zeb1 является «движущей силой» рака, создавая условия для повышения пластичности опухолевых клеток, изменения их метаболизма, увеличение стволовклеточного и метастатического потенциала (Krebs A.M. et al., 2017).

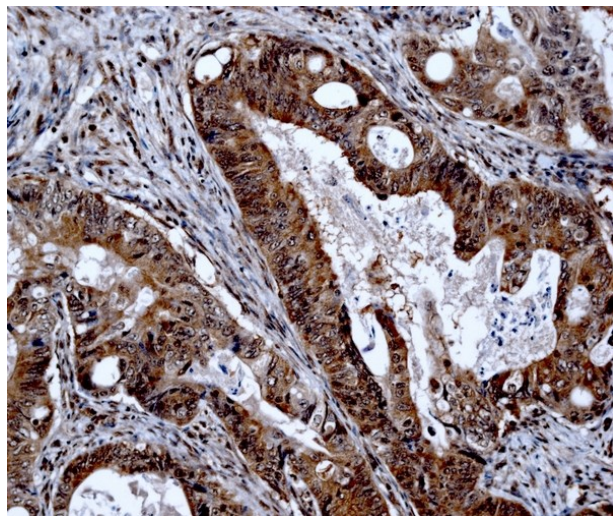
Экспрессию ZEB1 оценивали в баллах, для чего определяли интенсивность и степень окрашивания. Оценку интенсивности окрашивания проводили следующим образом: отсутствие окрашивания – 0; слабое окрашивание – 1; умеренное окрашивание – 2; и сильное окрашивание – 3. Оценку степени окрашивания проводили при подсчете процента окрашенных клеток следующим образом: <11% положительных клеток – 1; 11-50% положительных клеток – 2; 51-75% положительных клеток – 3; и > 75% положительных клеток - 4. Окончательные баллы (диапазон 0-12) были рассчитаны путем умножения оценки интенсивности на оценку окрашивания. Экспрессия рассматривалась как положительная при баллах >2 (Chen J, et al., 2019).

Положительная экспрессия ZEB1 выявлена в 80,6% (241 из 299 больных), тогда как отрицательная значительно реже в 19,4% (58 из 299 больных) (рисунок 5.17 – 5.20).

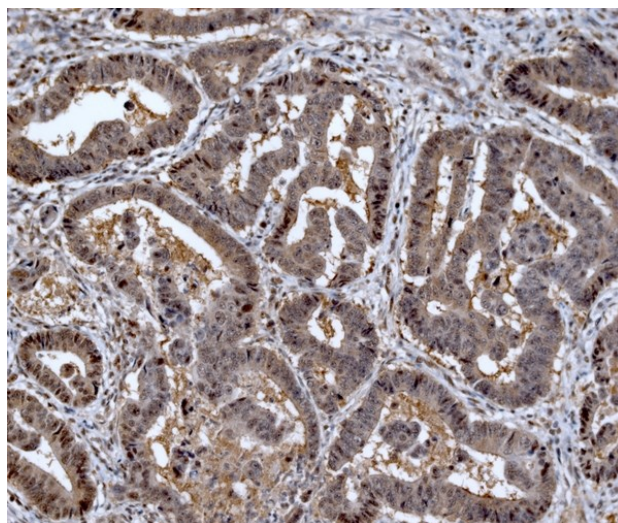




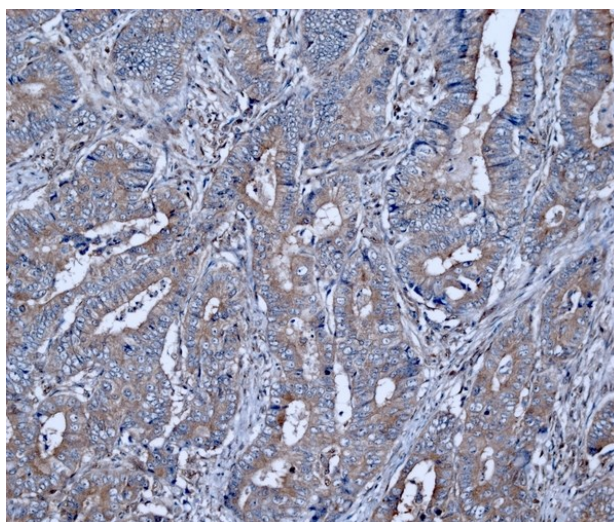
**Рисунок 5.17.** Экспрессия ZEB1. Сильное окрашивание ядер опухолевых клеток, 3+. Ув. x200



**Рисунок 5.18.** Экспрессия ZEB1. Умеренное окрашивание ядер опухолевых клеток, 2+. Ув. x200



**Рисунок 5.19.** Экспрессия ZEB1. Слабое окрашивание ядер опухолевых клеток, 1+. Ув. x200



**Рисунок 5.20.** Отсутствие экспрессии ZEB1 в ядрах опухолевых клеток, 0. Ув. x200

Обнаружена статистически значимая связь между стадиями опухолевого процесса и экспрессией ZEB1 ( $p < 0,05$ ). Полученные результаты представлены в таблице 5.15.

**Таблица 5.15** – Экспрессия ZEB1 в опухолях больных раком ободочной кишки различных стадий

Стадии заболевания	Экспрессия ZEB1				p
	ZEB1 +		ZEB1 -		
	отн., %	абс.	отн., %	абс.	
II стадия (n=110)	59,1	65	40,9	45	p<0,001 ( $\chi^2=58,066$ )
III стадия (n=88)	85,2	75	14,8	13	
IV стадия (n=101)	100,0	101	-	-	

Нами выявлено увеличение доли ZEB1 + опухолей при увеличении стадии заболевания. В IV стадии отмечен рост таких опухолей в 1,7 раза и 1,2 в сравнении со II и III стадиями. В нашем исследовании опухолей с отсутствием экспрессии ZEB1 в IV стадии выявлено не было. Во II стадии заболевания соотношение опухолей ZEB1+/ZEB1- составляло 1,4, в III – 5,8 ( $p < 0,05$ ).

Разброс позитивных клеток ZEB1+ в опухолях ободочной кишки находился в пределах от 5% до 90% всей площади опухоли. При II стадии разброс ZEB1 находился в пределах от единичных до 90% (Me:40). При III стадии разброс позитивных клеток по экспрессии ZEB1 находился в пределах от 60 до 90% (Me:80), в опухолях IV стадии – от 55 % до 90% (Me:75).

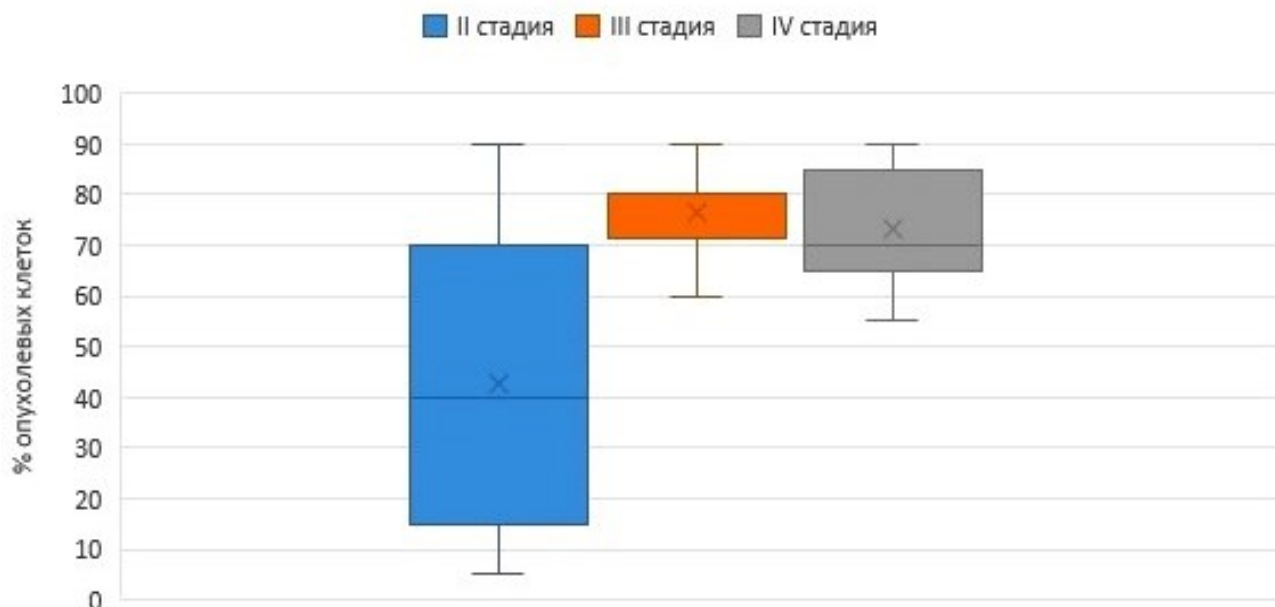
Полученные результаты среднего балла экспрессии ZEB1 опухолевыми клетками демонстрирует таблица 5.16.

**Таблица 5.16** – Экспрессия ZEB1 опухолевыми клетками при II-IV стадиях заболевания (средний балл экспрессии)

Экспрессия маркера	Стадии заболевания		
	II стадия	III стадия	IV стадия
Средний балл экспрессии	4,3±0,7	8,8±1,3*	9,4±0,8*

Примечание. \* - различия показателей статистически значимы по отношению ко II стадии ( $p \leq 0,05$ ).

Как видно из представленных в таблице 5.16 данных, средний балл экспрессии ZEB1 был статистически значимо выше при III и IV стадиях по сравнению с II (в 2,0 раза и 2,2 раза соответственно,  $p \leq 0,05$ ). Статистической значимости среднего балла экспрессии между III и IV стадиями выявлено не было.



**Рисунок 5.21.** Диаграмма размаха экспрессии ZEB1 опухолевыми клетками при II-IV стадиях заболевания

Разброс доли клеток по экспрессии ZEB1 при различных стадиях представлен на рисунке 5.21.

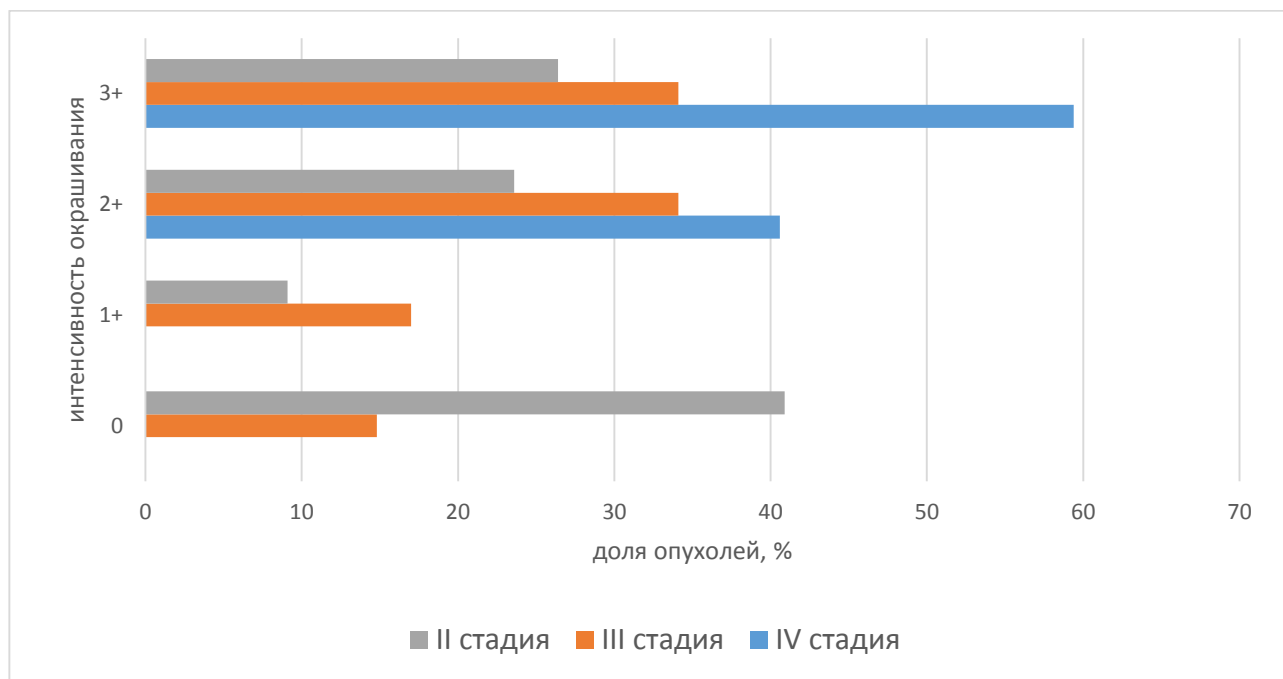


Полученные результаты интенсивности экспрессии ZEB1 представлены в таблице 5.17 и на рисунке 5.22.

**Таблица 5.17** – Интенсивность экспрессии ZEB1 в опухолях ободочной кишки различных стадий

Стадии заболевания	Интенсивность экспрессии								p
	0		1+		2+		3+		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
II стадия (n=110)	45	40,9	10	9,1	26	23,6	29	26,4	p<0,01
III стадия (n=88)	13	14,8	15	17,0	30	34,1	30	34,1	
IV стадия (n=101)	-	-	-	-	41	40,6	60	59,4	

При анализе интенсивности экспрессии ZEB1 в опухолях ободочной кишки выявлена статистически значимая связь между интенсивностью окрашивания опухолевых клеток ZEB1 и стадией заболевания.



**Рисунок 5.22.** Интенсивность экспрессии ZEB1 в опухолях ободочной кишки

Как видно из представленных в таблице 5.17 и на рисунке 5.22 данных, на долю случаев с интенсивностью окрашивания 2+ и 3+ в IV стадии приходилось 100% опухолей, тогда как при II и III стадиях их доля составляла 50% и 68,2%, что в 2 раза и 1,5 раза меньше данного показателя IV стадии. Отсутствие и слабое

окрашивание в 1,6 раза отмечено чаще при II стадии в сравнении с III стадией. Случаев слабого окрашивания или его отсутствия в IV стадии выявлено не было.

При изучении экспрессии ZEB1 в зависимости от гистологических особенностей опухоли не выявлена статистически значимая связь между степенью дифференцировки, степенью злокачественности опухоли, гистологической структурой опухоли, лимфоваскулярной и периневральной инвазией. Полученные результаты представлены в таблице 5.18.

**Таблица 5.18** – Анализ экспрессии ZEB1 в зависимости от гистологических характеристик опухоли

Клинико-морфологические характеристики опухоли	Всего больных (n=299)		Экспрессия ZEB1				p
	абс.	отн., %	ZEB1+		ZEB1-		
абс.			отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %
Степень дифференцировки опухоли							
G1	46	15,4	38	82,6	8	17,4	p=0,914 ( $\chi^2=0,181$ )
G2	165	55,2	133	80,6	32	19,4	
G3	88	29,4	70	79,5	18	20,5	
Степень злокачественности опухоли							
Низкая степень	211	70,6	171	81,0	40	19,0	p=0,766 ( $\chi^2=0,089$ )
Высокая степень	88	29,4	70	79,5	18	20,5	
Гистологическая структура опухоли							
Аденокарцинома NOS	242	81,0	196	81,0	46	19,0	p=0,872 ( $\chi^2=0,275$ )
Перстневидно-клеточный рак	12	4,0	9	75,0	3	25,0	
Муцинозная аденокарцинома	45	15,0	36	80,0	9	20,0	
Лимфоваскулярная инвазия							
Есть	269	90,0	220	81,8	49	18,2	p=0,122 ( $\chi^2=2,397$ )
Нет	30	10,0	21	70,0	9	30,0	
Периневральная инвазия							
Есть	251	83,9	206	82,1	45	17,9	p=0,142 ( $\chi^2=2,160$ )
Нет	48	16,1	35	72,9	13	27,1	
Лимфоцитарная инфильтрация							
Слабая	98	32,8	90	91,8	8	8,2	p<0,001 ( $\chi^2=21,349$ )
Умеренная	144	48,2	116	80,6	28	19,4	
Выраженная	57	19	35	61,4	22	38,6	

Оценка лимфоцитарной инфильтрации в опухоли показала статистически значимую связь характера выраженности инфильтрации и уровня экспрессии ZEB1 ( $p<0.05$ ). Так, наиболее часто положительная экспрессия встречалась в

опухолях со слабой лимфоцитарной инфильтрацией, на ее долю приходилось 91,8%, что в 1,3 и 1,5 раза выше положительной экспрессии в случаях с умеренной или выраженной степенью инфильтрации. Кроме того, соотношение ZEB+/ZEB- экспрессии внутри опухолей в случае со слабой лимфоцитарной инфильтрацией также являлось максимальным, составляя 11,2, тогда как в случаях умеренной и выраженной инфильтрации 4,2 и 1,6 соответственно (таблица 5.19).

Связь локализации опухоли в различных отделах толстого кишечника и экспрессией ZEB1 оказалась статистически не значима, хотя несколько чаще экспрессия ZEB1 была выявлена при локализации опухоли в поперечно-ободочной кишке и левой половине ободочной кишки (таблица 5.19).

**Таблица 5.19** – Анализ экспрессии ZEB1 в зависимости от локализации опухоли

Локализация опухоли	Всего больных (n=299)		Экспрессия ZEB1				p
			ZEB1+		ZEB1-		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Правая половина ободочной кишки	67	22,4	51	76,1	16	23,9	p=0,574 ( $\chi^2=1,113$ )
Поперечно-ободочная кишка	93	31,1	76	81,7	17	18,3	
Левая половина ободочной кишки	139	46,5	114	82,0	25	18,0	

Анализ экспрессии ZEB1 в зависимости от уровня инвазии отражает высокие преобладающие значения положительной экспрессии при распространении опухоли на все слои стенки и жировой клетчатки без поражения соседних органов (T3) (92,4%) и при прорастании опухоли в окружающие органы и ткани или серозную оболочку кишки (T4) (89,0%) ( $p<0,05$ ). Наоборот, при уровне инвазии T1-T2 опухоли ZEB1- преобладали и встречались в 4 раза чаще. Полученные данные представлены в таблице 5.20.

В нашем исследовании максимальная экспрессия ZEB1 встречалась при наличии метастатического поражения более 3 регионарных лимфатических узлов, и превышала данный показатель в 1,2 раза в случаях поражения от 1 до 3 лимфоузлов и при отсутствии метастазов в лимфоузлы ( $p<0,05$ ). Экспрессия в

случае отсутствия метастатического поражения лимфатических узлов и при поражении не более 3-х узлов была практически одинакова, составляя 75,9% и 78,4%.

Как отражено в таблице 5.20, при индексе  $> 0,25$ , в сравнении с индексом  $\leq 0,25$  отмечается повышение в 1,5 раза доли положительной экспрессии ZEB1 ( $p < 0,05$ ).

Статистически значимой являлась связь экспрессии ZEB1 и наличия отдаленных метастазов, где доля ZEB1+ в 1,2 раза выше встречалась при M1a ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 5.20** – Анализ экспрессии ZEB1 в зависимости от критериев классификации опухоли по системе TNM

Критерии TNM	Всего больных (n=299)		Экспрессия ZEB1				p
			ZEB1+		ZEB1-		
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Уровень инвазии опухоли							
pT1-T2	45	15,1	9	20,0	36	80,0	p<0,001 ( $\chi^2=124,844$ )
pT3	172	57,5	159	92,4	13	7,6	
pT4	82	27,4	73	89,0	9	11,0	
Статус лимфоузлов							
N0	116	38,9	88	75,9	28	24,1	p=0,022 ( $\chi^2=7,656$ )
N1	111	37,0	87	78,4	24	21,6	
N2	72	24,1	66	91,7	6	8,3	
Метастатический индекс лимфоузлов							
$\leq 0,25$	50	27,3	30	60,0	20	40,0	p<0,001 ( $\chi^2=27,972$ )
$> 0,25$	133	72,7	123	92,5	10	7,5	
Отдаленные метастазы							
M0	198	66,2	149	75,3	49	24,7	p=0,002 ( $\chi^2=10,728$ )
M1a	101	33,8	92	91,1	9	8,9	

Таким образом, проведенный анализ уровня экспрессии ZEB1 и исследованных параметров классификации TNM выявил статистически значимую связь между уровнем инвазии опухоли ( $p < 0,001$ ), статусом лимфоузлов ( $p = 0,022$ ), метастатическим индексом лимфоузлов ( $p < 0,001$ ) и отдаленными метастазами ( $p = 0,002$ ).

Проведенное иммуногистохимическое исследование маркеров опухолевых стволовых клеток и ЭМП ZEB1 выявило некоторые особенности их экспрессии при различных клинико-морфологических особенностях рака ободочной кишки.

Проведенный анализ выявил статистически значимую связь экспрессии CD44, CD133, ALDH1 и ZEB1 и:

- стадии заболевания (CD44 ( $p=0,027$ ), CD133 ( $p=0,047$ ), ALDH1 ( $p=0,003$ ), ZEB1 ( $p<0,001$ ));
- степени выраженности лимфоцитарной инфильтрации (CD44 ( $p<0,001$ ), CD133 ( $p<0,001$ ), ALDH1 ( $p<0,001$ ), ZEB1 ( $p<0,001$ ));
- уровня инвазии опухоли T (CD44 ( $p<0,001$ ), CD133 ( $p<0,001$ ), ALDH1 ( $p=0,018$ ), ZEB1 ( $p<0,001$ ));
- наличия отдаленных метастазов (CD44 ( $p<0,001$ ), CD133 ( $p<0,001$ ), ALDH1 ( $p<0,001$ ), ZEB1 ( $p=0,002$ )).

Статистически значимая связь экспрессии трех из четырех исследованных параметров выявлена и для:

- периневральной инвазии опухолевыми клетками (CD44 ( $p=0,002$ ), CD133 ( $p=0,003$ ), ALDH1 ( $p=0,010$ ));
- статуса лимфатических узлов N (CD44 ( $p<0,001$ ), CD133 ( $p=0,002$ ), ZEB1 ( $p=0,022$ )).

Два из четырех исследованных параметра продемонстрировали значимую связь с:

- степенью злокачественности опухоли (CD44 ( $p<0,001$ ), ALDH1 ( $p<0,001$ ));
- гистологической структурой опухоли (CD44 ( $p=0,042$ ), CD133 ( $p=0,005$ ));
- лимфоваскулярной инвазией (CD44 ( $p<0,001$ ), CD133 ( $p=0,041$ ));
- метастатическим индексом лимфоузлов (CD44 ( $p<0,001$ ), ZEB1 ( $p<0,001$ )).

Выявлена единственная значимая связь исследованных параметров и степени дифференцировки опухоли (ALDH1 ( $p<0,01$ )).

Локализация опухоли в различных отделах толстой кишки не продемонстрировала значимой связи ни с одним из исследованных параметров.

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.

## 5.2. Характеристика экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток и эпителиально-мезенхимального перехода в ткани опухоли ободочной кишки при различном уровне циркулирующих опухолевых клеток

Как видно из представленных в таблице 5.21 данных, наиболее часто отсутствие опухолевых клеток в периферической крови наблюдалось при отсутствии экспрессии в опухоли CD44, где разница с долей опухолей CD44+ и отсутствием ЦОК составляла 15,1%. Частота обнаружения ЦОК в крови в 1,3 возрастала при фенотипе опухолевых клеток CD44+ ( $p \leq 0,05$ ). Наличие в опухоли клеток с фенотипом CD44+ в 1,2 и 1,3 раза повышало частоту выявления ЦОК в крови, соответственно от 1 до 3 ЦОК и свыше 3-х ЦОК ( $p \leq 0,05$ ).

**Таблица 5.21** – Анализ экспрессии маркеров ОСК и ЭМП в зависимости от различного уровня ЦОК в периферической крови

Маркер	0 ЦОК		1-3 ЦОК		Более 3-х ЦОК		p ( $\chi^2$ )
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	
Экспрессия CD44							
CD44+ (n=138)	40	29,0	48	34,8	50	36,2	p=0,026 ( $\chi^2=7.357$ )
CD44- (n=161)	71	44,1	46	28,6	44	27,3	
Экспрессия CD133							
CD133+ (n=172)	50	29,1	65	37,8	57	33,1	p=0,002 ( $\chi^2=12.647$ )
CD133- (n=127)	61	48,0	29	22,8	37	29,2	
Экспрессия ALDH1							
ALDH1+ (n=157)	32	20,4	60	38,2	65	41,4	p<0,001 ( $\chi^2=40.228$ )
ALDH1- (n=142)	79	55,6	34	24,0	29	20,4	
Экспрессия ZEB1							
ZEB1+ (n=241)	60	24,9	87	36,1	94	39,0	p<0,001 ( $\chi^2=81.245$ )
ZEB1- (n=58)	51	87,9	7	12,1	-	-	

Доля больных с выявленными ЦОК в 2,4 раза превышала долю больных с отсутствием опухолевых клеток в крови при фенотипе опухоли CD133+, напротив, этот показатель при CD133- опухоли соответствовал 1,1. Наиболее часто в нашем исследовании от 1 до 3 ЦОК выявлено при CD133+ фенотипе опухоли, что в 1,7 превышало показатель при CD133-. Кроме того, более 3-х ЦОК в 1,1 раза чаще выявлялись при CD133+ в сравнении с CD133- опухолями ( $p \leq 0,05$ ).

Экспрессия ALDH1 продемонстрировала более выраженные взаимоотношения экспрессии маркера и уровня ЦОК в крови. Доля больных с выявленными ЦОК при ALDH1+ составила 79,6%, тогда как при ALDH1- экспрессии в опухоли 44,4%. Наиболее часто более 3-х ЦОК определялось при экспрессии в опухоли ALDH1+ (41,4%), несколько реже при данном фенотипе опухолевых клеток встречались больные с ЦОК в количестве 1-3 ЦОК (38,2%). Фенотип опухолевых клеток ALDH1- характеризовался значительно меньшей частой встречаемости 1-3 ЦОК и более 3-х ЦОК, в 1,6 и 2,0 раза соответственно, в сравнении с ALDH1+ опухолями ( $p \leq 0,05$ ).

Частота выявления ЦОК в 6,2 раза возрастала при экспрессии опухолевыми клетками ZEB1, в сравнении с отсутствием экспрессии данного маркера. При этом, ЦОК более 3-х в крови нами не было выявлено в опухолях с фенотипом ZEB1-, напротив, доля опухолей ZEB1+ и ЦОК свыше 3-х клеток составила 39,0%. В 3 раза чаще ЦОК от 1 до 3-х клеток выявлены при фенотипе опухоли ZEB1+ ( $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, в нашем исследовании статистически значимая связь между экспрессией маркеров опухолевых стволовых клеток, ZEB1 и количеством ЦОК в периферической крови продемонстрирована для CD44 ( $p=0,026$ ), CD133 ( $p=0,002$ ), ALDH1 ( $p<0,001$ ) и ZEB1 ( $p<0,001$ ).

## ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И ХАРАКТЕРИСТИК ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ

Иммунологическое микроокружение, как известно, играет определяющую роль как в канцерогенезе и опухолевом росте, так и в эффективности иммунотерапии ингибиторами иммунных контрольных точек. После удаления опухоли резидуальные опухолевые клетки, среди которых есть стволовые (ОСК) способны выживать и длительно присутствовать, формируя новые резистентные к лечению и к действию иммунокомпетентных клеток клоны (Ayob A.Z. et al., 2018; Xu F. et al., 2018; Kuşoğlu A., et al., 2019; Marzagalli M. et al., 2021), а также участвуя в формировании микроокружения, способствующего их выживанию. Как указано в предыдущих главах, среди ОСК опухолей толстой кишки известны клетки, экспрессирующие, помимо эпителиального маркера CD326+, маркеры CD44+ и CD133+, а также коэкспрессирующие их.

В таблице 6.1 представлены результаты определения процентного содержания различных клеток в микроокружении опухолей ободочной кишки больных различных стадий, включающие как клетки лимфоцитарного, так и опухолевые, в т.ч. экспрессирующие маркеры ОСК. Как видно из представленных в таблице 6.1 данных, генерализованные формы рака ободочной кишки сопровождаются статистически более высоким уровнем НКТ-лимфоцитов и более низким - лимфоцитов, экспрессирующих PD-L1 и PD-1 ( $p \leq 0,05$ ). У больных с отдаленным метастазированием количество PD-1-экспрессирующих лимфоцитов оказалось в среднем на 25% ниже, чем у больных, у которых метастазов не было.

У больных IV стадии выявлено более высокое содержание ОСК с иммунофенотипом CD326+CD44+, а также опухолевых клеток, коэкспрессирующих CD326+CD44+CD133+, кроме того, отмечено статистически значимо более низкое количество опухолевых клеток, экспрессирующих HLA-ABC и HLA-E и PD-L1 ( $p \leq 0,05$ ).



**Таблица 6.1** – Фенотипическая характеристика опухолевых клеток и их лимфоцитарного микроокружения у больных раком ободочной кишки с наличием/отсутствием 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
NKT	3,8±0,5	6,0±0,6 ↑*
CD56+	12,9±2,2	9,1±3,0
CD19+	19,7±0,8	20,5±0,9
CD4+/CD45RA-/CD45RO+	70,9±3,4	77,0±1,3
CD8+/CD45RA-/CD45RO+	72,5±3,1	67,2±2,0
CD4+/CD45RA+/CD62-L+	11,5±1,5	10,0±1,0
CD8+/CD45RA+/CD62-L+	7,4±1,8	6,3±0,8
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 ( $p \leq 0,05$ ).

Учитывая вариабельность уровня ОСК с маркерами CD44+ и CD133+, нами было проведено разделение на основании их процентного содержания от общего количества опухолевых клеток, содержащихся в гомогенате ткани. Разделение проб на основании содержания CD326+CD44+ клеток проводили по следующей схеме: низкий уровень – до 2% клеток в опухоли; средний уровень – от 2 до 10% клеток в опухоли; высокий уровень – более 10% клеток в опухоли. Разделение проб на основании содержания CD326+CD133+ клеток проводили по следующей схеме: низкий уровень – до 5% клеток в опухоли; высокий уровень – выше 5% клеток в опухоли. Принадлежность клеток к опухолевым определяли по

экспрессии ими CD326 при отсутствии CD45. Отдельно учитывали процент ОСК, коэкспрессирующих CD44+ и CD133+. Сравнительную оценку уровней иммунокомпетентных клеток проводили в группах больных, выделенных по указанным критериям. Кроме маркеров ОСК, на опухолевых клетках определяли экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости 1 класса и PD-L1. Результаты представлены в таблицах 6.2, 6.3, 6.4.

**Таблица 6.2** – Фенотипическая характеристика опухолевых клеток и их лимфоцитарного микроокружения у больных раком ободочной кишки в зависимости от уровня экспрессии CD326+CD44+ в опухоли и вне зависимости от стадии

Показатели, %	Низкий уровень	Средний уровень	Высокий уровень
Лимфоцитарное микроокружение			
CD3+	69,2±4,3	67,1±3,6	69,9±5,3
CD3+CD4+	39,9±2,7	37,3±2,5	37,9±3,3
CD3+CD8+	26,0±2,7	28,6±2,5	27,7±3,3
T-reg	4,9±0,4	4,7±0,4	12,2±0,9 ↑*↑°
NKT	5,6±0,5	5,0±0,7	4,7±0,8
CD56+	10,4±2,2	9,4±1,7	12,5±3,4
CD19+	17,4±1,1	22,3±1,4 ↑*	16,2±1,5 ↓°
CD4+/CD45RA-/CD45RO+	69,0±3,4	71,2±2,0	84,2±1,6 ↑*↑°
CD8+/CD45RA-/CD45RO+	68,5±4,2	65,3±2,6	75,0±1,8 ↑°
CD4+/CD45RA+/CD62-L+	13,6±1,6	11,9±1,2	6,2±1,1 ↓*↓°
CD8+/CD45RA+/CD62-L+	6,9±1,6	5,2±0,5	8,6±2,2
CD56+CD335+	30,2±2,7	26,5±2,7	11,2±1,0 ↓*↓°
CD274+	48,0±2,7	29,7±1,6 ↓*	32,6±5,1 ↓*
CD279+	40,9±5,4	31,4±2,6	41,0±4,4
Опухолевые клетки			
CD326+HLA-ABC	53,6±6,6	61,2±3,1	72,1±5,6 ↑*
CD326+HLA-E	21,2±1,3	20,2±1,4	27,4±2,6 ↑*↑°
CD326+CD274+	5,0±0,3	11,1±0,9 ↑*	12,4±1,9 ↑*

Примечания: \* - различия показателей статистически значимы по отношению к низкому уровню ( $p \leq 0,05$ ); ° - различия показателей статистически значимы по отношению к среднему уровню ( $p \leq 0,05$ ).

Как видно из таблицы 6.2, у больных, со средним уровнем локального содержания CD326+CD44+ клеток выявлено 3 статистически значимых различия от отнесенных к низкому уровню, а именно, доля В-лимфоцитов и опухолевых

клеток, экспрессирующих PD-L1, были выше, при этом количество лимфоцитов, экспрессирующих PD-L1, оказалось ниже. У больных с высоким уровнем, обнаружено больше статистически значимых различий: 8 от низкого и 7 от среднего уровней. Так, у них найдено более высокое содержание T-regs, а также Tm среди как CD4+, так и CD8+, и более низкое CD4+naiv, CD335+ NK-клеток, лимфоцитов, экспрессирующих PD-L1. Среди опухолевых клеток с экспрессией маркера ОСК CD44 среднего и высокого уровней выявлено статистически значимо больше положительных по PD-L1, а также положительных по HLA-ABC и HLA-E.

**Таблица 6.3** – Фенотипическая характеристика опухолевых клеток и их лимфоцитарного микроокружения у больных раком ободочной кишки в зависимости от уровня экспрессии CD326+CD133+ в опухоли и вне зависимости от стадии

Показатели, %	Низкий уровень	Высокий уровень
Лимфоцитарное микроокружение		
CD3+	69,3±3,8	63,0±3,2
CD3+CD4+	37,9±2,4	36,9±2,3
CD3+CD8+	30,9±2,4	26,8±2,5
T-reg	5,0±0,4	9,1±0,8 ↑*
NKT	5,5±0,6	4,7±0,6
CD56+	11,7±2,8	14,0±2,0
CD19+	19,1±1,2	18,2±0,7
CD4+/CD45RA-/CD45RO+	73,6±2,5	75,8±1,9
CD8+/CD45RA-/CD45RO+	72,7±2,6	65,3±2,1 ↓*
CD4+/CD45RA+/CD62-L+	10,8±1,3	10,4±1,0
CD8+/CD45RA+/CD62-L+	4,0±0,5	9,8±1,5 ↑*
CD56+CD335+	27,9±2,6	19,3±1,9 ↓*
CD274+	32,0±2,5	38,3±3,0
CD279+	37,8±3,4	35,5±3,0
Опухолевые клетки		
CD326+HLA-ABC	50,4±4,0	73,7±3,2 ↑*
CD326+HLA-E	18,9±1,3	26,0±1,5 ↑*
CD326+CD274+	9,2±1,0	10,5±1,1

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

Ряд различий также был выявлен в зависимости от уровня экспрессии опухолевыми клетками промиелина (CD326+CD133+). Результаты представлены в таблице 6.3, из которой видно, что в опухолях, отнесенных к высокому уровню, было статистически значимо больше T-regs, CD8+naïv и меньше CD8+m, CD335+ НК-клеток; среди опухолевых клеток было обнаружено больше клеток, экспрессирующих классические и неклассические МНС I класса. Всего различия в зависимости от уровня экспрессии CD326+CD133+ установлены по 6 маркерам, среди которых ни один не относится к системе PD-1/PD-L1.

Нами также была проведена градация в зависимости от отсутствия или наличия коэкспрессии маркеров ОСК на опухолевых клетках. Результаты представлены в таблице 6.4, из которой видно, что между двумя образовавшимися группами наблюдается 11 статистически значимых различий исследованных показателей опухолевых клеток и их лимфоцитарного микроокружения. Коэкспрессия маркеров ОСК сопровождалась более высокими значениями процента T-regs на фоне более низких уровней CD4+ клеток. При этом отмечено более высокое содержание общего количества Т-лимфоцитов за счет CD8+ с повышением Т-клеток памяти и снижением «наивных» Т-лимфоцитов внутри этой субпопуляции. Кроме того, при коэкспрессии маркеров ОСК обнаружено более низкое содержание PD-L1 на лимфоцитах и более высокое – на опухолевых клетках, тогда как уровень экспрессии PD-1 на лимфоцитах был более высоким. Среди опухолевых клеток с коэкспрессией маркеров ОСК выявлено статистически значимо больше положительных по PD-L1. В присутствии CD44+CD133+ ОСК наблюдалось также снижение процента опухолевых клеток, экспрессирующих классические молекулы МНС I класса, что характеризует угнетение процессов распознавания, а повышение при этом уровня CD8+, возможно, следует рассматривать как компенсаторное. Как видно из табл. 6.2, 6.3, 6.4, только коэкспрессия ОСК сопровождалась снижением экспрессии МНС на опухолевых клетках.

**Таблица 6.4** – Фенотипическая характеристика опухолевых клеток и их лимфоцитарного микроокружения у больных раком ободочной кишки в зависимости от уровня коэкспрессии CD326+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 ↓*
CD19+	19,4±1,0	20,4±1,2
CD4+/CD45RA-/CD45RO+	75,2±2,1	74,5±1,7
CD8+/CD45RA-/CD45RO+	55,8±3,8	71,7±4,2 ↑*
CD4+/CD45RA+/CD62-L+	10,0±1,3	10,7±1,1
CD8+/CD45RA+/CD62-L+	10,8±2,0	6,0±0,7 ↓*
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 CD326+CD44+CD133+ ( $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, как следует из представленных результатов, разделение по содержанию ОСК позволяет детализировать оценку лимфоцитарного микроокружения рака ободочной кишки, а также выявить особенности влияния на него ОСК с разным иммунофенотипом, которые, по-видимому, обладают разной активностью. В целом она представляется иммуносупрессивной, о чем свидетельствует нарастание локального содержания T-regs при более высоком уровне ОСК как CD44+, так и CD133+, а также коэкспрессирующих эти маркеры, хотя данная субпопуляция и является минорной. Об этом же говорит и снижение локального уровня CD335+ НК-клеток при более значительном присутствии ОСК, т.е., отмечается подавление факторов не только адаптивного, но и врожденного иммунитета. Отмеченная нами разнонаправленность уровней

«наивных» Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти, относящихся к субпопуляциям CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток при разном содержании ОСК, требует дальнейшего исследования, как и содержание опухолевых клеток, экспрессирующих МНС I, потенциально способных участвовать в презентации антигена для его распознавания цитотоксическими (CD8<sup>+</sup>) Т-лимфоцитами. Повышение экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках при высоком содержании ОСК с маркером CD44<sup>+</sup>, а также коэкспрессирующих CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, в отличие от одного CD133<sup>+</sup>, говорит о значимости для таких изменений именно присутствия CD44<sup>+</sup> ОСК. При этом возрастает и уровень экспрессии PD-1 на лимфоцитах, которые, взаимодействуя с PD-L1<sup>+</sup> опухолевыми клетками, могут усиливать иммуносупрессивные и ростостимулирующие свойства микроокружения опухоли, хотя те же характеристики дают основание для иммунотерапии ингибиторами контрольных точек системы PD-1/ PD-L1. Интересно, что такие особенности опухолевых клеток и лимфоцитов выявлены нами только при анализе ОСК с коэкспрессией CD44<sup>+</sup> и CD133<sup>+</sup>, но не при высоком содержании клеток, экспрессирующих каждый из этих маркеров по отдельности. В последнем случае, в частности, для CD44<sup>+</sup>, как и при коэкспрессии, отмечено уменьшение PD-L1 на лимфоцитах.

Несмотря на то, что разработка и применение ИКТ является приоритетным современным направлением терапии опухолевых заболеваний, данные литературы о прогностической значимости экспрессии маркеров системы PD-1/PD-L1 остаются противоречивыми. По данным ряда авторов экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках не показала взаимосвязи с общей выживаемостью больных, например, НМРЛ (He Y. et al., 2017) и МРЛ (Carvajal-Hausdorf D. et al., 2019), хотя другие исследователи расценивают экспрессию PD-L1 в качестве фактора благоприятного прогноза при НМРЛ ранних стадий (Cooper W.A. et al., 2015). Оценка экспрессии PD-L1 или PD-1 вместе с количеством лимфоцитов позволила выявить ассоциацию более высокой безрецидивной выживаемости больных МРЛ с положительной экспрессией этих маркеров на фоне

значительного уровня TILs, среди которых были не только CD3, CD4, CD8, но и FOXP3 (Sun C. et al., 2020).

Сходные данные были получены и при изучении плоскоклеточного рака ЛОР-органов, а именно, обнаружена связь с неблагоприятным прогнозом низкой экспрессии PD-L1, низкой плотности Foxp3+ и CD8/PD-L1+ среди TILs (Hongo T. et al., 2021).

В отношении КРП опубликованы противоречивые результаты различных авторов. Так, в одной из работ показано, что экспрессия PD-L1 обратно коррелирует с локальным уровнем Tregs (FOXP3), а также с высокой MSI и не связана ни с уровнями в микроокружении опухоли CD3+, CD8+ и CD45RO+ клеток, ни с прогнозом общей выживаемости (Masugi Y. et al., 2017). По данным других авторов, экспрессия CD274 (PD-L1) на опухолевых клетках демонстрирует сильную корреляцию с локальным уровнем CD8+ лимфоцитов, а высокий уровень обоих видов клеток ассоциирован с повышением общей и бессобытийной выживаемости у больных КРП II-III стадий (Huang C.Y. et al., 2018).

Значение экспрессии PD-L1 на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах также интенсивно исследуется в мире. Во многих работах указано, что количество TILs, экспрессирующих PD-L1, значительно выше, чем PD-L1+ опухолевых клеток, что не могло не привлечь внимание исследователей к их значению в плане влияния на опухолевый рост. Так, по данным, полученным Wang X. и соавт., PD-L1 экспрессирован на 8,5% опухолевых клеток ТНРМЖ, а на TILs этот маркер присутствует в 25,1 % случаев, экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках не была связана с исходом заболевания, тогда как экспрессия PD-L1 на TILs была связана с неблагоприятным исходом и рассматривалась как независимый фактор общей выживаемости (Wang X., Liu Y., 2020).

В литературе есть данные о взаимосвязи экспрессии PD-L1 и МНС-I на опухолевых клетках рака легкого и о возможности медикаментозного снятия иммунорезистентности через воздействие на этот механизм (Tu J. et al., 2022). Предположительно такая связь может характеризовать и наблюдаемых нами больных со средними и высоким уровнями экспрессии CD44+, в опухолях

которых происходит параллельное повышение экспрессии PD-L1 и HLA-ABC (MHC-I).

Следует также отметить, что экспрессия HLA-E у исследованных нами больных в большинстве случаев меняется однонаправленно с HLA-ABC. Как известно из литературы, неклассическая молекула HLA-E, экспрессированная во многих опухолях, подавляет литическую активность NK-клеток и инфильтрацию ими опухоли, формирует иммунорезистентность опухоли и связана с более короткой бессобытийной выживаемостью больных КРР (Levy E.M. et al., 2008), так что даже при повышении экспрессии HLA-ABC, наблюдаемой у наших больных при высоком содержании CD44+ и CD133+ клеток и, казалось бы, являющейся признаком активации процессов презентации антигена, повышение HLA-E указывает на возможность иммуносупрессии, что подтверждается снижением локального содержания NK-клеток или их субпопуляции CD335 при повышении процента Tregs.

Итак, нами выявлена взаимосвязь опухолевых клеток, экспрессирующих или коэкспрессирующих маркеры ОСК CD44+ и CD133+, с факторами иммунологического микроокружения опухоли, включая систему PD-1/PD-L1.

Количество PD-L1+ опухолевых клеток было ниже при отдаленном метастазировании, чем при его отсутствии, но выше – при наличии опухолевых клеток, коэкспрессирующих маркеры CD44+ и CD133+ или высокого количества CD44+ клеток. Возможно, CD44+ клетки способны вызывать экспрессию PD-L1 или формировать подходящие для этого условия микроокружения. Присутствие CD44+CD133+ опухолевых клеток также связано со снижением экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости. Что касается других изменений, характеризующих локальную иммуносупрессию (снижение уровня NK-клеток или их субпопуляции CD335, повышение процента Tregs), то они наблюдаются как при наличии коэкспрессии CD133+CD44+, так и при высоких уровнях клеток, отдельно экспрессирующих эти маркеры.



## **ГЛАВА 7. ПРОФИЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОРНК И ИХ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ В ОПУХОЛЯХ И В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ II-IV СТАДИЙ**

Колоректальный рак является гетерогенным многофакторным заболеванием, причем порядка 35% случаев обусловлено генетическими факторами, включая нестабильность генома, метилирование CpG-островков, мутации и полиморфизмы генов и изменения в экспрессии некодирующей РНК (нкРНК) (Tang X.J. et al., 2019). Около 50 генетических локусов, ассоциированных с данным заболеванием уже идентифицированы в рамках многочисленных исследований (Ding L. et al., 2018).

Преобразование слизистой оболочки толстой кишки в аденокарциному происходит в несколько этапов, занимающих десятилетия (Tang X.J. et al., 2019). Хотя многочисленные методы лечения, такие как хирургическое, химиотерапевтическое, лучевая терапия, таргетная терапия и иммунотерапия, показали способность уменьшать частоту рецидивов и улучшать выживаемость пациентов, 5-летняя выживаемость больных КРР все еще остается низкой (Siegel R.L. et al., 2019; Wang W. et al., 2019). Приблизительно у 60% пациентов с КРР диагностируются локальные или отдаленные метастазы. Эти факты подчеркивают необходимость поиска новых биомаркеров, которые могут быть использованы для ранней диагностики и прогнозирования течения этого заболевания. Большое количество исследований выявило, что нкРНК играют важную роль во многих биологических процессах, и нарушение их регуляции может привести к различным заболеваниям, включая рак толстой кишки (Weng M. et al., 2017). Хорошо изученными нкРНК являются микроРНК и длинные некодирующие РНК (lncRNA).

Изменение пула и уровня экспрессии коротких некодирующих микроРНК – отличительная особенность онкогенеза, используемая для перестройки трансляции мРНК в белок (Кит О.И. и соавт., 2017). МикроРНК вносят

значительный вклад в инициацию и развитие различных молекулярных событий, включая инициацию онкогенеза, прогрессирование и метастазирование опухолей, что делает микроРНК потенциальными биомаркерами для оценки прогрессирования и прогноза КРР (Abdelsattar Z.M. et al., 2016). Хотя микроРНК регулируют экспрессию генов, кодирующих белки, главным образом посредством деградации или сайленсинга мРНК, появляется все больше свидетельств того, что микроРНК могут взаимодействовать с lncRNA, что, в свою очередь, также обеспечивает регуляцию экспрессии генов-мишеней. Таким образом, изучение регуляторной сети микроРНК-длинные некодирующие РНК-мРНК имеет большое значение как для выяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе канцерогенеза, так и создания панели новых биомаркеров.

### **7.1. Отбор пула микроРНК, ассоциированного с раком ободочной кишки**

Ранее на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии» было выполнено исследование микроРНК-транскриптома при колоректальном раке методом множественного параллельного секвенирования; было выявлено 40 микроРНК, дифференцирующих образцы опухолевой и нормальной ткани толстой кишки (Тарасов В.А. и др., 2014). Необходимо отметить, что биоинформационная обработка первичных данных на тот момент была ограничена, что побудило нас проанализировать данные с учётом современных возможностей (Новикова И.А., Тимошкина Н.Н., Кутилин Д.С., 2020).

В целом доля различных типов РНК (средний показатель в %), определенная ранее, не отличалась значительно от настоящих подсчетов и распределилась следующим образом:

- преобладала группа транспортных РНК, составившая 88,5% в нормальной ткани и 84,9% в опухоли;
- микроРНК – соответственно 0,6% и 0,4%;
- мРНК – соответственно 0,02% и 0,03%;
- антисмысловая мРНК – по 0,01%;
- транскрипты неясного значения - по 0,03%;

– другие РНК – соответственно 10,8% и 14,6%.

С помощью алгоритма DEseq2 было выделено семь микроРНК, уровень относительной экспрессии которых в опухолевой ткани статистически значимо различался у больных с различной стадией злокачественного процесса (таблица 7.1).

**Таблица 7.1** – Относительная экспрессия микроРНК в опухолевой ткани больных раком ободочной кишки II-IV стадий

Стадия заболевания	микроРНК	FC	<i>p</i> -value	<i>P</i> <sub>adj</sub>
1	2	3	4	5
II стадия (T3-4N0M0)	hsa-let-7i-5p	1.001	0.82	0.84
	hsa-mir-942	1.008	0.75	0.81
	hsa-miR-10a-5p	1.002	0.99	0.99
	hsa-mir-128-1	1.153	0.70	0.72
	hsa-miR-10b-5p	0.940	0.87	0.96
	hsa-mir-133a-1	0.974	0.89	0.95
	hsa-mir-155	0.814	0.46	0.51
	hsa-mir-34a	0.635	0.09	0.12
	hsa-miR-126-5p	1.720	0.04	0.08
	hsa-mir-766	2.041	0.05	0.09
	hsa-mir-580	1.450	0.12	0.15
	hsa-mir-937	0.658	0.17	0.18
	hsa-miR-192-5p	1.409	0.41	0.47
	hsa-miR-143-3p	0.711	0.05	0.12
	hsa-miR-92a-3p	1.948	0.09	0.22
	hsa-miR-21-5p	1.776	0.75	0.79
	hsa-miR-25-3p	1.196	0.08	0.09
	<b>hsa-miR-26a-5p*</b>	<b>0.201</b>	<b>0.01</b>	<b>0.03</b>
	hsa-miR-27b-3p	0.744	0.55	0.69
	hsa-mir-589	0.896	0.69	0.78
hsa-miR-920	1.079	0.73	0.81	
III стадия (T1-4N1-2M0)	hsa-let-7i-5p	1.950	0.12	0.15
	hsa-mir-942	1.118	0.70	0.74
	hsa-miR-10a-5p	1.011	0.91	0.97
	hsa-mir-128-1	1.051	0.60	0.62
	hsa-miR-10b-5p	0.900	0.57	0.76
	hsa-mir-133a-1	0.900	0.80	0.90
	hsa-mir-155	0.711	0.26	0.47
	hsa-mir-34a	0.600	0.19	0.22
	hsa-miR-126-5p	1.920	0.06	0.11
	hsa-mir-766	1.502	0.06	0.09

1	2	3	4	5
III стадия (T1-4N1-2M0)	hsa-mir-580	1.220	0.10	0.12
	hsa-mir-937	0.908	0.10	0.25
	hsa-miR-192-5p	1.547	0.48	0.55
	<b>hsa-miR-143-3p*</b>	<b>0.501</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>
	<b>hsa-miR-92a-3p*</b>	<b>3.987</b>	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>
	<b>hsa-miR-21-5p*</b>	<b>2.979</b>	<b>0.00</b>	<b>0.02</b>
	<b>hsa-miR-25-3p*</b>	<b>2.096</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>
	<b>hsa-miR-26a-5p*</b>	<b>0.200</b>	<b>0.02</b>	<b>0.04</b>
	hsa-miR-27b-3p	0.944	0.95	0.99
	hsa-mir-589	1.204	0.39	0.45
	hsa-miR-920	0.540	0.12	0.17
IV стадия (T1-4N0-2M1a)	<b>hsa-let-7i-5p*</b>	<b>3.001</b>	<b>0.02</b>	<b>0.04</b>
	hsa-mir-942	1.611	0.50	0.54
	hsa-miR-10a-5p	1.211	0.51	0.77
	hsa-mir-128-1	0.774	0.21	0.32
	hsa-miR-10b-5p	0.990	0.50	0.66
	hsa-mir-133a-1	0.500	0.15	0.25
	hsa-mir-155	0.700	0.16	0.28
	hsa-mir-34a	0.441	0.07	0.10
	<b>hsa-miR-126-5p*</b>	<b>2.981</b>	<b>0.01</b>	<b>0.04</b>
	hsa-mir-766	1.000	0.88	0.90
	hsa-mir-580	1.110	0.70	0.72
	hsa-mir-937	1.301	0.11	0.24
	hsa-miR-192-5p	1.400	0.42	0.50
	<b>hsa-miR-143-3p*</b>	<b>0.211</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>
	<b>hsa-miR-92a-3p*</b>	<b>9.007</b>	<b>0.03</b>	<b>0.04</b>
	<b>hsa-miR-21-5p*</b>	<b>4.081</b>	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>
	<b>hsa-miR-25-3p*</b>	<b>4.901</b>	<b>0.02</b>	<b>0.04</b>
	<b>hsa-miR-26a-5p*</b>	<b>0.190</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>
	hsa-miR-27b-3p	0.678	0.15	0.28
	hsa-mir-589	1.800	0.17	0.25
hsa-miR-920	0.412	0.06	0.09	

Примечание. FC (fold change) – кратность изменения экспрессии микроРНК в опухолевой ткани относительно нормальной; P<sub>adj</sub> – скорректированное для множественного сравнения p-value с использованием метода Бенджамини-Хохберга.

Как видно из таблицы 7.1, в опухоли IV стадии гиперэкспрессия была характерна для пяти маркеров (hsa-let-7i-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-126a-5p), а для двух (hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-143-3p) выявлено снижение уровня. Следует отметить, что у всех больных, независимо от

наличия или отсутствия метастазов, наблюдалось снижение экспрессии hsa-miR-26a-5p. У больных III и IV стадий наблюдалась более значительная дисрегуляция экспрессии микроРНК, чем у больных II стадии.

Полученные нами результаты находят подтверждение и в работах других авторов. Так hsa-miR-143-3p является частью кластера, связанного с онкогенами, генами-репарации ДНК и генами, регулирующими сигнальные пути WNT и MAPK. В работе Tokarz P. и соавт. показано, что hsa-miR-143-3p в клетках КРР снижает экспрессию ДНК-метилтрансфераз 3A (DNMT3A) и изменяет фенотип злокачественной трансформации, а также hsa-miR-143-3p является негативным прогностическим фактором для выживаемости у пациентов с КРР (Tokarz P. et al., 2012). Кроме того, hsa-miR-143 таргетирует рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-IR), ингибируя чувствительность к оксалиплатину (Qian X. et al., 2013).

Экспрессия miR-143 подавляется при нескольких типах рака, включая КРР, соответственно подавляются и её противоопухолевые функции, обеспечивающие участие в регуляции различных клеточных процессов: пролиферации, инвазии, миграции (Meng W.J. et al., 2015). Michael и соавт. впервые идентифицировали связь между микроРНК и КРР, обнаружив снижение экспрессии miR-143 в тканях опухолей по сравнению с нормальными образцами слизистой оболочки (Michael M.Z. et al., 2003).

Hernández R. и соавторами показано, что гиперэкспрессия hsa-miR-21 приводит к возникновению опухоли, увеличивая инвазию и метастазирование (Hernández R. et al., 2018). Ранее Liu G.H. и соавт. (Liu G.H. et al., 2013), проанализировав концентрации miR-21 и miR-92a в сыворотке пациентов с КРР, обнаружили более высокие уровни этих микроРНК по сравнению со здоровыми субъектами.

hsa-miR-92a является членом кластера miR-17-92, расположенного в области хромосомы 13q13, и способствует пролиферации клеток, подавляет апоптоз опухолевых клеток, индуцирует ангиогенез и ускоряет прогрессирование опухоли (Mogilyansky E. et al., 2013). При КРР экспрессия hsa-miR-92a

значительно повышена в тканях, что приводит к снижению E-кадгерина и повышает уровень  $\beta$ -катенина и виментина, участвующих в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода (Zhang G. et al., 2014). Кроме того, Nishida N. и соавт. сообщили, о связи между высокими уровнями miR-92a и метастазами в лимфатические узлы и печень (Nishida N. et al., 2012). Вышеуказанные результаты свидетельствуют, что высокая экспрессия miR-92a у пациентов с КРР связана с плохой выживаемостью, и miR-92a может быть потенциальным биомаркером для КРР (Nishida N. et al., 2012).

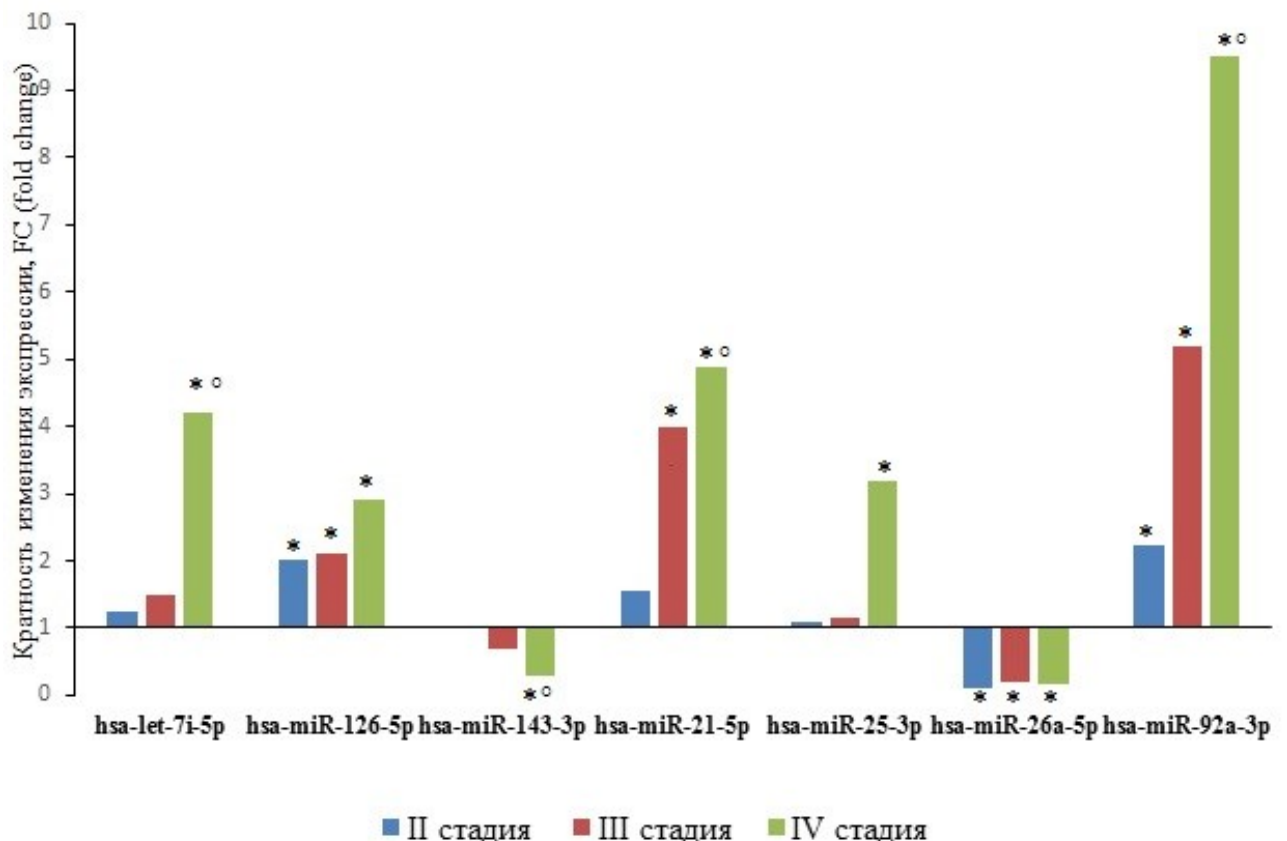
Семейство Lethal-7 (let-7) состоит из 12 членов (let-7a-1/2/3, -7b, -7c, -7d, -7e, -7f-1, / 2, -7g, -7i и miR-98), высоко консервативных у разных видов и воздействующих на онкогены, такие как RAS, c-Мyc, циклинзависимая киназа 6 (CDK6) (Takahashi M. et al., 2012). По данным литературы в опухолях толстой кишки, let-7 подавляет *KRAS*, и экспрессия let-7 связана с лучшими результатами выживания пациентов (Saridaki Z. et al., 2014); у hsa-let-7i-5p описана способность угнетать пролиферацию и метастазирование КРР (Song J. et al., 2018), в отличие от других видов рака – почек (Liu Y. et al., 2021) и предстательной железы, при которых отмечены ее проонкогенные свойства, в последнем случае опосредованные через макрофаги (Rong J. et al., 2020).

Таким образом, по нашим результатам, исследованные микроРНК, можно разделить на онкогенные и онкосупрессивные. Онкогенные микроРНК в основном нацелены на ингибирование экспрессии генов-супрессоров. Активация этих микроРНК оказывает значительное влияние на прогрессирование рака ободочной кишки, например, hsa-miR-21 и hsa-miR-92a). Однако ряд микроРНК (онкосупрессивные микроРНК) играет важную роль в замедлении прогрессирования опухоли посредством подавления онкогенов, связанных с пролиферацией, апоптозом, инвазией и миграцией, например, hsa-miR-143-3p и hsa-let-7i-5p, хотя по нашим данным последняя является проонкогенной, по крайней мере, ее экспрессия повышена в опухолях с наличием отдаленных метастазов.

Следует отметить, что высокопроизводительное NGS-секвенирование позволяет получать огромные массивы данных, валидация и анализ которых стали отдельной задачей научного сообщества. На следующем этапе нашего исследования мы определили уровень выделенного паттерна микроРНК на расширенной выборке пациентов раком ободочной кишки.

## 7.2. Профиль транскрипционной активности микроРНК в опухолевой ткани больных раком ободочной кишки

Методом ПЦР в реальном времени на расширенной выборке пациентов (II стадии (n=100), III стадии (n=60), IV стадии (n=40)) была оценена экспрессия 7 микро-РНК (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). Результаты проиллюстрированы на рисунке 7.1.



**Рисунок 7.1.** Экспрессия микроРНК в опухолевых тканях у больных раком ободочной кишки II-IV стадий (валидация результатов NGS)

\* - статистически значимое ( $p < 0,0005$ ) отличие от нормальной ткани,

o - статистически значимое ( $p < 0,005$ ) отличие от II стадии.

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.

Также 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 7.1).

В целом, профиль экспрессии, определенный методом ПЦР совпадает с данными NGS, за исключением следующего:

1. hsa-miR-126-5p гиперэкспрессирована у больных II-IV стадий, а не только у больных IV стадии
2. экспрессия hsa-miR-143-3p снижена только у больных IV стадии (по данным NGS и у больных III стадии)
3. hsa-miR-25-3p гиперэкспрессирована только у больных IV стадии
4. hsa-miR-92a-3p гиперэкспрессирована у всех больных, включенных в исследование, а не только в III и IV стадиях.

Следует отметить, что наибольшее отклонение экспрессии микроРНК от показателей нормальной ткани наблюдается в группе больных IV стадии.

Таким образом, валидация данных NGS-скрининга подтвердила изменение профиля экспрессии микроРНК, при этом отклонение от нормальных значений у шести из семи маркеров было ассоциировано со стадией злокачественного процесса (за исключением онкосупрессорной hsa-miR-26-5p, уровень которой понижался равномерно при всех стадиях рака ободочной кишки).



### 7.3. Профиль транскрипционной активности микроРНК в изолированных циркулирующих опухолевых клетках

Методом ПЦР в реальном времени в изолированных ЦОК провели определение экспрессии 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, hsa-miR-92a-3p), выявленных как статистически значимо дифференциально экспрессирующихся. В работу были взяты образцы с количеством более 3 ЦОК на образец для всех исследуемых стадий.

Результаты исследования уровня относительной экспрессии микроРНК в ЦОК пациентов представлены в таблице 7.2. Так как наличие ЦОК в крови характерно только для пациентов со злокачественной патологией, в таблице приведены значения относительной экспрессии микроРНК в ЦОК больных III и IV стадий относительно больных II стадией.

**Таблица 7.2** – Относительная экспрессии микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках у больных раком ободочной кишки

Группы пациентов	микроРНК	FC	p-value <sup>1</sup>	Padj <sup>1</sup>
III стадия (T1-4N1-2M0)	hsa-let-7i-5p	1,350	0,120	0,150
	hsa-miR-126-5p	1,920	0,060	0,110
	hsa-miR-143-3p	<b>0,401*</b>	0,020	0,035
	hsa-miR-21-5p	<b>3,178*</b>	0,000	0,040
	hsa-miR-25-3p	1,016	0,040	0,050
	hsa-miR-26a-5p	<b>0,200*</b>	0,025	0,030
	hsa-miR-92a-3p	<b>2,987*</b>	0,011	0,040
IV стадия (T1-4N0-2M1a)	hsa-let-7i-5p	2,004	0,040	0,055
	hsa-miR-126-5p	<b>2,585*</b>	0,030	0,045
	hsa-miR-143-3p	<b>0,217*</b>	0,020	0,030
	hsa-miR-21-5p	<b>4,581*</b>	0,010	0,040
	hsa-miR-25-3p	<b>2,600*</b>	0,040	0,045
	hsa-miR-26a-5p	<b>0,190*</b>	0,040	0,050
	hsa-miR-92a-3p	<b>5,003*</b>	0,010	0,035

\*- статистически значимые различия относительно больных II стадии ( $p^1 < 0,05$ )

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 ( $p < 0,05$ ) (таблица 7.2).

Сравнивая результаты экспрессии из различных типов биоматериала, отметим схожесть профиля 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 тоже время, исследуя ЦОК, мы можем по уровню экспрессии hsa-miR-26a-5p дифференцировать рак ободочной кишки с отсутствием и наличием отдаленных и регионарных метастазов, т.к. данный показатель имеет статистически значимые различия только в ЦОК, а в ткани опухоли является одинаково низким вне зависимости от стадии.

В литературе приводятся прямо противоположные данные о функции этой микроРНК при КРР и других опухолях: одни авторы считают ее индуктором аутофагии, химиорезистентности и рецидивирования КРР (Wang X. et al., 2019), другие – ингибитором агрессивности клеток КРР (Li Y. et al., 2017). Проонкогенные свойства miR-26a-5p описаны при остеосаркоме (Wang J. et al., 2020), напротив, свойства, ингибирующие рост и инвазию, показаны при раке желудка (Li Y. et al., 2020).

#### **7.4. Биоинформационный анализа участия паттерна микроРНК в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода и стволовомклеточного опухолевого потенциала**

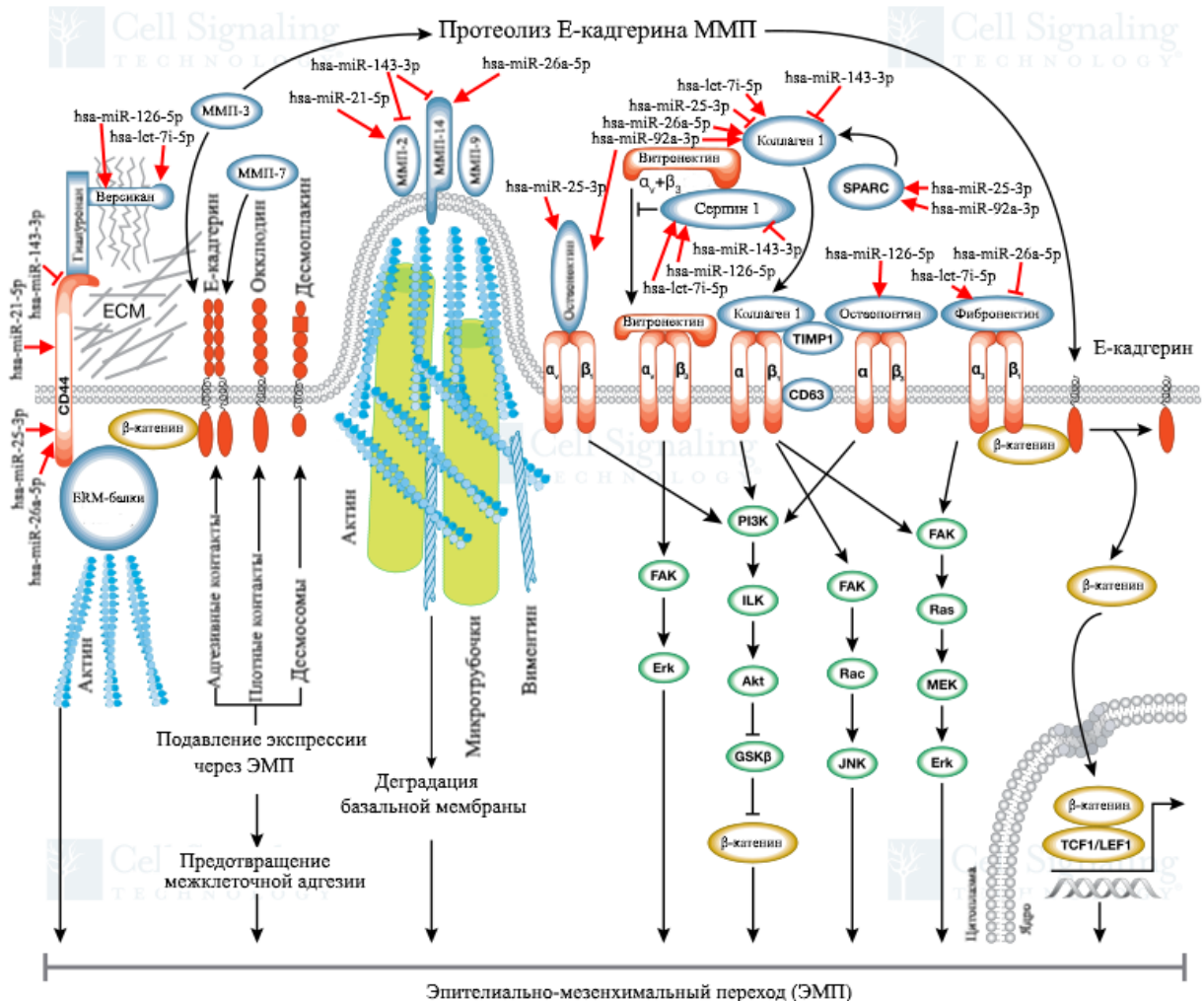
С помощью баз BioCarta и Gene Ontology был проведен анализ сигнальных путей, в регуляции которых опосредованно могут принимать участие обозначенные выше микроРНК. В результате установлена перекрестная ассоциация паттерна некодирующих РНК в сигналинге эпителиально-мезенхимального перехода и сигнальной сети опухолевых стволовых клеток (рисунки построены в BioCarta).

*Участие микроРНК в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП).* Одной из ключевых особенностей ЭМП является потеря целостности эпителия, которая возникает в результате деградации адгезивных контактов, осуществляемая за счет протеолитического расщепления матричными металлопротеиназами (ММП), экспрессия которых регулируется hsa-miR-21-5p, hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p. Известно, что hsa-miR-21-5p и hsa-miR-26a-5p положительно модулируют транскрипцию ММП-2 и ММП-14, соответственно, тогда как hsa-miR-143-3p ингибирует экспрессию ММП-14 (рисунок 7.2).

Согласно результатам исследования, уровень hsa-miR-21-5p в опухолевом материале повышался в группах больных с исходным метастазированием и в случаях с неблагоприятным прогнозом на фоне снижения уровня hsa-miR-143-3p. Наблюдаемые изменения могли послужить причиной интенсификации эпителиально-мезенхимального перехода и прогрессирования опухоли. Ранее сообщалось, что hsa-miR-21 способствовала миграции и инвазии опухолевых клеток за счет усиления экспрессии ММП-2 и ММП-9 при гепатоцеллюлярной карциноме (Zhu Q. et al., 2012). При этом hsa-miR-143 оказывает положительный эффект – подавляя транскрипцию ММП-2 и ММП-9, она препятствует миграции и инвазии опухолевых клеток, снижает вероятность метастазирования.

Процесс ЭМП сопровождается ремоделированием цитоскелета, которое частично обусловлено изменением экспрессии белков эзрина, радиксина и моэзина (ERM). Белки ERM взаимодействуют с CD44, известным маркером

метастазирования, который способен связываться с внеклеточными протеогликанами, версиканом и гиалуронатом, и обуславливать клеточную подвижность (рисунок 7.2).



**Рисунок 7.2.** Регуляция сигнальных механизмов, ассоциированных с индукцией ЭМП

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что 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 в группах больных с метастазированием и в случае неблагоприятного исхода приводит к повышению экспрессии версикана и CD44 и интенсификации ЭМП. Так, в работе Yan L. и сотрудников было показано, что повышение уровня hsa-miR-21-5p сопряжено со сверхэкспрессией CD44 в келоидных кератиноцитах, инвазией и миграцией клеток, опосредованной ЭМП (Yan L. et al., 2016). Позднее Irani S. и Shokri G. обнаружили, что

трансфекция hsa-miR-143 в клеточную культуру подавляет экспрессию CD44 и препятствует ангиогенезу и пролиферации опухолевых стволовых клеток плоскоклеточного рака полости рта (Irani S., Shokri G., 2019).

Другой механизм запуска ЭМП связан с белками внеклеточного матрикса коллагеном 1, витронектином и фибронектином, 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 7.2). Белки внеклеточного матрикса способны взаимодействовать с такими гликопротеинами как SPARC, которые запускают сигнальный каскад, индуцирующий ЭМП. Предполагается, что 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.

*Участие микроРНК в регуляции сигнальных путей опухолевых стволовых клеток*

Активность опухолевых стволовых клеток сопряжена со множеством биологических свойств, таких как самообновление, мультидифференцировка, экспрессия маркеров стволовости, устойчивость к лучевой и химиотерапии. Реализация данных свойств возможна прежде всего по причине изменений в сигнальных механизмах, среди которых ключевыми являются следующие: Wnt, NF-κB, Notch, Hedgehog, JAK-STAT, PI3K/AKT/mTOR, TGF/SMAD и PPAR. В ходе исследования обнаружено участие hsa-let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p и hsa-miR-26a-5p в регуляции сигнальных путей Wnt, Hedgehog и NF-κB.

*Сигнальный путь Wnt в опухолевых стволовых клетках*

Канонический путь Wnt/β-катенин регулирует плюрипотентность ОСК и определяет судьбу их дифференцировки. При отсутствии передачи сигналов по каноническому пути Wnt, β-катенин связывается с комплексом аксина, APC и GSK3β, затем фосфорилируется, что приводит к его убиквитинированию и

протеосомной деградации. Однако при активном сигнальном пути Wnt комплекс аксина с APC и GSK3 $\beta$  дезактивируется,  $\beta$ -катенин не фосфорилируется и проникает в ядро, где связывается с комплексом TCF/CBP/CtBP1/SMAD4/Groucho с последующим запуском транскрипции различных генов клеточного цикла. В ходе биоинформационного анализа выявлен ряд микроРНК, которые усиливают сигнальный путь Wnt, таргетируя гены GSK3 $\beta$ , APC и  $\beta$ -катенина (рисунок 7.3).

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. Так, в работе Kawakita A. и сотрудников было показано, что высокий уровень hsa-miR-21 в опухолевом материале способствовал инвазии опухолевых клеток, за счет активации сигнального пути Wnt, при раке полости рта (Kawakita A. et al., 2013). Другая микроРНК hsa-miR-92a-3p также может связываться с геном  $\beta$ -катенина и активировать сигнальный путь Wnt, способствуя развитию резистентности к тамоксифену опухолевых клеток при раке молочной железы, как сообщалось в недавнем исследовании Cun J. и Yang Q. (Cun J., Yang Q., 2018).

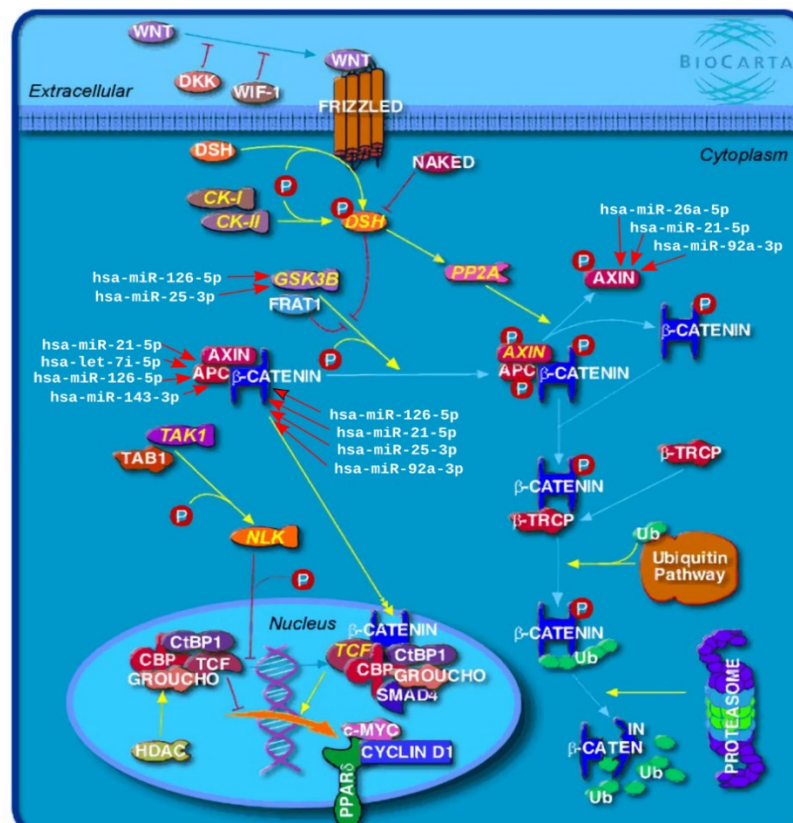


Рисунок 7.3. Регуляция сигнального пути Wnt в опухолевых стволовых клетках

### Сигнальный путь Hedgehog в опухолевых стволовых клетках

Сигнальный путь Hedgehog играет ключевую роль в поддержании жизнедеятельности, самообновлении и регенерации ОСК. Секретируемый белок Hh способен инициировать ряд клеточных ответов: выживание, пролиферацию и дифференцировку клеток. После получения сигнала рецептор трансмембранного белка PTCH активирует SMO, который заставляет Gli1/2 отделиться от SUFU и проникнуть в ядро для запуска транскрипции различных генов (*Bmi-1*, *Wnt2*, *ALDH1*, *CD44*, *CCND1*, *Twist1*, *C-MYC*, *Nanog*, *Oct4*, *PDGFR $\alpha$* ).

Нами установлено, что hsa-miR-126-5p положительно регулирует экспрессию PTCH, а hsa-miR-143-3p и hsa-let-7i-5p — Gli-2 (рисунок 7.4).

Предполагается, что высокий уровень данных микроРНК может через сигнальный путь Hedgehog усиливать жизнеспособность ОСК и повышать резистентность к терапии. Так, в недавнем исследовании, посвященном саркоидозу, было показано, что связь hsa-miR-126 с PTCH1 может быть ключевой в прогрессировании данного заболевания (Cao Y. et al., 2021).

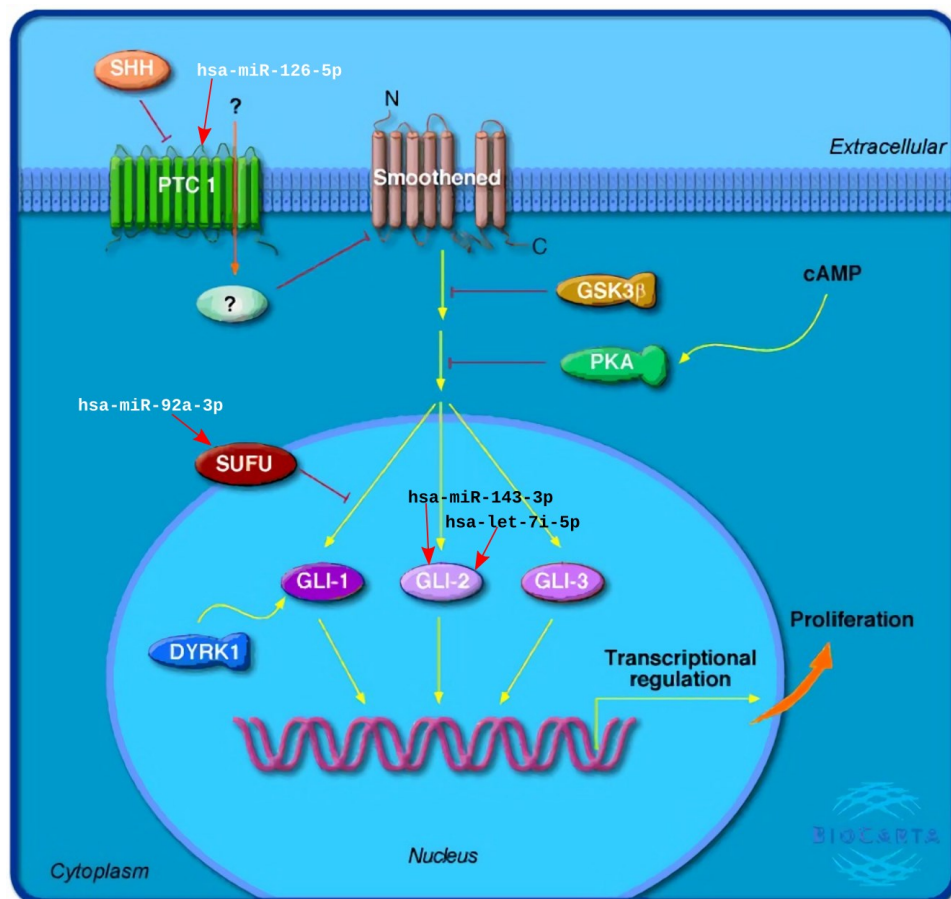


Рисунок 7.4. Регуляция сигнального пути Hedgehog в опухолевых стволовых клетках



### Сигнальный путь NF-κB в опухолевых стволовых клетках

Сигнальный путь NF-κB играет ключевую роль в воспалительных, стрессовых реакциях, росте и развитии ОСК. При получении сигнала рецептором димер p50-p65 подвергается посттрансляционной модификации (фосфорилирование, ацетилирование или гликозилирование) и переносится в ядро, где индуцирует экспрессию генов-мишеней при участии других транскрипционных факторов.

Результаты биоинформационного анализа свидетельствовали том, что hsa-miR-143-3p способен ингибировать экспрессию TNF, который необходим для связи с соответствующим рецептором и запуска сигнального каскада, тогда как hsa-miR-21-5p и hsa-miR-92a-3p положительно модулируют экспрессию субъединицы p50 (рисунок 7.5).

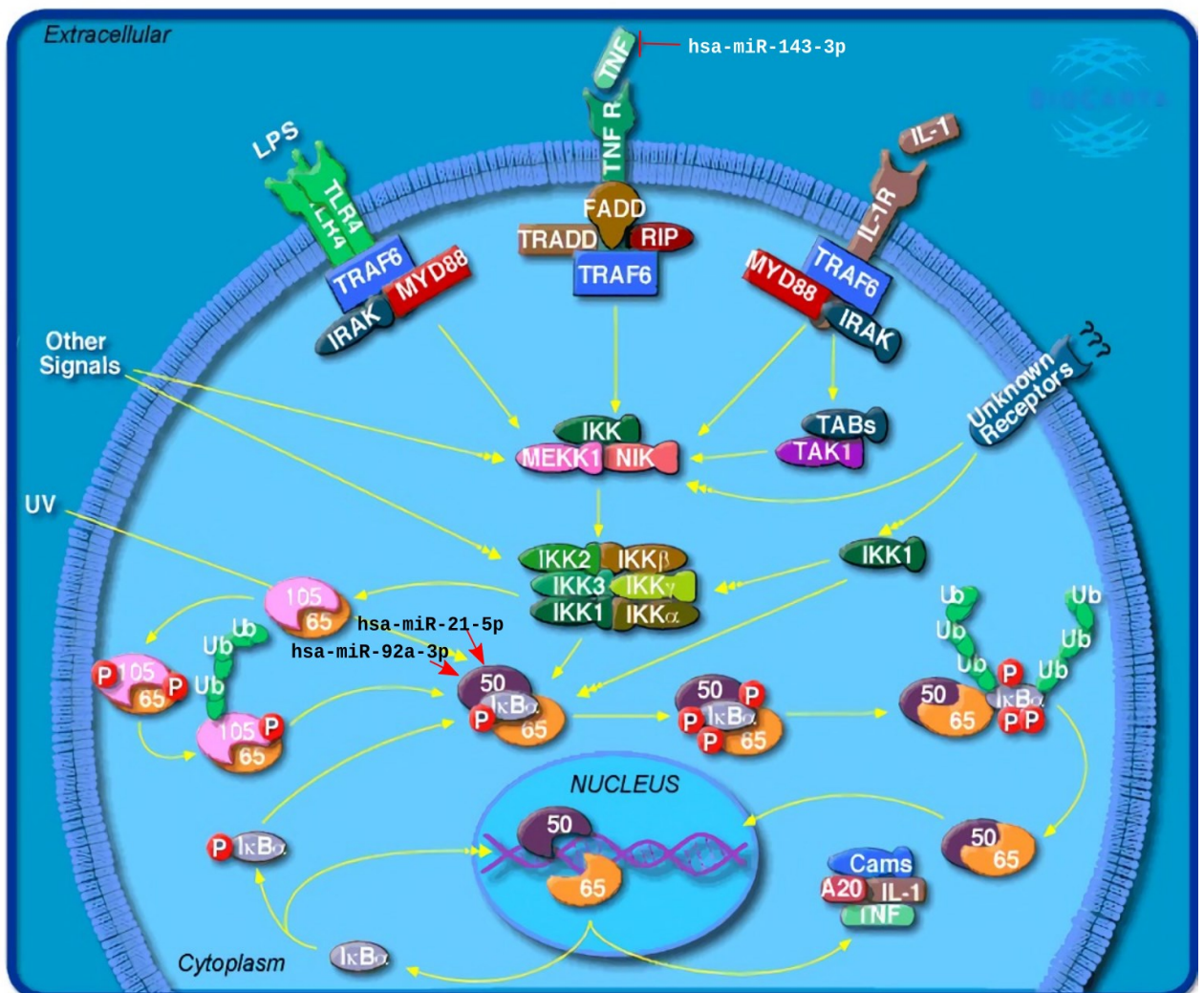


Рисунок 7.5. Регуляция сигнального пути NF-κB в опухолевых стволовых клетках



Учитывая снижение уровня hsa-miR-143-3p в группах с метастазированием и летальными случаями, 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. Так, Markopoulos G.S. и сотрудники сообщали, что высокий уровень hsa-miR-21 вызывает дисрегуляцию сигнального пути NF-κB, и, как следствие, индуцирует инвазию и приводит к химиорезистентности опухолевых клеток (Markopoulos G.S. et al., 2018).

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

### 7.5. Уровень относительной экспрессии 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 (таблица 7.3).

**Таблица 7.3** – Гены-мишени семи дифференциально экспрессирующихся микроРНК в опухолях ободочной кишки

Сигнальные пути	Гены-мишени	Хромосомная локализация гена	Таргетирующие микроРНК
1	2	3	4
ЭМП	<i>MMP-2</i>	16p12.2	hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p
	<i>MMP-14</i>	14q11.2	hsa-miR-143-3p, hsa-miR-26a-5p
	<i>CD44</i>	11p13	hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p
	<i>VCAN</i>	5q14.2-q14.3	hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p

1	2	3	4
ЭМП	<i>SPP1</i>	4q22.1	hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p
	<i>FNI</i>	2q35	hsa-let-7i-5p, hsa-miR-26-5p
	<i>COL1A2</i>	7q21.3	hsa-let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p и hsa-miR-92a-3p
	<i>SPARC</i>	5q33.1	hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p
Wnt	<i>AXIN</i>	16p13.3	hsa-miR-21-5p, hsa-miR-26a-5p и hsa-miR-92a-3p
	<i>GSK3B</i>	3q13.33	hsa-miR-126-5p, hsa-miR-25-3p
	<i>CTNNB1</i>	3p22.1	hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p
	<i>APC</i>	5p22.2	hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p
Hedgehog	<i>SUFU</i>	10q24.32	hsa-miR-92a-3p
	<i>PTCH1</i>	9q22.32	hsa-miR-126-5p
	<i>GLI-2</i>	2q14.2	hsa-let-7i-5p, hsa-miR-143-3p
	<i>OCT4</i>	6p21.33	-
	<i>BMI-1</i>	10p12.2	-
	<i>ALDH1</i>	9q21.13	-
	<i>NANOG</i>	12p13.31	-
	<i>CCND1</i>	11q13.3	-
	<i>C-MYC</i>	8q24.21	-
	<i>TWIST1</i>	7p21.1	-
<i>PDGFRA</i>	4q12	-	
NF-kB	<i>TNF</i>	6p21.33	hsa-miR-143-3p
	<i>NFKB1</i>	4p24	hsa-miR-21-5p, hsa-miR-92a-3p

Используя метод ПЦР в реальном времени на расширенной выборке пациентов была оценена экспрессия 25-ти генов-мишеней (*MMP2*, *MMP14*, *CD44*, *VCAN*, *SPP1*, *FNI*, *COL1A2*, *SPARC*, *AXIN*, *GSK3B*, *CTNNB1*, *APC*, *SUFU*, *PTCH1*, *GLI2*, *BMI1*, *ALDH1*, *NANOG*, *CCND1*, *MYC*, *TWIST1*, *OCT4*, *PDGFRA*, *TNF*, *NFKB1*). Полученные результаты проиллюстрированы в таблицах 7.4 – 7.7 и на рисунке 7.6. В таблице 7.4 приведены медианы экспрессии исследованных генов относительно постоянно экспрессируемого референс-гена.

**Таблица 7.4** – Медианы относительной экспрессии 25 генов-мишеней в группах больных с разной распространенностью рака ободочной кишки

Гены-мишени	II стадия		III стадия		IV стадия	
	опухоль	норма	опухоль	норма	опухоль	норма
<i>MMP2</i>	0,059060	0,012039	0,072180	0,012039	0,097449	0,012039
<i>MMP14</i>	0,000200	0,000237	0,000234	0,000237	0,000242	0,000237
<i>CD44</i>	0,076778	0,014767	0,080119	0,014767	0,139352	0,014767
<i>VCAN</i>	0,012039	0,011942	0,012039	0,011942	0,012039	0,012700
<i>SPP1</i>	0,013446	0,012039	0,013446	0,012039	0,014446	0,012039
<i>FNI</i>	0,000218	0,000237	0,000256	0,000237	0,000264	0,000237
<i>COL1A2</i>	0,012954	0,012039	0,014446	0,012453	0,014632	0,012000
<i>SPARC</i>	0,016840	0,009088	0,019644	0,009339	0,022551	0,009046
<i>AXIN</i>	0,001220	0,001356	0,001431	0,001356	0,001373	0,001356
<i>GSK3B</i>	0,026931	0,033401	0,028418	0,033401	0,006797	0,033401
<i>CTNNB1</i>	0,199891	0,176316	0,246800	0,176316	0,294661	0,176316
<i>APC</i>	0,051441	0,066325	0,021632	0,019640	0,050956	0,066325
<i>SMO</i>	0,077776	0,067092	0,090224	0,067092	0,107194	0,069396
<i>PTCH1</i>	0,037036	0,033046	0,040989	0,033046	0,048594	0,033348
<i>GLI2</i>	0,031481	0,032681	0,043038	0,035689	0,041305	0,034894
<i>BMI1</i>	0,103830	0,089568	0,120450	0,089568	0,128633	0,092643
<i>ALDH1</i>	0,026366	0,027689	0,034752	0,027689	0,036339	0,027942
<i>NANOG</i>	0,001167	0,001041	0,001353	0,001041	0,001608	0,001050
<i>CCND1</i>	0,049107	0,054570	0,051312	0,054570	0,066331	0,057029
<i>MYC</i>	0,153996	0,114503	0,162404	0,090909	0,279021	0,115551
<i>TWIST1</i>	0,000529	0,000537	0,000639	0,000537	0,000608	0,000555
<i>OCT4</i>	0,009066	0,007037	0,009473	0,007037	0,012246	0,007846
<i>PDGFRA</i>	0,105300	0,112350	0,115717	0,112350	0,140424	0,117451
<i>TNF</i>	0,241104	0,241533	0,296360	0,241533	0,294643	0,252032
<i>NFKB1</i>	0,000521	0,000224	0,001507	0,000772	0,000718	0,000247

После обработки данных, представленных в таблице 7.4, по Манну-Уитни мы получили ряд статистически значимых различий экспрессии генов-мишеней относительно условно здоровой ткани, которые приведены в таблице 7.5. При этом обнаружено статистически значимое изменение транскрипционной активности 14-ти генов-мишеней из 25 исследованных (таблица 7.5, рисунок 7.6): 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 7.5** – Дифференциальная экспрессия генов-мишеней в опухолях больных с разной распространенностью рака ободочной кишки относительно условно здоровой ткани (U-тест)

Гены-мишени	II стадия		III стадия		IV стадия	
	Z	p	Z	p	Z	p
<i>MMP2</i>	<b>4,90959</b>	<b>0,00000</b>	<b>4,34154</b>	<b>0,00001</b>	<b>5,39649</b>	<b>0,00000</b>
<i>MMP14</i>	-1,50128	0,13328	0,60863	0,54277	1,82588	0,06787
<i>CD44</i>	<b>4,69319</b>	<b>0,00000</b>	<b>4,12514</b>	<b>0,00004</b>	<b>5,26124</b>	<b>0,00000</b>
<i>VCAN</i>	0,47342	0,63591	0,47342	0,63591	-1,12274	0,26155
<i>SPPI</i>	<b>3,47594</b>	<b>0,00051</b>	<b>3,47594</b>	<b>0,00051</b>	<b>5,26124</b>	<b>0,00000</b>
<i>FNI</i>	-0,52748	0,59786	1,47423	0,14042	<b>2,96198</b>	<b>0,00306</b>
<i>COL1A2</i>	1,74473	0,08103	<b>2,96198</b>	<b>0,00306</b>	<b>3,31395</b>	<b>0,00092</b>
<i>SPARC</i>	<b>5,39649</b>	<b>0,00000</b>	<b>4,99074</b>	<b>0,00000</b>	<b>5,39700</b>	<b>0,00000</b>
<i>AXIN</i>	-0,71683	0,47348	1,36603	0,17193	1,63653	0,10173
<i>GSK3B</i>	<b>-2,85378</b>	<b>0,00432</b>	-1,25783	0,20845	<b>-3,71939</b>	<b>0,00020</b>
<i>CTNNB1</i>	0,75744	0,44879	1,35257	0,17619	<b>3,89540</b>	<b>0,00010</b>
<i>APC</i>	<b>-2,61033</b>	<b>0,00905</b>	-1,04143	0,29768	<b>-2,33983</b>	<b>0,01929</b>
<i>SUFU</i>	1,20373	0,22870	1,04143	0,29768	<b>2,71853</b>	<b>0,00656</b>
<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	<b>2,42098</b>	<b>0,01548</b>
<i>CCND1</i>	-1,06848	0,28531	0,09468	0,92457	0,82503	0,40936
<i>MYC</i>	<b>2,74558</b>	<b>0,00604</b>	<b>2,69148</b>	<b>0,00711</b>	<b>3,77349</b>	<b>0,00016</b>
<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	<b>2,52918</b>	<b>0,01143</b>
<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>	<b>4,04399</b>	<b>0,00005</b>	<b>3,31364</b>	<b>0,00092</b>	<b>3,93579</b>	<b>0,00008</b>

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

Как видно из рисунка 7.6, профиль генной экспрессии в опухоли у пациентов с разными стадиями злокачественного процесса отличался следующим:

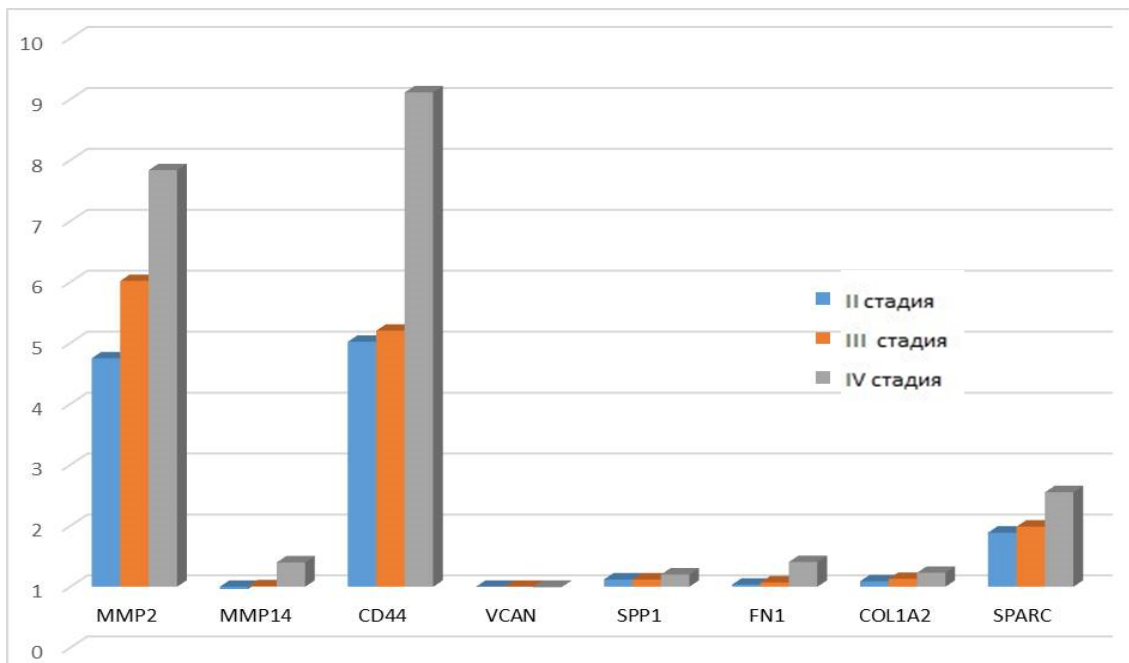
– при всех трёх исследованных стадиях отмечены статистически значимые изменения для шести генов *MMP2*, *CD44*, *SPPI*, *SPARC*, *MYC*, *NFKB1*;

– 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.

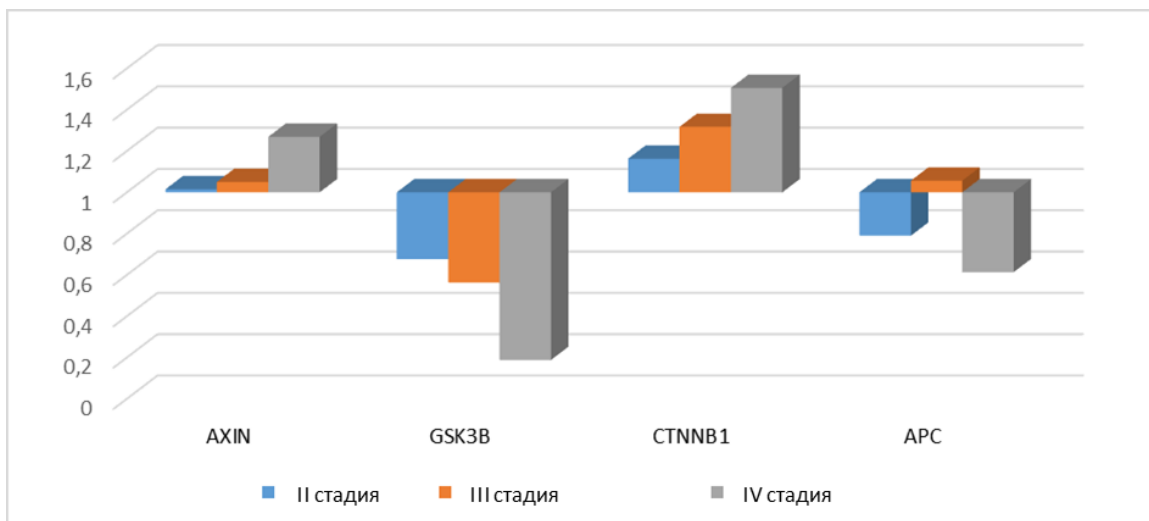
В то же время экспрессия гена *GSK3B* снизилась во II и III стадии в 1,2 раз, в IV - в 4,9 раза;

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

**А**

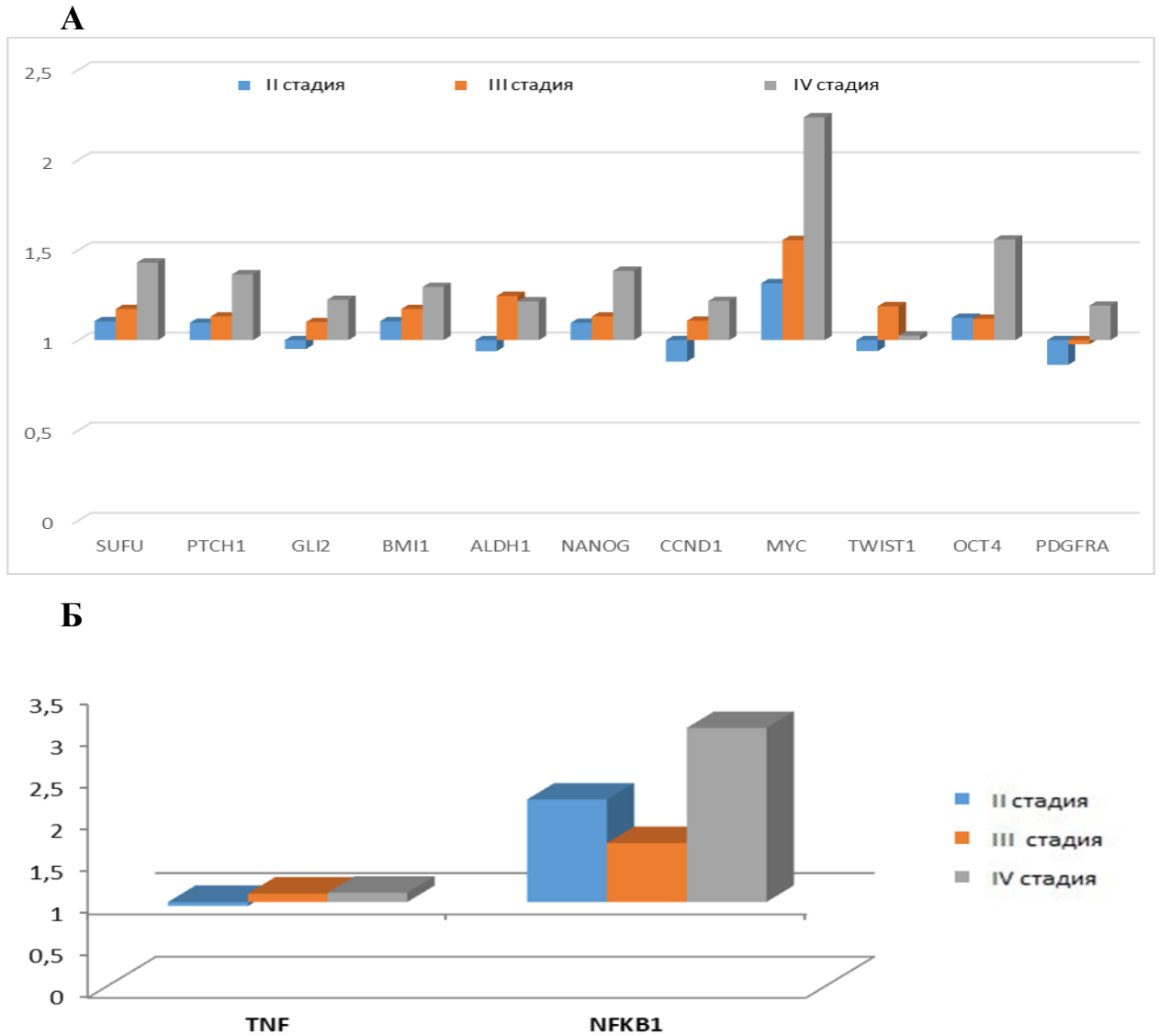


**Б**



**Рисунок 7.6.** Профиль генной экспрессии в опухолевой ткани больных раком ободочной кишки разных стадий (приведены значения соотношения экспрессии в опухоли к условно нормальной ткани): А – гены-мишени ЭМП-сигналинга; Б – гены-мишени Wnt-сигналинга

Профиль генной экспрессии генов-мишеней Hedgehog-сигналинга и генов-мишеней NF-kB-сигналинга в опухоли больных раком ободочной кишки разных стадий представлены на рисунке 7.7.



**Рисунок 7.7.** Профиль генной экспрессии в опухолевой ткани больных раком ободочной кишки разных стадий (приведены значения соотношения экспрессии в опухоли к условно нормальной ткани): А – гены-мишени Hedgehog-сигналинга; Б – гены-мишени NF-kB-сигналинга

Итак, генерализация опухолевого процесса опосредуется через усиление стволовых свойств опухолевых клеток и разрушение внеклеточного матрикса, чему способствует повышение экспрессии генов-мишеней ЭМП-сигналинга (*MMP2*, *CD44*, *SPP1*, *FNI*, *COL1A2*, *SPARC*). Происходит повышение экспрессии исследованных генов-мишеней Hedgehog- сигнального пути (*SUFU*, *NANOG*, *MYC*, *OCT4*) и NF-kB-сигнального пути (*NFKB1*), тогда как среди генов-мишеней

Wnt-сигнального пути отмечено нарастание экспрессии *CTNNB1* при снижении *GSK3B* и *APC*.

Сравнение уровней экспрессии исследованных генов в разных группах больных раком ободочной кишки показало различия между II и III стадиями по трем генам *COL1A2*, *APC*, *NFKB1*. Статистически значимые различия отмечены между III и IV стадиями по экспрессии четырех генов *MYC*, *GSK3B*, *APC*, *NFKB1*. Наибольшие различия в профилях экспрессии обнаружены, ожидаемо, между больными II и IV стадиями – по 15 из 25-ти генов (таблица 7.6).

**Таблица 7.6** – Сравнение экспрессии генов-мишеней в опухолях больных с разной распространенностью рака ободочной кишки(U-тест)

Гены-мишени	Стадия заболевания					
	II стадия / III стадия		III стадия / IV стадия		II стадия / IV стадия	
	Z	p	Z	p	Z	p
<i>MMP2</i>	-1,10921	0,26483	-0,85208	0,39417	<b>-3,15134</b>	<b>0,00163</b>
<i>MMP14</i>	-1,66421	0,09650	-0,86589	0,38655	-1,19002	0,05015
<i>CD44</i>	-0,47338	0,63951	-1,96113	0,05408	<b>-3,58414</b>	<b>0,00034</b>
<i>VCAN</i>	0,01354	1,00000	0,01354	0,98920	0,01354	0,98920
<i>SPP1</i>	0,01354	1,00000	-1,01109	0,07124	<b>-2,24526</b>	<b>0,02475</b>
<i>FNI</i>	-1,82657	0,06750	-0,92001	0,35757	<b>-3,35531</b>	<b>0,00079</b>
<i>COL1A2</i>	<b>-2,69148</b>	<b>0,00614</b>	0,50043	0,61678	<b>-2,15089</b>	<b>0,03149</b>
<i>SPARC</i>	-1,47423	0,14171	-1,50128	0,13328	<b>-2,20458</b>	<b>0,02748</b>
<i>AXIN</i>	-1,82657	0,06750	-0,01353	0,98921	0,01353	0,98921
<i>GSK3B</i>	-0,22993	0,82015	<b>2,17753</b>	<b>0,02944</b>	<b>2,31278</b>	<b>0,02074</b>
<i>CTNNB1</i>	-0,41943	0,67831	-1,61008	0,10738	<b>-2,58425</b>	<b>0,00976</b>
<i>APC</i>	<b>4,20629</b>	<b>0,00001</b>	<b>-4,12514</b>	<b>0,00004</b>	<b>-2,52918</b>	<b>0,01143</b>
<i>SUFU</i>	-0,66291	0,51166	-0,58158	0,56085	<b>-2,20458</b>	<b>0,02748</b>
<i>PTCHI</i>	-0,67647	0,49452	-0,45987	0,64561	0,01365	0,89199
<i>GLI2</i>	-1,77178	0,07627	0,52748	0,59786	-1,24526	0,06475
<i>BMI1</i>	-0,66291	0,51166	-0,22993	0,81815	-1,63653	0,10173
<i>ALDH1</i>	-1,93408	0,05240	0,41928	0,67501	-1,20458	0,06484
<i>NANOG</i>	-0,66291	0,51166	-0,58158	0,56085	<b>-2,20458</b>	<b>0,02748</b>
<i>CCND1</i>	-0,54118	0,58311	-0,45987	0,64561	-0,49873	0,66076
<i>MYC</i>	-0,06763	0,94670	<b>-2,28573</b>	<b>0,02227</b>	<b>-3,17839</b>	<b>0,00148</b>
<i>TWIST1</i>	-1,51488	0,12742	1,05500	0,29142	-0,97385	0,33013
<i>OCT4</i>	-0,54118	0,58311	-0,32462	0,74547	<b>-2,36710</b>	<b>0,01793</b>
<i>PDGFRA</i>	-0,48706	0,62047	-1,12268	0,26157	<b>-1,97475</b>	<b>0,04830</b>
<i>TNF</i>	-1,31193	0,19175	0,41928	0,67501	-1,23078	0,21841
<i>NFKB1</i>	<b>-4,23334</b>	<b>0,00000</b>	<b>3,61119</b>	<b>0,00030</b>	<b>-4,17963</b>	<b>0,00003</b>

Примечание: выделены показатели статистически значимо различающиеся между собой (p<0,05)

Сравнение дифференциальной экспрессии микро-РНК и ассоциированных генов-мишеней, представленное в таблице 7.7, демонстрирует согласованное изменение транскрипционной активности, подтверждающее реализацию эпигенетического контроля посредством микроРНК в злокачественно трансформированной клетке.

**Таблица 7.7** – Сопоставление экспрессии микроРНК и их генов-мишеней и сигнальных путей в опухолях больных

Сигнальные пути	Целевой ген	Изменение экспрессии целевого гена	Таргетирующие микроРНК	Значение коэффициента корреляции $r$ ( $p$ )
ЭМП	<i>MMP-2</i>	Повышение в 6,2 раза	hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p	-0,384 (<0,05) 0,255 (>0,05)
	<i>CD44</i>	Повышение в 6,4 раз	hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p	-0,560 (<0,01) 0,671 (<0,05) 0,112 (>0,05) н/д*
	<i>FNI</i>	Повышение в 1,3 раз	hsa-let-7i-5p, hsa-miR-26-5p	0,020 (>0,05) н/д*
	<i>COL1A2</i>	Повышение только в группе с отдаленными метастазами	hsa-let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p и hsa-miR-92a-3p	0,193 (>0,05) 0,242 (>0,05) 0,098 (>0,05) н/д* н/д*
Wnt	<i>SPARC</i>	Повышение в 2,1 раз	hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p	0,098 (>0,05) н/д*
	<i>GSK3B</i>	Снижение в 2,9 раз	hsa-miR-126-5p, hsa-miR-25-3p	-0,701 (<0,01) -0,413 (<0,05)
	<i>CTNNB1</i>	Повышение в 1,3 раз	hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p	0,455 (<0,05) 0,408 (<0,05) 0,391 (<0,05) н/д*
	<i>APC</i>	Снижение в 1,6 раз	hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p	-0,613 (<0,01) -0,311 (<0,05) 0,242 (>0,05) -0,408 (<0,05)
Hedgehog	<i>SUFU</i>	Повышение в 1,2 раз	hsa-miR-92a-3p	н/д*
NFKB1	<i>NFKB1</i>	Повышение в 2,3 раз	hsa-miR-21-5p, hsa-miR-92a-3p	0,753 (<0,01) н/д*

Примечание: \* - нет данных для сравнения.

Итак, 25 генов, выделенных в результате биоинформационного анализа сигнальной трансдукции, в контроле которой принимают участие 7 микроРНК, были валидированы на выборке больных раком ободочной кишки различных



стадий. Для оценки ассоциаций с выживаемостью пациентов были отобраны 14 генов с статистически значимой дифференциальной экспрессией в опухолях.

Таким образом, результаты проведенного биоинформационного анализа демонстрируют, что обнаруженные нами различия уровней исследованных микроРНК отражают активацию ключевых для ОСК сигнальных путей, реализующуюся в дифференцировке, поддержании жизнедеятельности, самообновлении и регенерации ОСК.

При большей распространенности опухоли наблюдается увеличение экспрессии микроРНК, связанных с активацией этих сигнальных механизмов и снижение экспрессии микроРНК, ингибирующих их. При нарастании распространенности рака ободочной кишки от II к IV стадиям происходит увеличение количества микроРНК с измененной экспрессией по сравнению с нормальной тканью; при этом, по-видимому, происходит включение различных сигнальных путей и задействованных в них генов, что является молекулярной основой метастазирования. Рак ободочной кишки III стадии характеризуется активацией Wnt сигнального пути, участвующего в ЭМП; при генерализованном процессе, кроме него, наблюдается активация путей NF-κB и Hedgehog.

## ГЛАВА 8. ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК, СИСТЕМНЫХ И ЛОКАЛЬНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ

### 8.1. Общая выживаемость и выживаемость, свободная от метастазирования, у больных раком ободочной кишки с учетом исходного клинического статуса пациентов

Была изучена функция выживаемости больных раком ободочной кишки. Максимальный срок наблюдения за пациентами составил 90 мес. (7,5 лет). После операции у 138 пациентов развился летальный исход, у 51 пациента метастазы в лимфатические узлы (n=12) и печень (n=39).

Кривая кумулятивной общей выживаемости больных по Каплану-Мейеру иллюстрирована на рисунке 8.1. За период 48 мес. после операции снижение общей выживаемости происходило от 100% до 53%, медиана дожития достигнута не была. Верхний квартиль (75%) выживаемости был достигнут через 21,4 мес. после операции.

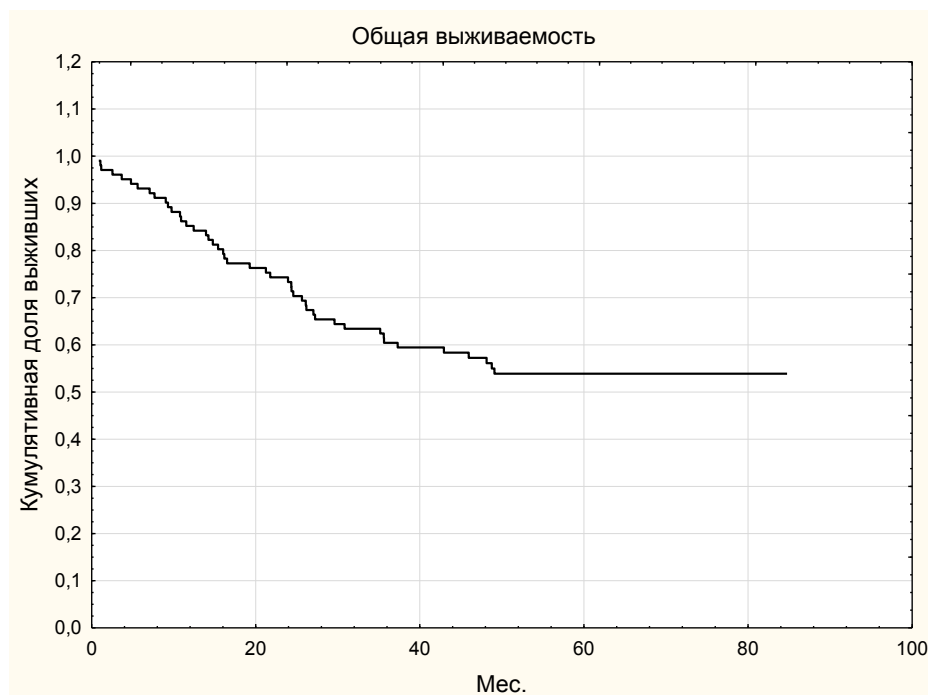
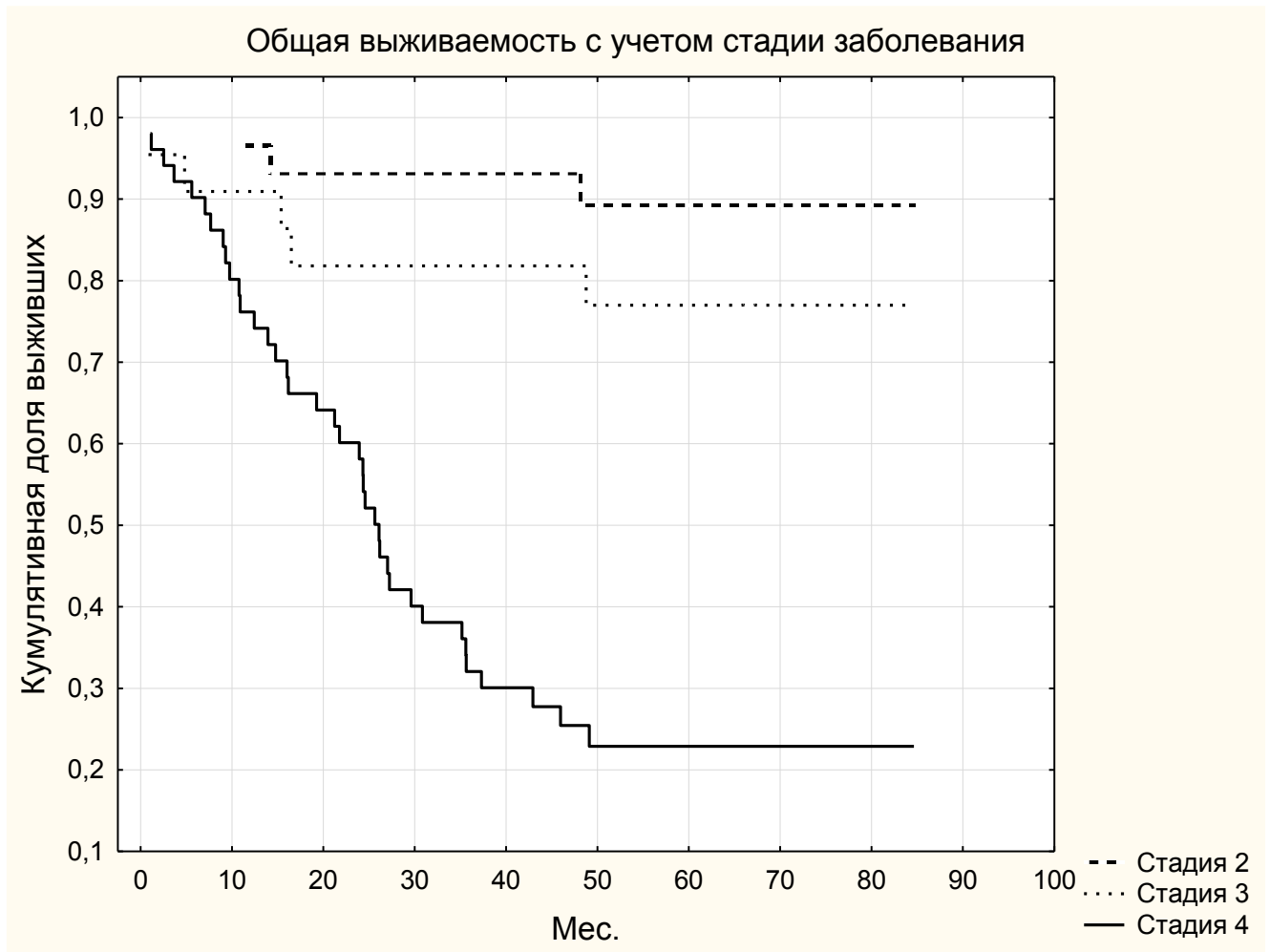


Рисунок 8.1. Кривая кумулятивной общей выживаемости больных раком ободочной кишки

Общая выживаемость больных зависела от стадии заболевания: пятилетняя кумулятивная доля выживших составила среди пациентов со стадией II – 89,5%, стадией III – 78,2% и стадией IV – 23,3% (рисунок 8.2).



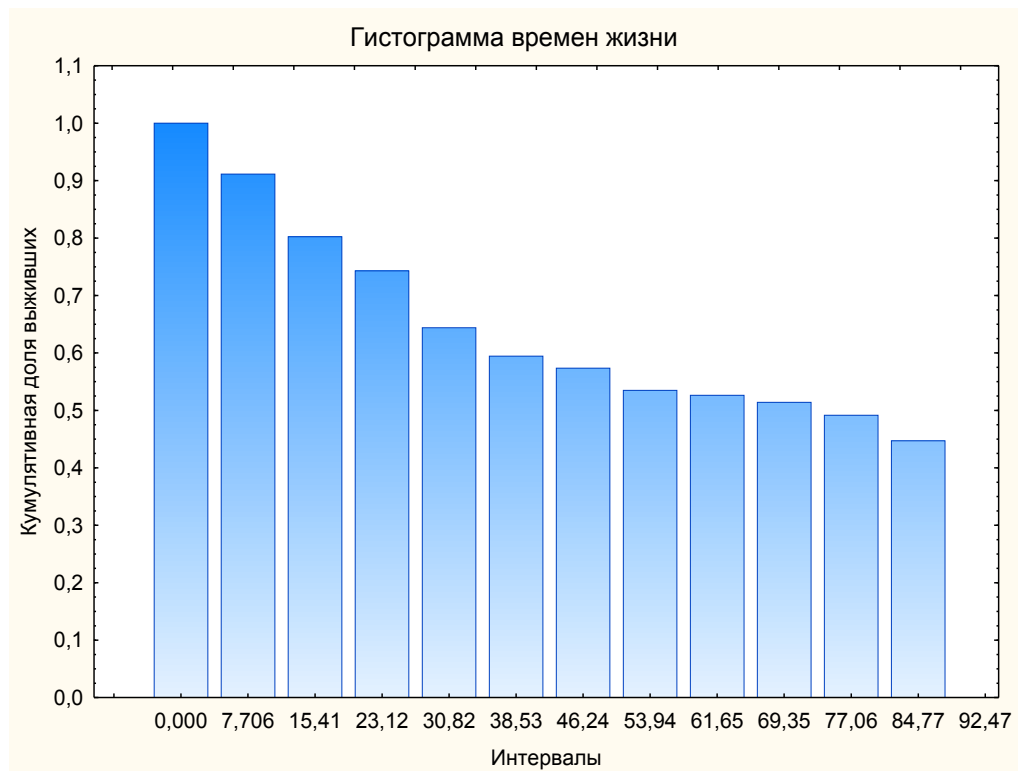
**Рисунок 8.2.** Динамика общей выживаемости больных раком ободочной кишки с учетом стадии заболевания

С помощью метода построения таблиц времен жизни период наблюдения был разбит на 12 интервалов, каждый продолжительностью 7,7 мес. (таблица 8.1). Число умерших было максимальным в 1-2 и 4 интервалы, что привело к основному снижению кумулятивной доли выживших с  $1,0 \pm 0,001$  до  $0,74 \pm 0,04$ . В последующие интервалы времени снижение общей выживаемости больных клинической группы замедлялось и составило на заключительном этапе 0,45 (рисунок 8.3).

**Таблица 8.1** – Таблица времен жизни больных раком ободочной кишки

N	Интервал	Число умерших	Кум. доля выживших	Станд. ош. кум. доли	Медиана дожития	Ст. ош. медианы
1	0,0	27	1,00	0,00	74,22	17,11
2	7,7	33	0,91	0,03	75,57	8,19
3	15,4	18	0,80	0,04	69,35	0,00
4	23,1	30	0,74	0,04	61,65	0,00
5	30,8	15	0,64	0,05	53,94	0,00
6	38,5	6	0,59	0,05	46,24	0,00
7	46,2	9	0,57	0,05	38,53	0,00
8	53,9	0	0,53	0,05	30,82	0,00
9	61,6	0	0,53	0,05	23,12	0,00
10	69,4	0	0,51	0,05	15,41	0,00
11	77,1	0	0,49	0,06	7,71	0,00
12	84,8	0	0,45	0,08	-	-

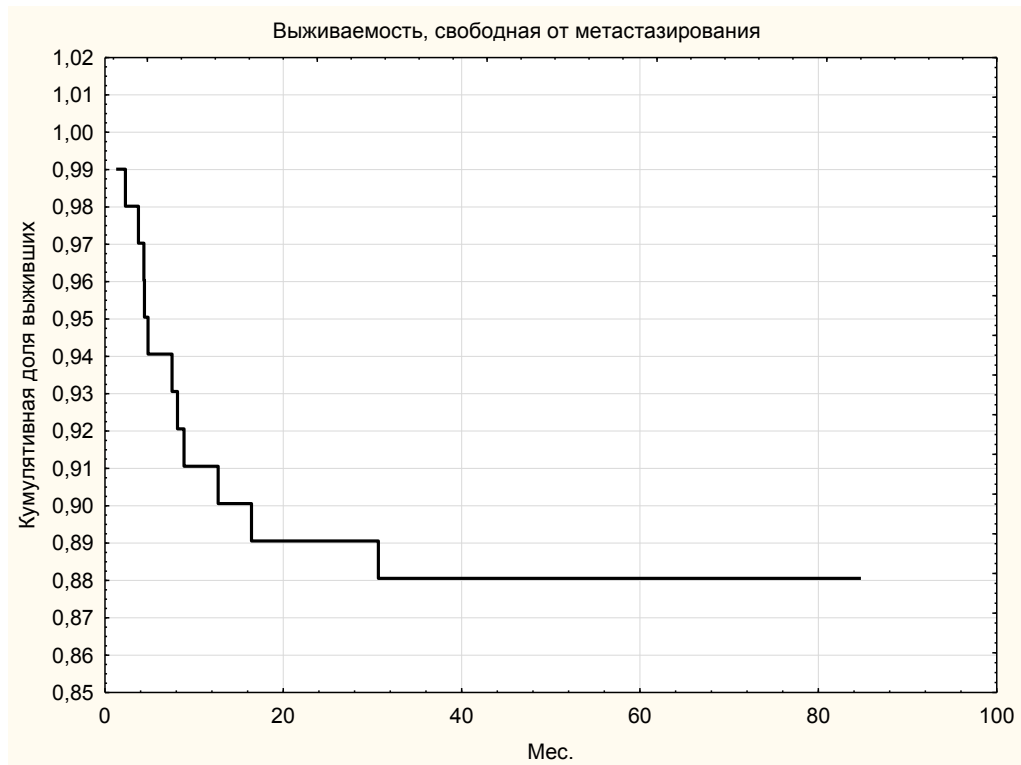
Функция мгновенного риска смерти в течение 12 интервалов изучаемого периода после операции представлена на рисунке 8.4. Максимальный риск смерти был зафиксирован у больных на 4 интервале (23,12 мес.). Распределение было бимодальным с первым подъемом риска летального исхода на 2 интервале (7,7 мес.). К концу наблюдения риск смерти вновь возрастал.

**Рисунок 8.3.** Оценка функции выживаемости больных раком ободочной кишки по методу таблиц времен жизни



**Рисунок 8.4.** Динамика функции мгновенного риска летального исхода у больных раком ободочной кишки

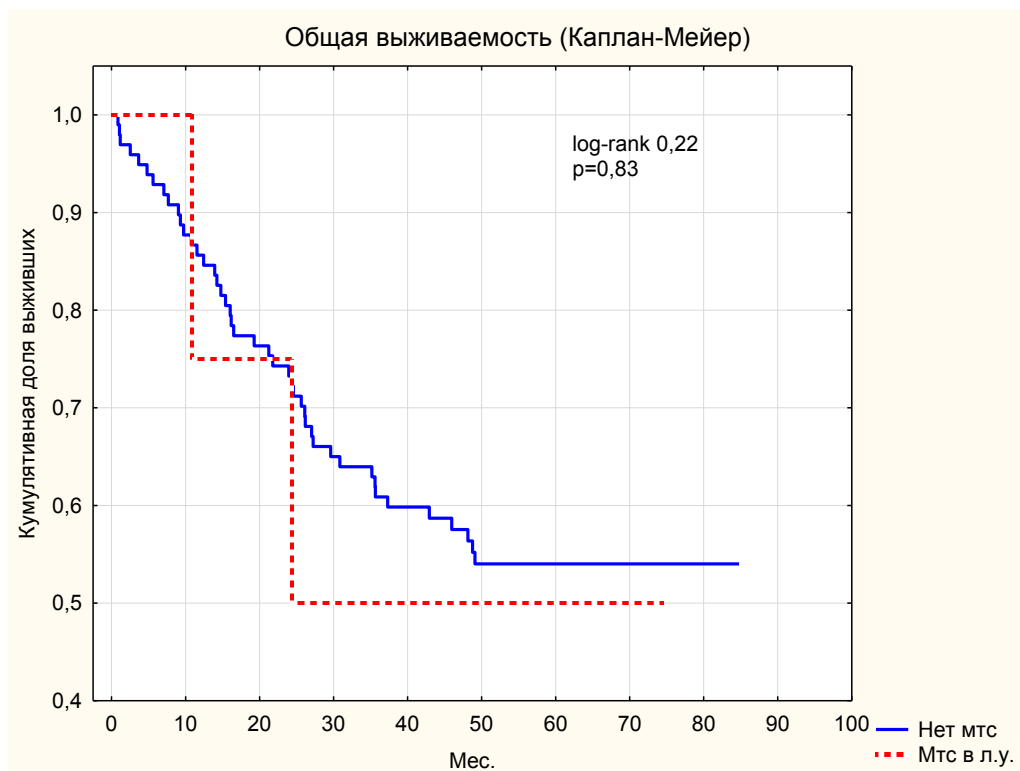
График вероятности выживания, свободного от метастазирования в процессе наблюдения, представлен на рисунке 8.5.



**Рисунок 8.5.** Выживаемость, свободная от метастазирования, развившегося в ходе наблюдения, у больных раком ободочной кишки

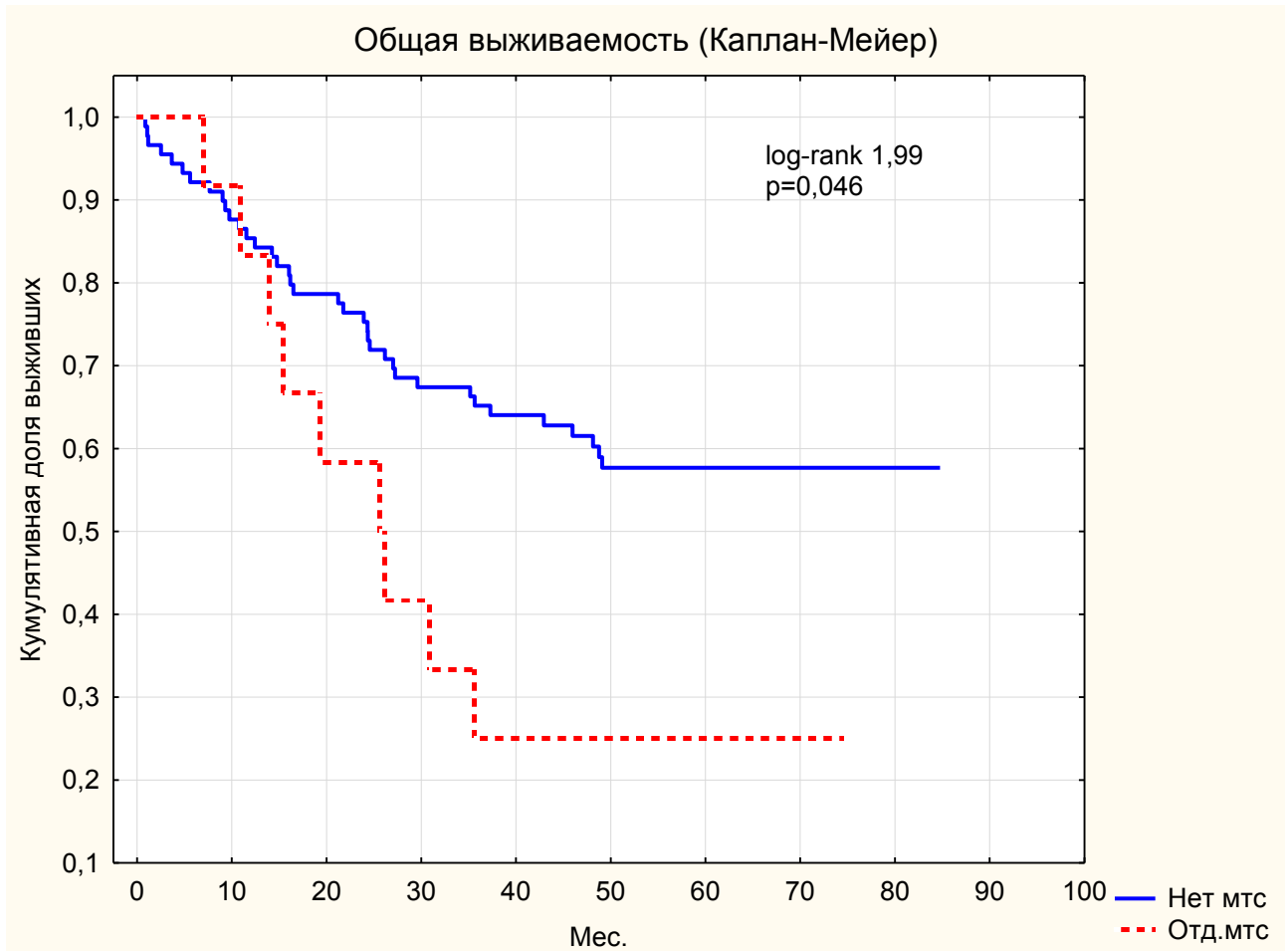
Появление отдаленных метастазов наблюдалось в основном в течение 31 мес. после операции, что привело к снижению выживаемости, свободной от метастазирования, со 100% до 88%. Основной градиент снижения выживаемости, свободной от метастазирования, развивался в течение 17 мес. после операции.

Отдельно были проанализированы сроки общей выживаемости пациентов, у которых после операции развились метастазы в отдаленные лимфатические узлы (рисунок 8.6). Общая выживаемость больных раком ободочной кишки не зависела от метастатического поражения лимфатических узлов в течение пятилетнего наблюдения ( $p=0,83$ , log-rank тест 0,22), что было связано, вероятно, с малым числом пациентов ( $n=12$ ) с изучаемым неблагоприятным событием.



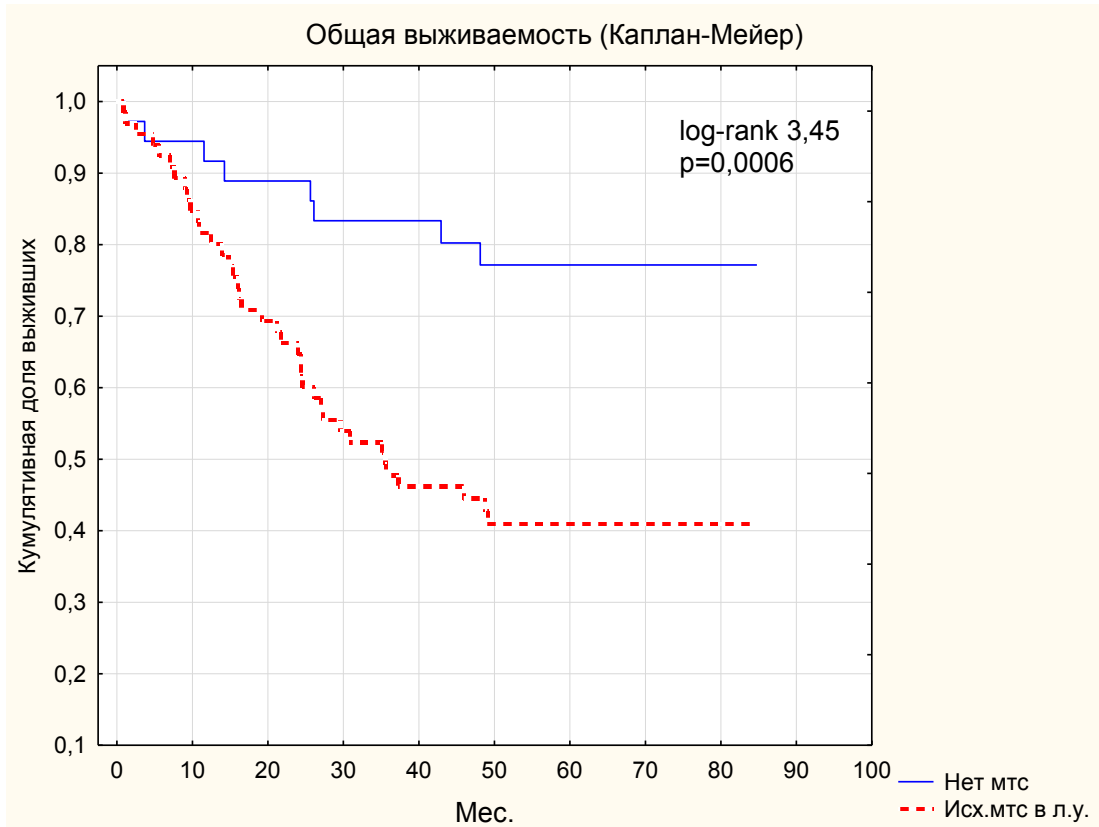
**Рисунок 8.6.** Общая выживаемость больных раком ободочной кишки в зависимости от метастатического поражения лимфатических узлов в ходе наблюдения

Общая выживаемость больных раком ободочной кишки в зависимости от наличия или отсутствия метастатического поражения печени в ходе наблюдения статистически значимо различалась ( $p=0,046$ , log-rank тест 1,99) (рисунок 8.7). При развитии метастазирования после операции кумулятивная выживаемость за пятилетний период снижалась до 23%, а при отсутствии метастазирования в печень до 58% (рисунок 8.7).

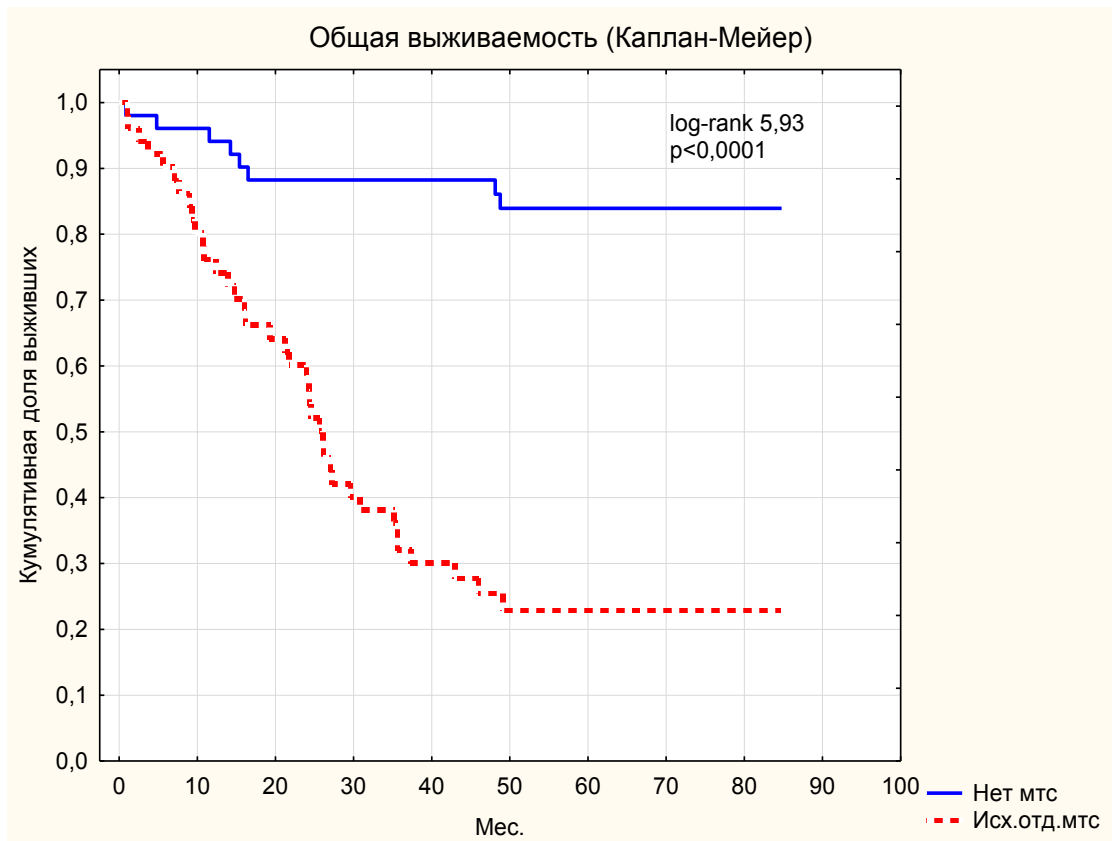


**Рисунок 8.7.** Общая выживаемость больных раком ободочной кишки в зависимости от развития отдаленных метастазов в печень в ходе наблюдения

Влияние исходного клинического статуса пациентов в зависимости от поражения регионарных лимфатических узлов (рисунок 8.8) и отдаленных метастазов (рисунок 8.9) до операции на общую выживаемость пациентов на послеоперационном этапе было статистически значимым. У пациентов с исходным метастатическим поражением лимфатических узлов до операции кумулятивная общая выживаемость снижалась за пятилетний период до 0,41, а у больных без метастазов в лимфоузлы – до 0,78 (рисунок 8.8). Различие было статистически значимым ( $p=0,0006$ , log-rank тест 3,45). Различие общей выживаемости было максимально выраженным в зависимости от наличия или отсутствия отдаленных метастазов до операции ( $p<0,0001$ , log-rank тест 5,93). У пациентов с отдаленными метастазами до операций кумулятивная общая выживаемость снижалась за пятилетний период до 0,21, а у больных без отдаленных метастазов – до 0,82 (рисунок 8.9).



**Рисунок 8.8.** Общая выживаемость больных раком ободочной кишки в зависимости от исходного статуса метастатического поражения регионарных лимфатических узлов



**Рисунок 8.9.** Общая выживаемость больных раком ободочной кишки в зависимости от наличия или отсутствия отдаленных метастазов исходно



Таким образом, в работе была дана характеристика общей выживаемости больных раком ободочной кишки II-IV стадий в зависимости от исходного локального и отдаленного метастатического статуса до операции и с учетом развивающихся неблагоприятных событий после операции, что позволило в дальнейшем оценить патогенетическое влияние различных предикторов на общую выживаемость больных и разработать прогностические модели течения заболевания.

## **8.2 Влияние профиля экспрессии микроРНК, генов-мишеней опухолевых клеток, факторов локального и системного иммунитета, опухолевых стволовых клеток и циркулирующих опухолевых клеток на общую выживаемость больных раком ободочной кишки**

Для оценки влияния молекулярно-генетических и иммунологических показателей крови и опухолевых клеток на сроки летального исхода и величину общей выживаемости проводили регрессионный анализ Кокса (модель пропорциональных рисков). При этом в программе Statistica 12.0. использовали модуль анализа выживаемости больных.

При проведении регрессионного анализа в качестве коварианты рассматривали стадию заболевания. Если учет стадии злокачественного заболевания сохранял статистическую значимость влияния показателя на выживаемость ( $p < 0,05$ ), то данный фактор считали независимым (фактор влияет на выживаемость и стадия влияет на выживаемость). То есть, показатель оказывал значимое влияние на выживаемость с учетом коррекции по стадии. По нашим данным все показатели, показавшие статистическую значимость при проведении регрессионного анализа Кокса, демонстрировали независимость от стадии заболевания.

При прогнозировании риска развития летального исхода в качестве предиктора выступали количественные значения иммунологических показателей крови, опухолевой ткани, экспрессии микроРНК и их генов-мишеней в опухоли, экспрессии маркеров с фенотипом стволовых в ткани опухоли, циркулирующих

опухолевых клеток. На первом этапе путем регрессионного анализа в процессе пошагового исключения (Backward) от максимального набора предикторов оставляли те, которые оказывали статистически значимое влияние на развитие летального исхода. Процедура исключения показателей из полного списка факторов останавливалась, когда из совокупности факторов нечего было удалять, оставались только хорошо объясняющие функцию риска независимые переменные.

На этапе анализа иммунологических показателей крови методом пошагового регрессионного анализа были отобраны два показателя – содержание CD16<sup>dim56</sup>bright (от натуральных киллеров) и концентрация в крови провоспалительного цитокина IL-6 (таблица 8.2).

**Таблица 8.2** – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния системных иммунологических показателей крови на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

Показатель	$\beta$ -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка $\beta$	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
CD16 <sup>dim56</sup> 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

Влияние содержания CD16<sup>dim56</sup>bright (от натуральных киллеров) и концентрации IL-6 в крови на развитие летального исхода больных было однонаправленным и прямым. Риск летального исхода больных усиливался при повышении содержания в крови CD16<sup>dim56</sup>bright ( $p=0,019$ ) и концентрации цитокина IL-6 ( $p=0,023$ ). На данное обстоятельство указывало положительное значение  $\beta$ -стандартизированного коэффициента регрессии для двух показателей.

Из экспрессионного профиля микроРНК в опухолевых клетках был сформирован многочисленный по числу факторов комплекс статистически значимых по влиянию на выживаемость предикторов (таблица 8.3).

Наиболее выраженное прямое влияние на летальность больных раком ободочной кишки 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.

**Таблица 8.3** – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии микроРНК опухолевых клеток на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

Показатель	$\beta$ -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка $\beta$	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

Увеличение экспрессии микроРНК hsa-miR-126-5p в опухолевых клетках повышало развитие летального исхода в 10,9 раз ( $p=0,0001$ ), hsa-miR-25-3p в 2,8 раз ( $p=0,0001$ ), hsa-miR-21-5p в 2,6 раз ( $p=0,0002$ ).

При характеристике влияния экспрессии генов опухолевых клеток на общую выживаемость больных раком ободочной кишки с помощью регрессионного анализа была выявлена многочисленная группа генетических факторов (таблица 8.4). Повышению риска летального исхода ( $p<0,05$ ) способствовало снижение экспрессии генов *GSK3B*, *SUFU* и *APC* и повышение экспрессии генов *MMP2*, *CD44*, *SPPI*, *FN1*, *COL1A2*, *SPARC*, *CTNNB1*, *NANOG*, *MYC*, *OCT4*, *NFKB1*. Наибольшее влияние на развитие летального исхода у больных раком ободочной кишки оказывали падение экспрессионной активности гена *GSK3B* (отношение шансов 73,04,  $p<0,001$ ), и повышение экспрессии *CD44* (отношение шансов 17,07,  $p<0,001$ ) и *MYC* (отношение шансов 13,91,  $p<0,001$ ). Ингибитор Wnt сигнального пути *GSK3B*, реализует свою функцию через связывание  $\beta$ -катенин в комплексе с ещё одним онкосупрессором APC. Значительное влияние на летальность оказывает дисрегуляция эпителиально-мезенхимального перехода (*CD44*) и сигнального пути Hedgehog, приводящего в частности к гиперэкспрессии транскрипционного фактора *MYC*.

**Таблица 8.4** – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии генов опухолевых клеток на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

Показатель	$\beta$ -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка $\beta$	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>SPP1</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
<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

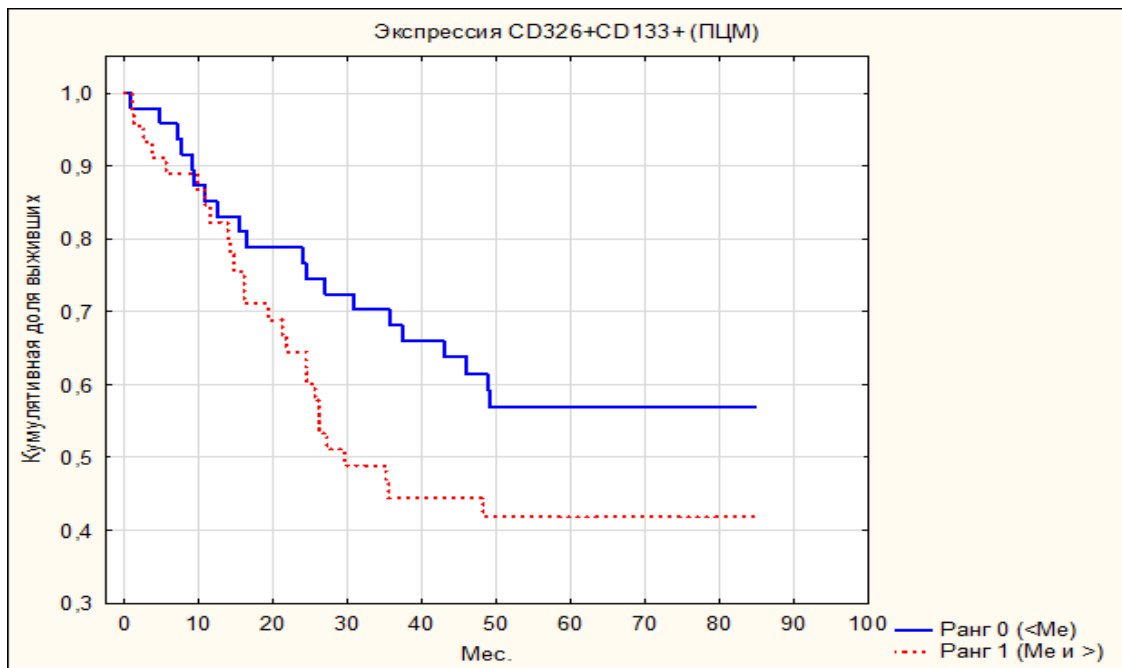
Понятие клеточной гетерогенности опухолевой ткани прочно вошло в фундаментальные основы канцерогенеза. Существуют различные молекулярные маркеры для определения популяций опухолевых стволовых клеток из опухолевой ткани. В исследовании для оценки экспрессии опухолевых стволовых клеток использовали два метода – проточной цитометрии и иммуногистохимическое исследование опухолевой ткани.

Среди маркеров опухолевых стволовых клеток, экспрессия которых оценивалась методом проточной цитометрии, статистически значимое влияние на общую выживаемость больных раком ободочной кишки было установлено для экспрессии CD326+CD133+ (таблица 8.5). Повышение экспрессии сочетания маркера семейства молекул адгезии эпителиальных клеток CD326+ и маркера семейства промиллина-1 CD133+ среди клеток опухолевой ткани сопровождалось повышением риска развития летального исхода в послеоперационный период в 1,98 раз ( $p=0,05$ ).

**Таблица 8.5** – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии маркеров с фенотипом стволовых опухолевых клеток методом проточной цитометрии на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

Показатель	$\beta$ -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка $\beta$	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
CD326+CD44+	0,005	0,016	0,088	0,767	0,995
CD326+CD133+	0,180	0,009	3,779	<b>0,050</b>	1,982
CD326+CD44+CD133+	0,217	0,196	1,217	0,270	0,805

На рисунке 8.10 отражена динамика выживаемости среди пациентов, у которых экспрессия сочетания маркеров CD326+ и CD133+ была выше значения медианы и ниже. За пятилетний срок наблюдения кумулятивная выживаемость среди пациентов, у которых экспрессия CD326+CD133+ была выше медианы снизилась до 0,41. У больных раком ободочной кишки, у которых методом проточной цитометрии было установлено, что величина экспрессии CD326+CD133+ ниже медианы, кумулятивная выживаемость снизилась до 0,58. Различие между динамикой выживаемости в двух подгруппах было статистически значимым (log-rank 2,11, p=0,042).



**Рисунок 8.10.** Общая выживаемость больных раком ободочной кишки в зависимости от величины экспрессии маркера стволовых клеток CD133+ в опухоли

Таким образом, оценка экспрессии маркеров CD326+CD133+ опухолевых стволовых клеток в опухолевой ткани методом проточной цитометрии имеет прогностическое значения для оценки риска развития летального исхода. При превышении экспрессии CD326+ CD133+ выше 5,0% риск развития летального исхода в послеоперационный период повышался.

При иммуногистохимическом исследовании экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток прогностический потенциал в отношении оценки риска летального исхода был раскрыт у более широкого круга показателей (таблица 8.6).

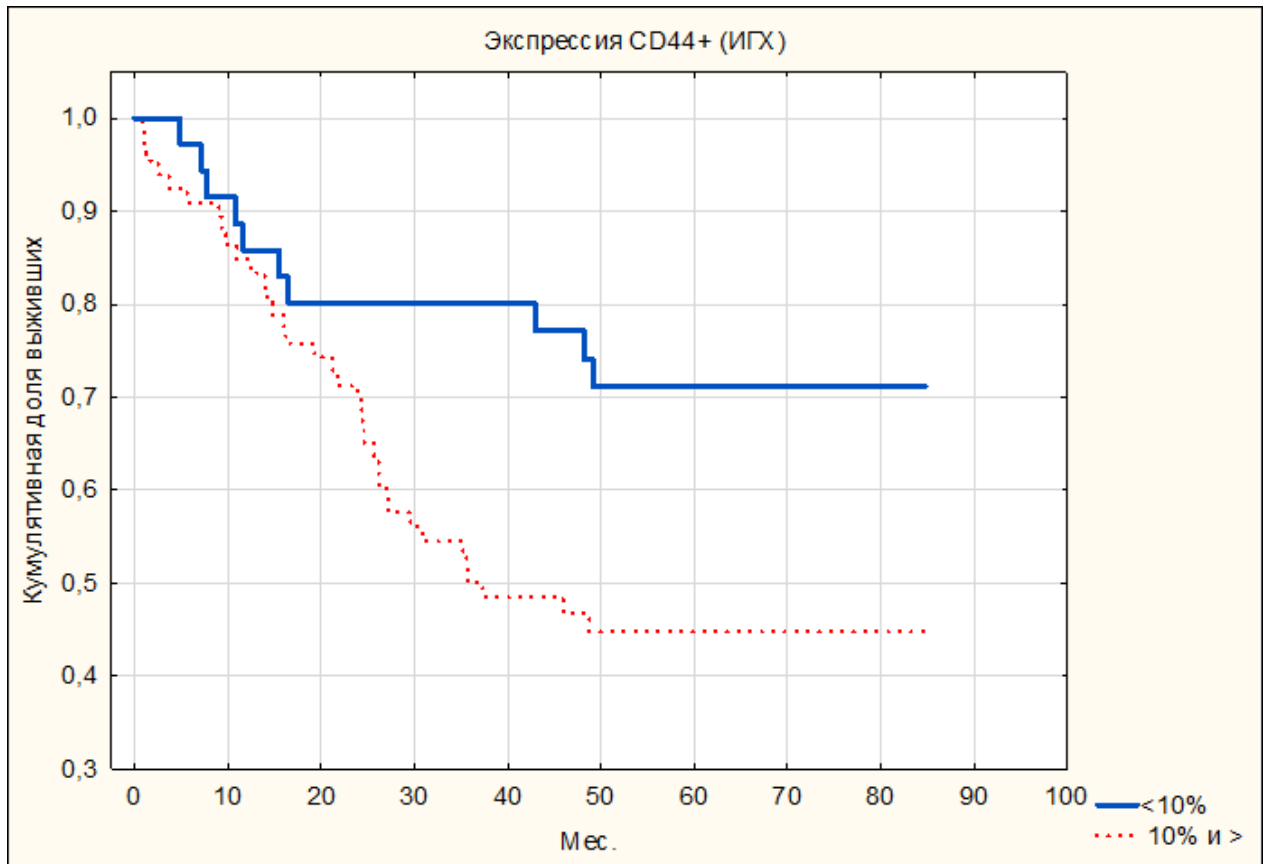
Повышение экспрессии маркеров семейства рецепторов гиалуроновой кислоты CD44+, семейства промиллина-1 CD133+, а также балльной оценки экспрессии факторов транскрипции семейства эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1 среди клеток опухолевой ткани сопровождалось повышением риска развития летального исхода в послеоперационный период, соответственно, в 1,62 ( $p=0,013$ ), 1,92 ( $p=0,001$ ) и 1,88 раза ( $p=0,002$ ).

**Таблица 8.6** – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии маркеров с фенотипом стволовых клеток в ткани первичной опухоли методом ИГХ на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

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

На рисунке 8.11 отражена динамика выживаемости среди пациентов, у которых экспрессия маркера CD44+ была выше либо ниже 10%. За пятилетний срок наблюдения кумулятивная выживаемость среди пациентов, у которых экспрессия CD44+ была выше 10%, снизилась до 0,45. У больных клинической группы, у которых методом ИГХ было установлено, что величина экспрессии CD44+ ниже 10%, кумулятивная выживаемость снизилась до 0,71. Различие

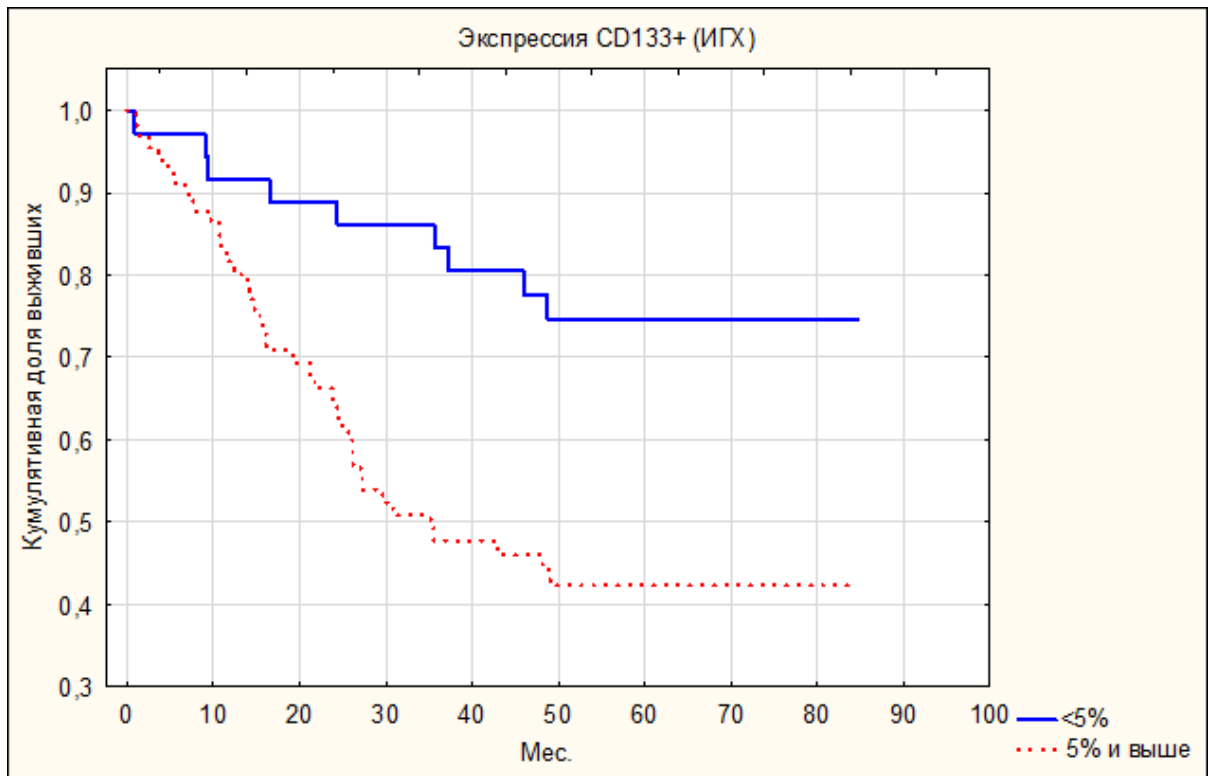
выживаемости больных двух подгрупп в зависимости от экспрессии CD44+ в опухолевой ткани было статистически значимым (log-rank 2,49,  $p=0,013$ ).



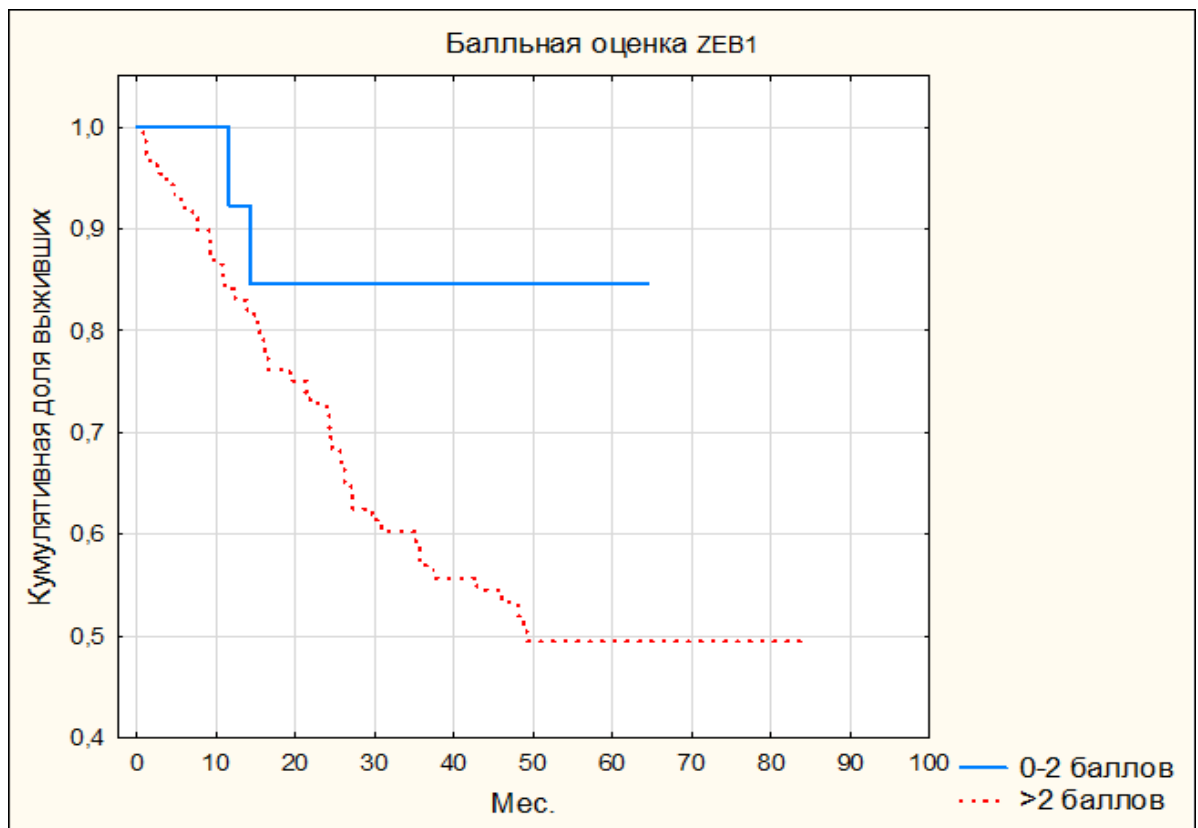
**Рисунок 8.11.** Общая выживаемость больных раком ободочной кишки в зависимости от экспрессии CD44+ в опухоли

Для CD133+ разделительный уровень оценки экспрессии соответствовал 5%. На рисунке 8.12 отражена динамика выживаемости среди пациентов, у которых экспрессия маркера CD133+ была выше либо ниже 5%. В течение пяти лет наблюдения кумулятивная выживаемость пациентов, у которых экспрессия CD133+ была выше 5%, снизилась до 0,41. У больных, у которых методом ИГХ было установлено, что величина экспрессии CD133+ ниже 5%, кумулятивная выживаемость снизилась до 0,745. Различие выживаемости пациентов двух подгрупп в зависимости от выраженности экспрессии CD133+ в опухолевой ткани было статистически значимым (log-rank 3,2,  $p=0,001$ ).

Наиболее значимое различие выживаемости пациентов сложилось в зависимости от выраженности экспрессии маркера эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1 (рисунок 8.13).



**Рисунок 8.12.** Общая выживаемость больных раком ободочной кишки в зависимости от экспрессии CD133+ в опухоли



**Рисунок 8.13.** Общая выживаемость больных раком ободочной кишки в зависимости от экспрессии маркера эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1 в опухоли



При низкой балльной оценке выраженности экспрессии ZEB1 (0-2 балла) выживаемость за период наблюдения снижалась до 0,84, а при баллах 3 и выше выживаемость снижалась до 0,495 (рис.13). Различия выживаемости в зависимости от выраженности экспрессии ZEB1 были статистически значимыми (log-rank 5,38,  $p=0,0002$ ).

В результате регрессионного анализа Кокса было установлено, что большинство из факторов локального иммунитета не оказывали статистически значимого отдельного влияния на риск летального исхода (таблица 8.7). Лишь в отношении экспрессии рецептора клеточной гибели PD-1 (CD279+) на лимфоцитах выявлена способность оказывать влияние на развитие неблагоприятного исхода: при усилении его экспрессии отношение шансов развития летального исхода повышалось в 2,82 раза ( $p=0,023$ ). Кроме того, в отношении экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости I типа HLA-ABC на опухолевых клетках, экспрессирующих CD326+ наблюдалась обратное по направленности влияние на риск неблагоприятного исхода. При снижении количества CD326+HLA-ABC+ клеток риск летального исхода повышался ( $p=0,01$ ) (таблица 8.7).

**Таблица 8.7** – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии локальных иммунологических показателей микроокружения и главного комплекса гистосовместимости опухолевыми клетками на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

Показатель	$\beta$ -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка $\beta$	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
1	2	3	4	5	6
CD45+	-0,56	0,41	1,05	0,31	0,12
CD45+CD3+	-0,04	0,03	1,26	0,26	0,96
CD3+CD4+	0,97	0,95	1,04	0,31	2,63
CD3+CD8+	0,97	0,94	1,06	0,30	2,64
Tregs	0,32	0,06	0,07	0,79	0,98
TNK	0,10	0,07	2,04	0,15	1,11

1	2	3	4	5	6
CD56+	-0,04	0,03	1,63	0,20	0,96
CD19+	0,01	0,06	0,01	0,91	1,01
CD4memory	0,08	0,05	2,82	0,09	1,08
CD8memory	-0,01	0,02	0,48	0,49	0,99
CD4naiv	0,12	0,08	2,09	0,15	1,12
CD8naiv	-0,09	0,06	2,35	0,13	0,91
CD56+CD335+	-0,02	0,02	0,93	0,33	0,98
CD45+CD274+	0,91	0,02	2,23	0,063	0,99
CD45+CD279+	1,27	0,02	4,47	<b>0,023</b>	2,82
CD326+HLA-ABC	-1,01	0,03	6,54	<b>0,01</b>	0,19
CD326+HLA-E	-0,03	0,02	1,83	0,18	0,97
CD326+CD274+	0,01	0,03	0,04	0,83	1,01

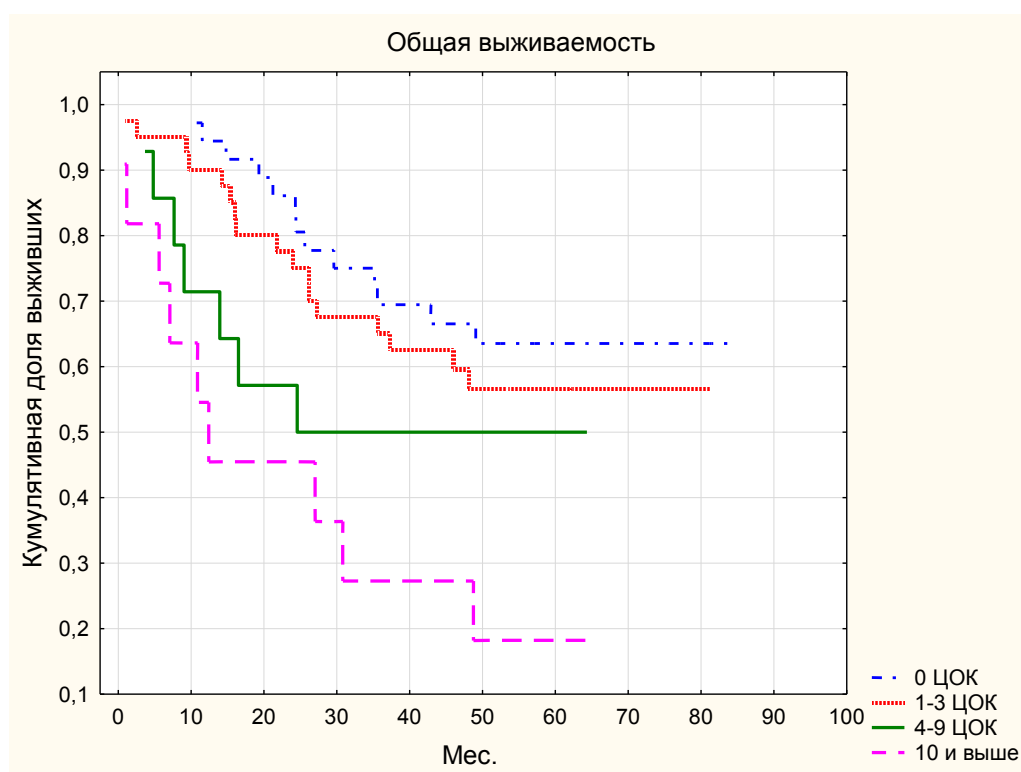
Циркулирующие опухолевые клетки рассматривают как перспективный прогностически значимый маркер в отношении оценки риска прогрессии онкологического заболевания. Популяция ЦОК гетерогенна: среди них встречаются ОСК, клетки в состоянии ЭМП и клетки без указанных признаков. С повышением количества ЦОК в крови пациентов было ассоциировано снижение выживаемости в послеоперационный период (таблица 8.8), о чем свидетельствовали высокие значения  $\beta$ -стандартизованного коэффициента регрессии, критерия Вальда и соответствующий  $p=0,002$ . Повышение количества ЦОК в крови выше 2 сопровождалось повышением риска развития летального исхода в 1,58 раза ( $p=0,002$ ).

Одновременный учет экспрессии маркеров ОСК и количества ЦОК в крови расширил прогностические возможности только для сочетания ЦОК и CD44+. При ЦОК  $\geq 4$  и превышении экспрессии CD44+ в опухолевой ткани выше 10% риск развития летального исхода у пациентов клинической группы возрастал в 7,2 раза ( $p<0,001$ ) (таблица 8.8).

**Таблица 8.8** – Параметры регрессионного анализа Кокса по оценке изолированного и совместного с экспрессией CD44+ в опухоли влияния ЦОК на общую выживаемость больных раком ободочной кишки

Показатель	$\beta$ -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка $\beta$	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
ЦОК	0,454	0,146	9,729	0,002	1,575
Учет ЦОК и CD44+	2,795	0,364	18,758	0,000	7,213

На рисунке 8.14 отражена динамика выживаемости пациентов, у которых число ЦОК в крови соответствовало 0, от 1 до 3, от 4 до 9, 10 и выше клеток.



**Рисунок 8.14.** Общая выживаемость больных раком ободочной кишки в зависимости от количества 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 (таблица 8.9). Различие выживаемости пациентов четырех подгрупп в зависимости от числа ЦОК было статистически значимым (log-rank 11,59, p=0,009).

**Таблица 8.9** – Динамика кумулятивной выживаемости больных раком ободочной кишки в зависимости от числа ЦОК

Период, мес.	0 ЦОК	1-3 ЦОК	4-9 ЦОК	10 и выше
0,9	100,0	100,0	100,0	100,0
10,2	100,0	90,1	71,4	63,6
19,5	88,9	80,1	57,1	45,5
28,8	77,8	67,6	50,0	36,4
38,2	69,4	62,6	50,0	27,3
47,5	66,6	59,9	50,0	27,3
56,8	63,3	56,5	50,0	16,4
66,1	63,3	56,5	50,0	16,4
75,4	63,3	56,5	50,0	16,4
84,8	63,3	56,5	50,0	16,4

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.

Таким образом, в работе была установлена клиническая прогностическая значимость иммунологических и молекулярно-генетических показателей, ОСК и ЦОК у больных раком ободочной кишки. С развитием летального исхода были ассоциированы повышение в крови уровня цитокина IL-6 и CD16dim56bright лимфоцитов, повышение экспрессии микроРНК hsa-miR-126-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p и снижение экспрессии hsa-miR-143-3p, снижение экспрессии генов *GSK3B*, *SUFU* и *APC* и повышение экспрессии генов *MMP2*, *CD44*, *SPPI*, *FNI*, *COL1A2*, *SPARC*, *CTNNB1*, *NANOG*, *MYC*, *OCT4*, *NFKB*, повышение экспрессии в опухолевой ткани стволовых опухолевых клеток CD44+, CD133+, снижение экспрессии CD326+HLA-ABC в опухоли, а также усиление экспрессии CD279+ на лимфоцитах и факторов транскрипции семейства эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1 на опухолевых клетках, увеличение числа ЦОК в периферическом кровотоке. Наибольшее влияние на развитие летального исхода пациентов клинической группы оказывали падение экспрессионной активности гена *GSK3B* (отношение шансов 73,04, p<0,001), и повышение экспрессии *CD44* (отношение шансов 17,07, p<0,001) и *MYC* (отношение шансов 13,91, p<0,001).

### 8.3. Прогностическая значимость экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток, эпителиально-мезенхимального перехода, локального иммунитета, молекул главного комплекса гистосовместимости и количества циркулирующих опухолевых клеток для оценки риска метастазирования у больных раком ободочной кишки после операции

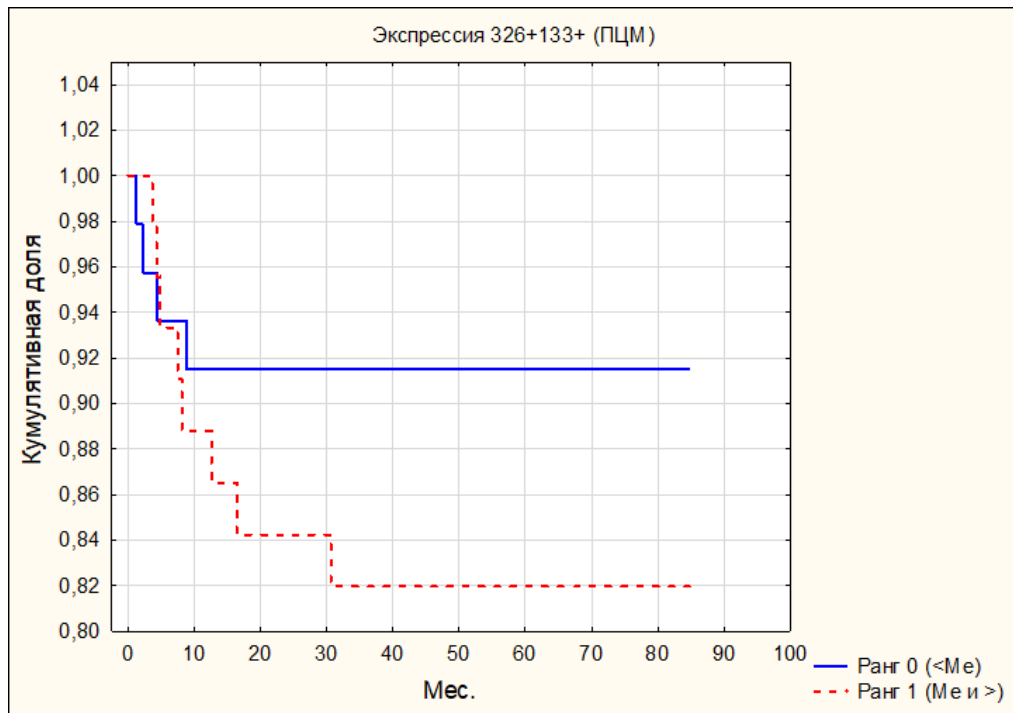
На следующем этапе путем проведения регрессионного анализа по оценке влияния экспрессии маркеров ОСК, фактора ЭМП, изученных методом проточной цитометрии и ИГХ, на выживаемость больных раком ободочной кишки, свободную от метастазирования были выделены показатели со статистической значимостью для прогноза (таблица 8.10).

**Таблица 8.10** – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии маркеров ОСК и фактора ЭМП в опухоли на выживаемость больных клинической группы, свободную от метастазирования

Показатель	$\beta$ -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка $\beta$	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
CD326+CD44+	0,003	0,030	0,009	0,923	0,997
CD326+CD133+	0,165	0,037	3,030	<b>0,042</b>	1,937
CD326+CD44+CD133+	0,171	0,359	0,227	0,634	0,843
CD44+	0,019	0,041	0,227	0,634	0,981
CD133+	0,335	0,089	6,937	<b>0,006</b>	1,791
ALDH1	0,038	0,047	0,646	0,422	0,963
ZEB1	1,321	0,127	6,364	<b>0,012</b>	1,679

Вероятность развития метастазов в лимфатические узлы или печень после операции повышалась при увеличении экспрессии CD326+CD133+ (отношение шансов 1,94,  $p=0,042$ ), маркера CD133+ (отношение шансов 1,79,  $p=0,006$ ) и фактора эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1 (отношение шансов 1,68,  $p=0,012$ ).

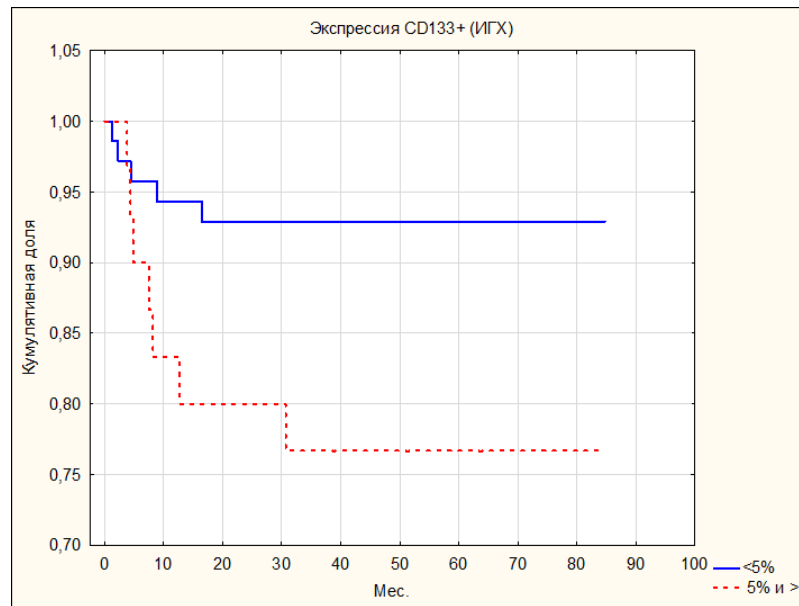
Динамика выживаемости, свободной от метастазирования, у больных с различным уровнем экспрессии маркеров CD326+CD133+, CD133+ и ZEB1 в опухоли отражена на рисунках 8.15 – 8.17.



**Рисунок 8.15.** Выживаемость, свободная от метастазирования, больных раком ободочной кишки в зависимости от экспрессии CD326+ CD133+

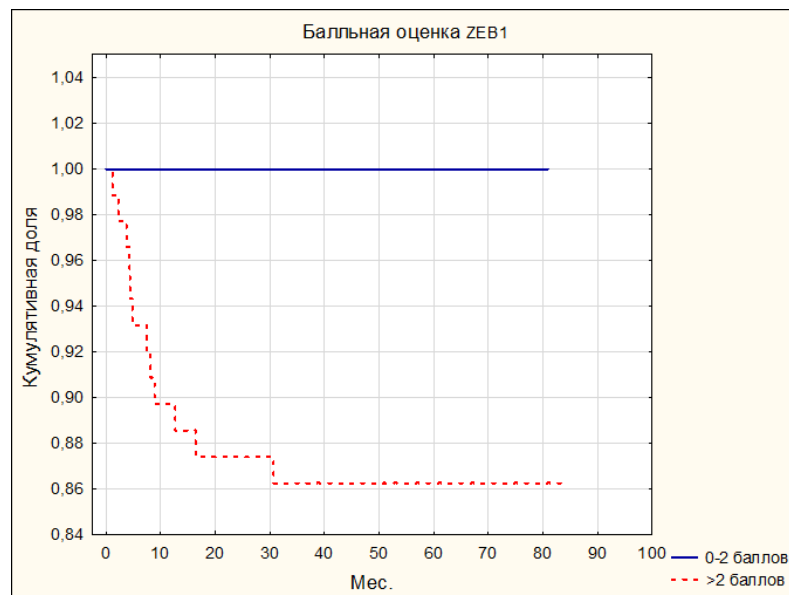
За пятилетний срок наблюдения выживаемость, свободная от метастазирования, среди больных, у которых экспрессия CD326+CD133+ была выше медианы, снизилась до 0,82. У больных раком ободочной кишки, у которых методом проточной цитометрии было установлено, что величина экспрессии CD326+CD133+ ниже медианы, кумулятивная выживаемость снизилась до 0,917. Различия между динамикой бессобытийной выживаемости у больных с уровнем экспрессии CD326+CD133+ выше и ниже медианы было статистически значимым (log-rank 2,15,  $p=0,041$ ) (рисунок 8.15).

На рисунке 8.16 отражена динамика выживаемости среди пациентов, у которых экспрессия маркера CD133+ была выше либо ниже 5%. В течение пяти лет наблюдения кумулятивная выживаемость пациентов, у которых экспрессия CD133+ была выше 5%, снизилась до 0,764. У больных клинической группы, у которых методом ИГХ было установлено, что величина экспрессии CD133+ ниже 5%, кумулятивная выживаемость снизилась до 0,947. Различия выживаемости пациентов по экспрессии маркера CD133+ выше или ниже 5% в опухолевой ткани было статистически значимым (log-rank 2,74,  $p=0,006$ ).



**Рисунок 8.16.** Выживаемость, свободная от метастазирования, больных раком ободочной кишки в зависимости от величины экспрессии маркера CD133+

Наиболее значимое различие выживаемости, свободной от метастазирования, у больных раком ободочной кишки сложилось в зависимости от выраженности экспрессии маркера эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1 (рисунок 8.17).



**Рисунок 8.17.** Выживаемость, свободная от метастазирования, больных раком ободочной кишки в послеоперационном периоде в зависимости от величины экспрессии маркера эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1

При низкой балльной оценке выраженности экспрессии ZEB1 (0-2 балла) выживаемость за период наблюдения не снижалась, а при баллах 3 и выше

выживаемость снижалась до 0,864. Различия выживаемости в зависимости от выраженности экспрессии ZEB1 были статистически значимыми (log-rank 3,78,  $p=0,004$ ).

В результате регрессионного анализа Кокса было установлено отсутствие статистически значимого влияния большинства локальных иммунологических показателей микроокружения опухоли и на риск развития метастатического поражения в послеоперационном периоде (таблица 8.11). Исключение составили регуляторные Т-лимфоциты и экспрессия опухолевыми клетками главного комплекса гистосовместимости I типа. С повышением числа регуляторных Т-лимфоцитов и снижением процента опухолевых клеток, экспрессирующих HLA-ABC, риск развития метастатического поражения у больных возрастал ( $p<0,05$ ) (таблица 8.11).

**Таблица 8.11** – Результаты регрессионного анализа Кокса по оценке влияния экспрессии локальных иммунологических показателей микроокружения и главного комплекса гистосовместимости опухолевыми клетками на выживаемость, свободную от метастазирования

Показатель	$\beta$ -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка $\beta$	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
CD45+	-0,81	0,33	1,23	0,27	0,01
CD45+CD3+	-0,04	0,06	0,37	0,54	0,96
CD3+CD4+	-0,48	0,26	1,02	0,31	0,23
CD3+CD8+	-0,49	0,47	1,03	0,31	0,23
Tregs	1,21	0,12	2,74	<b>0,01</b>	1,81
TNK	0,16	0,13	1,51	0,22	1,17
CD56+	0,01	0,05	0,06	0,80	1,01
CD19+	-0,14	0,10	1,94	0,16	0,87
CD4memory	-0,01	0,05	0,06	0,81	0,99
CD8memory	0,01	0,04	0,07	0,78	1,01
CD4naiv	0,05	0,02	0,02	0,98	1,00
CD8naiv	0,07	0,06	1,69	0,19	1,08
CD 56+CD335+	0,03	0,02	1,54	0,22	1,03
CD 45+CD274+	0,72	0,13	1,58	0,13	1,38
CD 45+CD279+	0,65	0,12	1,92	0,16	1,22
CD326+HLA-ABC	-1,94	0,07	3,68	<b>0,04</b>	0,28
CD326+HLA-E	-0,01	0,04	0,09	0,77	1,01
CD326+CD274+	-0,13	0,09	2,23	0,14	0,88



Прогностическое значение числа ЦОК в периферическом кровотоке на выживаемость, свободную от метастазирования, было низким (таблица 8.12).

**Таблица 8.12** – Параметры регрессионного анализа Кокса влияния ЦОК на выживаемость, свободную от метастазирования, у больных раком ободочной кишки

Показатель	$\beta$ -станд. коэффициент регрессии	Станд. ошибка $\beta$	Критерий Вальда	p	Отношение шансов
ЦОК	0,207	0,276	0,562	0,454	1,230

Таким образом, оценка экспрессии на опухолевых клетках маркеров ОСК CD133+, эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1 и главного комплекса гистосовместимости I типа HLA-ABC, а также локальный уровень Tregs клеток являются информативными показателями для прогноза риска развития метастазов в послеоперационный период.

#### **8.4. 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 в послеоперационный период (патент RU 2772207). На основании полученных сведений при разработке прогностической модели в качестве предикторов были выбраны два показателя - экспрессия CD44+ в опухолевой ткани методом ИГХ и число ЦОК в периферическом кровотоке. Выраженность экспрессии CD44+ в опухолевой ткани ранжировали 1 или 0: 1 балл – экспрессия CD44+ более 10% включительно, 0 баллов – менее 10%. Число ЦОК также ранжировали в баллах: 0 баллов – ЦОК в периферическом кровотоке отсутствуют, 1 балл - 1-3 ЦОК, 2 балла – 4- 9 ЦОК, 3 балла – 10 ЦОК и выше.

Далее методом логистической регрессии определяли коэффициенты математического выражения, позволяющие рассчитать вероятность развития летального исхода в первые пять лет после операции (z).

Математическое выражение имело вид:

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

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;

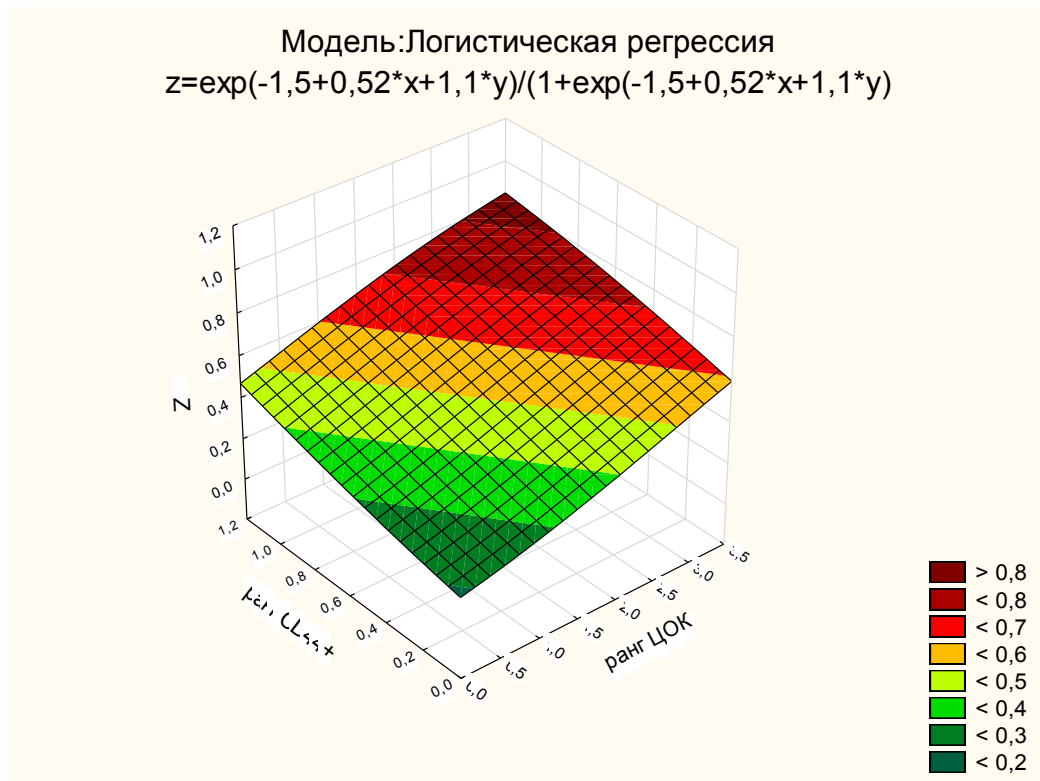
CD44 – ранжированная оценка экспрессии CD44+ в опухолевой ткани: 1 балл – экспрессия CD44+ более 10% включительно, 0 баллов – менее 10%;

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

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

Критерий Хи-квадрат Пирсона составил 12,54 при  $p = 0,002$ , что указывало на статистическую значимость и информативность полученного математического выражения для расчета риска летального исхода больных раком ободочной кишки после операции.

На рисунке 8.18 иллюстрирована зависимость вероятности развития летального исхода пациентов после операции от числа ЦОК в периферической крови и экспрессии CD44+ в опухолевой ткани. С повышением экспрессии CD44+ в опухолевой ткани и числа ЦОК в периферическом кровотоке вероятность развития летального исхода больных раком ободочной кишки после операции повышалась. Стратификация поверхности графика цветом помогает визуально определить вероятность развития неблагоприятного исхода заболевания.



**Рисунок 8.18.** График зависимости вероятности развития летального исхода у больных раком ободочной кишки после операции и числом ЦОК в периферической крови (x), экспрессии CD44+ в опухолевой ткани (y)

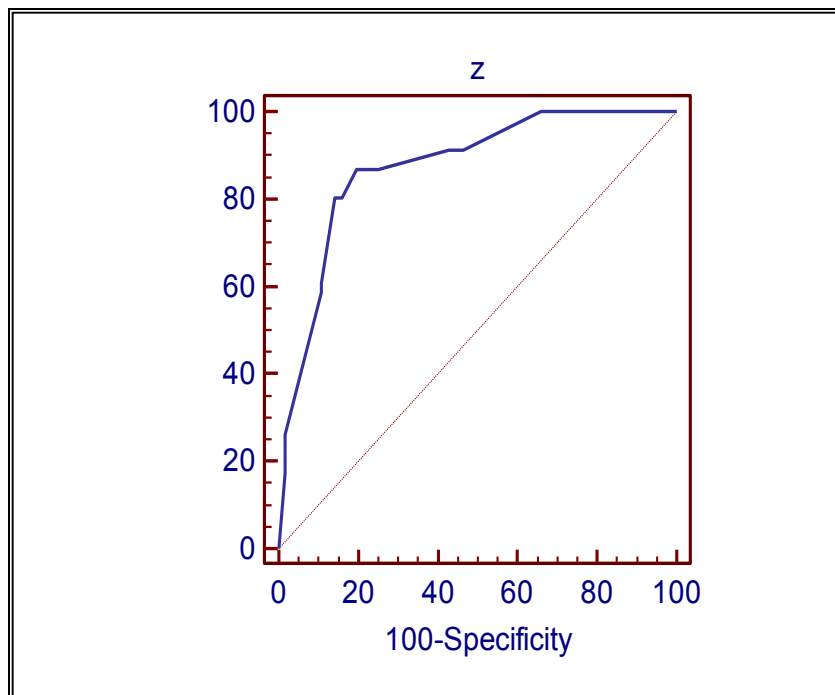
При повышении ранга экспрессии CD44+ в опухолевой ткани от 0 до 1 при условии, что число ЦОК не изменяется, риск развития летального исхода увеличивался в 3,045 раз ( $p < 0,001$ ). Напротив, при повышении у больных ранга ЦОК от 0 до 1 или от 1 к 2 при постоянном значении экспрессии CD44+ в опухолевой ткани, риск развития летального исхода увеличивался в 4,84 раза ( $p < 0,001$ ).

В таблице 8.13 при различных вариациях по величине двух предикторов был высчитан по разработанной модели коэффициент прогноза летального исхода в первые пять лет после операции. Например, при повышении экспрессии маркера CD44+ выше 10% при ИГХ опухолевой ткани (ранг 1) и количестве ЦОК в периферическом кровотоке 6 (ранг 2) риск летального исхода в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки составил 0,645. Пользуясь данными таблицы 8.13 можно определить величину риска при различных величинах предикторов.

**Таблица 8.13** – Коэффициент прогноза летального исхода в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки в зависимости от экспрессии CD44+ в опухолевой ткани и числа ЦОК в периферическом кровотоке

Ранг ЦОК	Ранг CD44+	
	0	1
0	0,18	0,40
1	0,27	0,52
2	0,38	0,645
3	0,51	0,76

По разработанной модели у больных были рассчитаны коэффициенты прогноза летального исхода. Сопоставляя рассчитанные значения вероятности и фактические данные о наличии или отсутствии летального исхода методом ROC анализа было найдено разделительное значение для  $Z$ , которое позволяло сделать заключение о высоком либо низком риске неблагоприятного исхода заболевания. Таким разделительным значением была величина  $Z$ , равная 0,34. При превышении данной величины с диагностической чувствительностью 86,96% и специфичностью 80,36% можно заключить о высоком риске летального исхода (рисунок 8.19).



**Рисунок 8.19.** ROC-кривая соотношения диагностической чувствительности (Sensitivity) и специфичности (Specificity) при различных значениях коэффициента прогноза летального исхода в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки

При превышении  $Z$  величины 0,34, риск летального исхода повышался в 4,43 раза (таблица 8.14). Площадь под ROC кривой соответствовала  $0,874 \pm 0,035$  (доверительный интервал при 95% 0,794 - 0,932). ROC кривая статистически значимо отличалась от диагональной опорной линии ( $z=10,83$  при  $p < 0,0001$ ). По соотношению величины площади под ROC кривой, статистической значимости и величин диагностической чувствительности и специфичности, можно заключить, что качество прогностического теста было хорошим.

**Таблица 8.14** – Показатели ROC анализа информативности оценки риска летального исхода в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки

Criterion	ДЧ	95% CI ДЧ	ДС	95% CI ДС	ОШ
$\geq 0,01$	100	92,3 - 100,0	0	0,0 - 6,4	1
$> 0,17$	100	92,3 - 100,0	33,93	21,8 - 47,8	1,51
$> 0,18$	91,31	79,2 - 97,6	53,57	39,7 - 67,0	1,97
$> 0,22$	91,31	79,2 - 97,6	57,14	43,2 - 70,3	2,13
$> 0,27$	86,96	73,7 - 95,1	75,0	61,6 - 85,6	3,48
$> 0,34$ *	86,96	73,7 - 95,1	80,36	67,6 - 89,8	4,43
$> 0,37$	80,43	66,1 - 90,6	83,93	71,7 - 92,4	5
$> 0,40$	80,43	66,1 - 90,6	85,71	73,8 - 93,6	5,63
$> 0,41$	60,87	45,4 - 74,9	89,29	78,1 - 96,0	5,68
$> 0,50$	58,74	43,2 - 73,0	89,29	78,1 - 96,0	5,48
$> 0,52$	26,09	14,3 - 41,1	98,21	90,4 - 100,0	14,61
$> 0,64$	17,39	7,8 - 31,4	98,21	90,4 - 100,0	9,74
$> 0,75$	0	0,0 - 7,7	100	93,6 - 100,0	

Примечание: ДЧ – диагностическая чувствительность, 95% CI – доверительный интервал, ДС – диагностическая специфичность, ОШ – отношение шансов

В таблице 8.15 при различных вариациях по величине двух предикторов была дана качественная оценка риска летального исхода в первые пять лет после операции.

**Таблица 8.15** – Коэффициент прогноза летального исхода в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки в зависимости от экспрессии CD44+ в опухолевой ткани и числа ЦОК в периферическом кровотоке

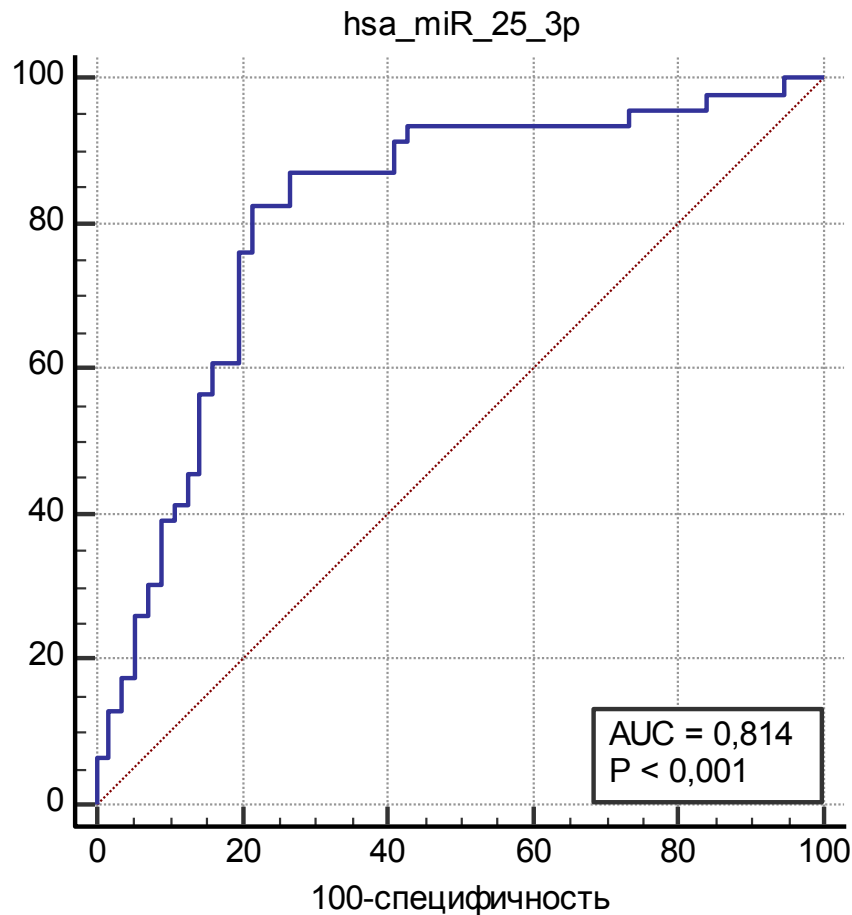
Ранг ЦОК	Ранг CD44+	
	0	1
0	низкий	высокий
1	низкий	высокий
2	высокий	высокий
3	высокий	высокий

Пользуясь результатами таблицы 8.15, можно сформировать риск летального исхода у больных после операции по величине двух предикторов – числу ЦОК в периферическом кровотоке и экспрессии CD44+ в опухолевой ткани.

Кроме того, при разработке моделей был выявлен еще один прогностически информативный комплекс предикторов, позволяющий осуществить эффективное ранжирование больных по риску развития летального исхода. С помощью метода логистической регрессии с пошаговым включением переменных в модель была сформирована совокупность взаимодополняющих по значимости предикторов летального исхода с учетом иммунологических и генетических факторов. В разработанную модель были объединены параметры: уровень экспрессии микроРНК 25-3р (участие в регуляции пролиферативного и метастатического потенциала), экспрессия рецепторов клеточной гибели на лимфоцитах CD45+CD279+, ранжированное число ЦОК и экспрессия рецептора HLA-ABC на опухолевых клетках, способствующих их распознаванию иммунными клетками. Иммунные нарушения, связанные с усилением гибели иммунокомпетентных клеток, «ускользание» опухолевых клеток от иммунологического надзора на фоне циркуляции опухолевых клеток способствовали развитию неблагоприятного исхода заболевания.

По результатам ROC-анализа критическое значение экспрессии микроРНК 25-3р, при превышении которого риск развития летального исхода усиливался, составило 1,89. При повышении относительного коэффициента экспрессии

микроРНК 25-3р более 1,89 включительно, риск развития летального исхода у больных раком ободочной кишки в первые пять лет после операции трансформировался в высокий с диагностической чувствительностью 82,6% и специфичностью 78,6% ( $p < 0,001$ ) (рисунок 8.20).

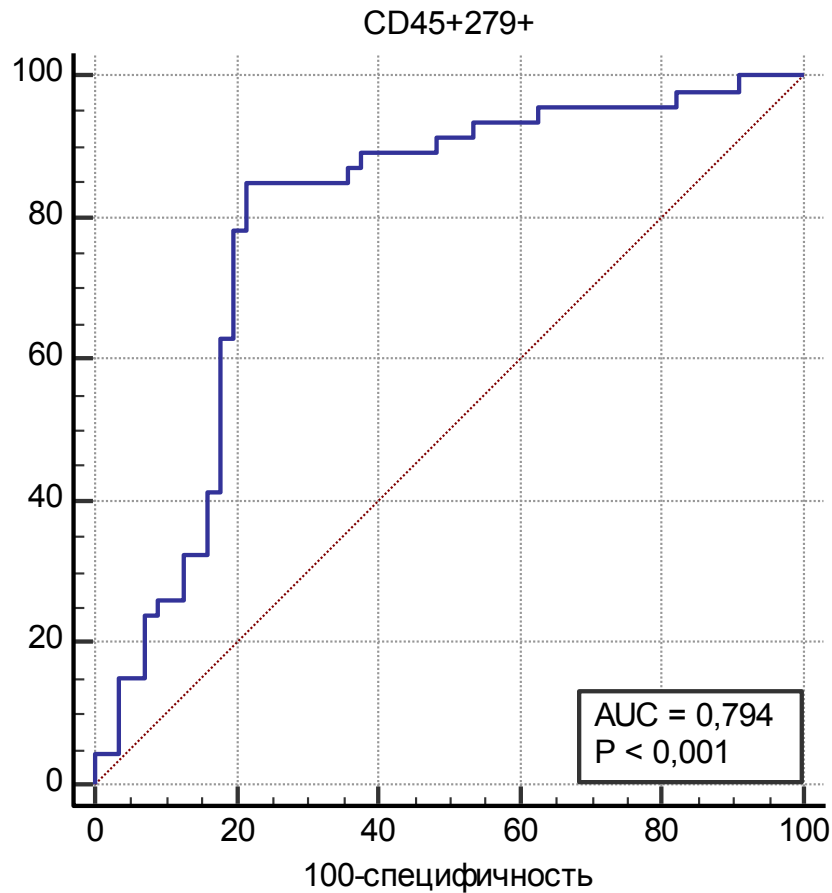


**Рисунок 8.20.** ROC-кривая соотношения диагностической чувствительности (Sensitivity) и специфичности (Specificity) при различных уровнях экспрессии микроРНК 25-3р в отношении прогноза летального исхода в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки

Площадь под ROC кривой соответствовала  $0,814 \pm 0,0444$  (доверительный интервал при 95%  $0,725 - 0,884$ ). ROC кривая статистически значимо отличалась от диагональной опорной линии ( $z=7,07$  при  $p < 0,0001$ ).

Для числа лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы CD279+, по итогам ROC-анализа критическое значение составило 31,9%. При превышении показателя более 31,9% включительно, риск развития летального исхода у больных раком ободочной кишки в первые пять лет после операции приобретал

высокий уровень с диагностической чувствительностью 83,3% и специфичностью 79,1% ( $p < 0,001$ ) (рисунок 8.21).

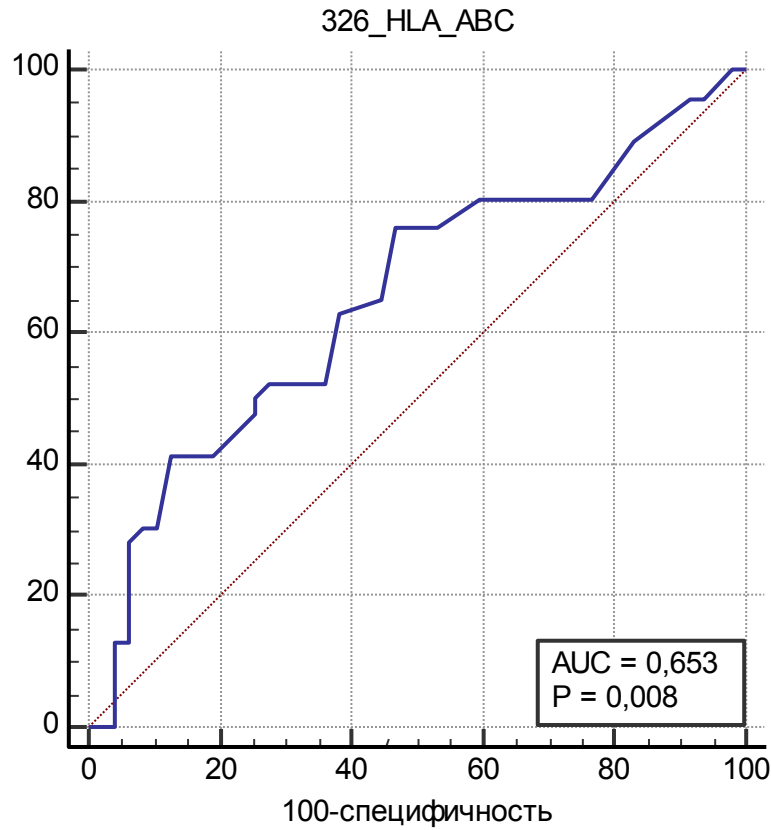


**Рисунок 8.21.** ROC-кривая соотношения диагностической чувствительности (Sensitivity) и специфичности (Specificity) при различном количестве лимфоцитов, экспрессирующих CD279+, в отношении прогноза летального исхода в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки

Площадь под ROC кривой соответствовала  $0,794 \pm 0,0283$  (доверительный интервал при 95%  $0,689 - 0,872$ ). ROC кривая статистически значимо отличалась от диагональной опорной линии ( $z=6,47$  при  $p < 0,001$ ).

Для числа опухолевых клеток с экспрессией рецепторов HLA-ABC по итогам ROC-анализа критическое значение составило 54,2%. При снижении показателя ниже 54,2% включительно, риск развития летального исхода у больных раком ободочной кишки в первые пять лет после операции повышался с диагностической чувствительностью 76,1% и специфичностью 53,2% ( $p=0,008$ ) (рисунок 8.22).





**Рисунок 8.22.** ROC-кривая соотношения диагностической чувствительности (Sensitivity) и специфичности (Specificity) при различном количестве опухолевых клеток с экспрессией рецепторов HLA-ABC в отношении прогноза летального исхода в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки

Площадь под ROC кривой соответствовала  $0,653 \pm 0,0577$  (доверительный интервал при 95% 0,547 - 0,749). ROC кривая статистически значимо отличалась от диагональной опорной линии ( $z=2,65$  при  $p<0,008$ ).

Разработанная модель прогноза летального исхода с учетом иммунологических и генетических факторов у больных раком ободочной кишки имела общий вид для всех логистических регрессионных моделей:

$$P = \frac{\exp(z)}{1 + \exp(z)},$$

где по результатам анализа первичных данных о пациентах рассчитывали коэффициенты и постоянную функции  $Z$ .

Математическое выражение для  $Z$  имело вид:

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

где X1 – экспрессия микроРНК 25-3р;

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.

Таким образом, полное математическое выражение модели прогноза летального исхода у больных раком ободочной кишки имело вид:

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

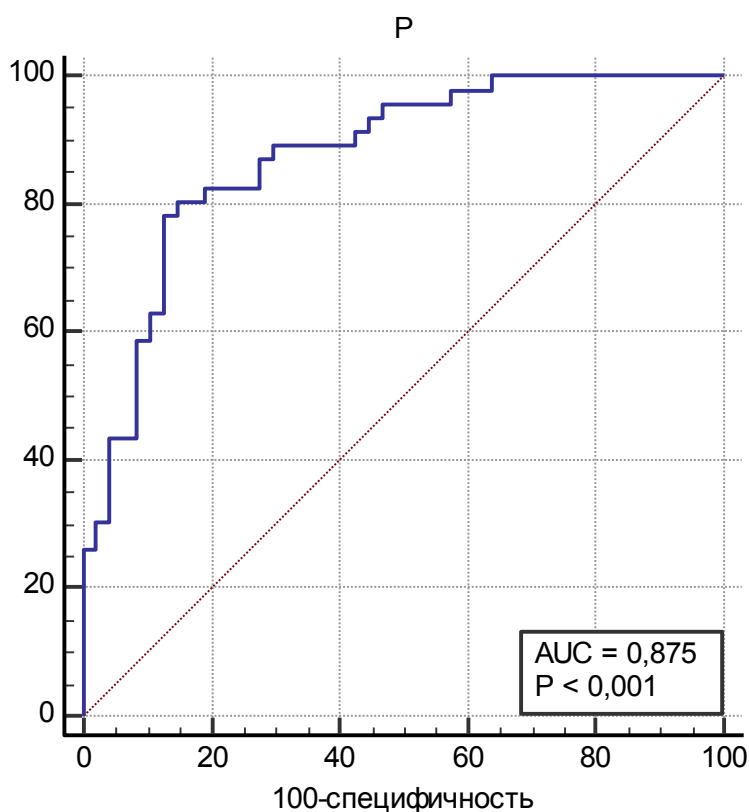
Из представленных в таблице 8.16 результатов видно, что каждый предиктор по отдельности повышал риск летального исхода: усиление экспрессии микроРНК 25-3р в 7,6 раз ( $p<0,0001$ ), повышение числа ЦОК в периферическом токе крови в 5,28 раз ( $p=0,05$ ), гиперэкспрессия CD279+ на лимфоцитах в 4,21 раз, снижение экспрессии HLA-ABC на опухолевых клетках на 87% ( $p=0,043$ ).

**Таблица 8.16** – Величины отношения шансов развития летального исхода у больных раком ободочной кишки в первые пять лет после операции для отдельных предикторов и всей модели в целом с учетом иммунологических и генетических факторов

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

Однако, учет всех четырех предикторов позволил определить прогноз летального исхода больных с большей информативностью: отношение шансов для всей модели составило 41,4 ( $p < 0,0001$ ).

С помощью ROC-анализа было определено критическое значение прогностического критерия  $P$ , при превышении которого риск развития летального исхода повышался. Таким значением оказалась величина, равна 0,56 (таблица 8.17). 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. Диагностическая чувствительность модели была 80,4%, диагностическая специфичность 85,1% ( $p < 0,001$ ) (рисунок 8.23).



**Рисунок 8.23.** ROC-кривая соотношения диагностической чувствительности (Sensitivity) и специфичности (Specificity) при различных значениях коэффициента прогноза летального исхода в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки с учетом иммунологических и генетических факторов

Площадь под ROC кривой соответствовала  $0,875 \pm 0,0358$  (доверительный интервал при 95% 0,794 - 0,935). ROC кривая статистически значимо отличалась от диагональной опорной линии ( $z=10,48$  при  $p < 0,0001$ ).

**Таблица 8.17** – Показатели ROC анализа информативности оценки риска летального исхода в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки с учетом иммунологических и генетических факторов

Criterion	ДЧ	95% CI ДЧ	ДС	95% CI ДС	ОШ
>0,203724	95,65	85,2 - 99,5	53,19	38,1 - 67,9	2,04
>0,204919	93,48	82,1 - 98,6	53,19	38,1 - 67,9	2,00
>0,206813	93,48	82,1 - 98,6	55,32	40,1 - 69,8	2,09
>0,209683	91,30	79,2 - 97,6	55,32	40,1 - 69,8	2,04
>0,210979	91,30	79,2 - 97,6	57,45	42,2 - 71,7	2,15
>0,229807	89,13	76,4 - 96,4	57,45	42,2 - 71,7	2,09
>0,371617	89,13	76,4 - 96,4	70,21	55,1 - 82,7	2,99
>0,387523	86,96	73,7 - 95,1	70,21	55,1 - 82,7	2,92
>0,390707	86,96	73,7 - 95,1	72,34	57,4 - 84,4	3,14
>0,446238	82,61	68,6 - 92,2	72,34	57,4 - 84,4	2,99
>0,536901	82,61	68,6 - 92,2	80,85	66,7 - 90,9	4,31
>0,53774	80,43	66,1 - 90,6	80,85	66,7 - 90,9	4,20
<b>&gt;0,563043</b>	<b>80,43</b>	<b>66,1 - 90,6</b>	<b>85,11</b>	<b>71,7 - 93,8</b>	<b>41,40</b>
>0,57538	78,26	63,6 - 89,1	85,11	71,7 - 93,8	5,25
>0,59483	78,26	63,6 - 89,1	87,23	74,3 - 95,2	6,13
>0,643184	63,04	47,5 - 76,8	87,23	74,3 - 95,2	4,94
>0,652286	63,04	47,5 - 76,8	89,36	76,9 - 96,5	5,93
>0,715273	58,70	43,2 - 73,0	89,36	76,9 - 96,5	5,52
>0,716293	58,70	43,2 - 73,0	91,49	79,6 - 97,6	6,90
>0,807408	43,48	28,9 - 58,9	91,49	79,6 - 97,6	5,11
>0,815977	43,48	28,9 - 58,9	95,74	85,5 - 99,5	10,22
>0,83347	30,43	17,7 - 45,8	95,74	85,5 - 99,5	7,15
>0,83894	30,43	17,7 - 45,8	97,87	88,7 - 99,9	14,30
>0,889996	26,09	14,3 - 41,1	97,87	88,7 - 99,9	12,26
>0,897446	26,09	14,3 - 41,1	100,00	92,5 - 100,0	
>0,995627	0,00	0,0 - 7,7	100,00	92,5 - 100,0	

Примечание: ДЧ – диагностическая чувствительность, 95% CI – доверительный интервал, ДС – диагностическая специфичность, ОШ – отношение шансов. Жирным шрифтом выделено значение и параметры точки cut-off.

### Клинический пример 3.

Больной У., 53 г., поступил в отделение абдоминальной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России с диагнозом рак сигмовидной кишки с жалобами на запоры, примесь крови в кале, похудание, слабость. При поступлении больному выполнена фиброколоноскопия с биопсией, по данным которой выявлен рак сигмовидной кишки на 20 см от ануса. По результатам гистологического исследования биопсийного материала выявлена

умереннодифференцированная аденокарцинома. Установлен диагноз: Рак сигмовидной кишки, T4N1M0, ст.3, гр2.

До оперативного вмешательства больному проведено исследование циркулирующих опухолевых клеток периферической крови, по результатам которого выявлено 10 ЦОК.

После предоперационной подготовки выполнена резекция сигмовидной кишки. Проведено гистологическое исследование операционного материала, по данным которого определена умереннодифференцированная аденокарцинома с прорастанием всех слоев стенки до висцеральной брюшины, метастатическим поражением лимфатических узлов. По результатам иммуногистохимического исследования выявлена экспрессия CD44 опухолевыми клетками 40%.

При ранжировании показателей ЦОК присвоено значение ранга 3, экспрессии CD44 – ранг 1.

Уровень экспрессии микроРНК 25-3р в опухолевой ткани составил 1,16.

Доля лимфоцитов, экспрессирующих CD279+ составила 83,2%, доля опухолевых клеток с иммунофенотипом CD326+HLA-ABC+ - 85,5%.

Был вычислен прогностический коэффициент К, учитывающий ранжирование ЦОК и CD44+.

$$K = \exp(0,526*3 + 1,11*1 - 1,46) / (1 + \exp(0,526*3 + 1,11*1 - 1,46)) = 0,77$$

Значение коэффициент К составило 0,77. Риск развития летального исхода определен как высокий.

Был вычислено значение Р, учитывающее уровень экспрессии микроРНК 25-3р, ранг ЦОК, доли CD279+ лимфоцитов и CD326+HLA-ABC+ опухолевых клеток в ткани опухоли

$$P = \exp(1,58*1,16 + 0,55*3 + 0,04*83,2 - 0,023*85,5 - 4,01) / (1 + \exp(1,58*1,16 + 0,55*3 + 0,04*83,2 - 0,023*85,5 - 4,01)) = 0,63$$

Значение Р составило 0,63. Риск развития летального исхода определен как высокий.

В послеоперационном периоде больному проведено 6 курсов адьювантной ХТ по схеме FOLFOX.

Летальный исход от основного заболевания зафиксирован через 48,8 мес. от начала проведения оперативного вмешательства.

#### **Клинический пример 4.**

Больной К., 39 л., поступил в отделение абдоминальной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России с жалобами на боли в животе, запоры, похудание, слабость. При фиброколоноскопии выявлена опухоль нисходящей ободочной кишки на 52 см от ануса. По результатам гистологического исследования биопсийного материала выявлена умереннодифференцированная аденокарцинома. Установлен диагноз: Рак нисходящего отдела ободочной кишки, T3N1M0, ст.3, гр2.

До оперативного вмешательства больному проведено исследование циркулирующих опухолевых клеток периферической крови, по результатам которого выявлена 1 ЦОК.

После предоперационной подготовки выполнена операция гемиколэктомия слева. Проведено гистологическое исследование операционного материала, по данным которого определена умереннодифференцированная аденокарцинома с инвазией подслизистой, мышечной оболочки, до субсерозной основы, метастатическим поражением лимфатических узлов. По результатам иммуногистохимического исследования выявлена экспрессия CD44 8% опухолевых клеток.

При ранжировании показателей ЦОК присвоено значение ранга 1, экспрессии CD44 – ранг 0.

Уровень экспрессии микроРНК 25-3р в опухолевой ткани составил 1,14.

Доля лимфоцитов, экспрессирующих CD279+ составила 53,0%, доля опухолевых клеток с иммунофенотипом CD326+HLA-ABC+ - 93,1%.

Был вычислен прогностический коэффициент К, учитывающий ранжирование ЦОК и CD44+.

$$K = \exp(0,526*1 + 1,11*0 - 1,46) / (1 + \exp(0,526*1 + 1,11*0 - 1,46)) = 0,28$$

Значение коэффициента К составило 0,28. Риск развития летального исхода определен как низкий.

Было вычислено значение  $P$ , учитывающее уровень экспрессии микроРНК 25-3p, ранг ЦОК, доли CD279+ лимфоцитов и CD326+HLA-ABC+ опухолевых клеток в ткани опухоли

$$P = \exp(1,58 * 1,14 + 0,55 * 1 + 0,04 * 53,0 - 0,023 * 93,1 - 4,01) / (1 + \exp(1,58 * 1,14 + 0,55 * 1 + 0,04 * 53,0 - 0,023 * 93,1 - 4,01)) = 0,13$$

Значение  $P$  составило 0,13. Риск развития летального исхода определен как низкий.

В послеоперационном периоде больному проведено 6 курсов адъювантной ХТ по схеме FOLFOX.

Больной наблюдается в течение 76,4 мес. от начала проведения оперативного вмешательства без признаков прогрессирования основного заболевания.

Таким образом, в работе был обозначен круг прогностически значимых молекулярно-генетических и иммунологических факторов для оценки риска летального исхода у больных раком ободочной кишки. Учет экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток, сигнальных генов и микроРНК, числа ЦОК, показателей локального и системного иммунитета дополнительно к известным клиническим признакам, позволяет расширить систему предикторов стратификации риска летального исхода при раке толстой кишки.

### **8.5. Модели прогноза отдаленного метастазирования и сроков его развития у больных раком ободочной кишки**

При анализе данных больных раком ободочной кишки, у которых в процессе наблюдения диагностирован метастатический процесс пошагово с помощью логистической регрессии были созданы модели по определению риска и сроков данного события после операции.

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 Т-регуляторных клеток в ткани и экспрессии рецепторов HLA-ABC на CD326+ опухолевых

клетках усиливает информативность прогноза развития метастазирования в послеоперационный период.

Далее путем статистической обработки результатов исследования определяли коэффициенты математического выражения, позволяющего рассчитать вероятность развития отдаленных метастазов в первые пять лет после операции ( $P_M$ ).

Математическое выражение имело вид:

$$P_M = \frac{\exp(34,3 \cdot X_1 + 0,28 \cdot X_2 + 0,16 \cdot X_3 - 0,035 \cdot X_4 - 4,4)}{1 + \exp(34,3 \cdot X_1 + 0,28 \cdot X_2 + 0,16 \cdot X_3 - 0,035 \cdot X_4 - 4,4)}$$

где  $P_M$  – коэффициент прогноза развития метастазов;

$X_1$  – экспрессия микроРНК 126а-5р;

$X_2$  – 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;

$X_3$  – число Т регуляторных клеток;

$X_4$  – экспрессия рецепторов HLA-ABC на опухолевых клетках;

-4,4 – постоянная уравнения.

Критерий Хи-квадрат Пирсона составил 12,37 при  $p=0,015$ , что указывало на статистическую значимость и информативность полученного математического выражения для расчета риска метастазирования у больных раком ободочной кишки после операции.

Каждый предиктор по отдельности повышал риск метастазирования: усиление экспрессии микроРНК 126а-5р в 3,5 раз ( $p<0,01$ ), повышение числа ЦОК в периферическом токе крови в 4,3 раза ( $p<0,001$ ), Т-регуляторных клеток в 2,3 раза, снижение экспрессии HLA-ABC на опухолевых клетках на 82% ( $p=0,017$ ) (таблица 8.18).

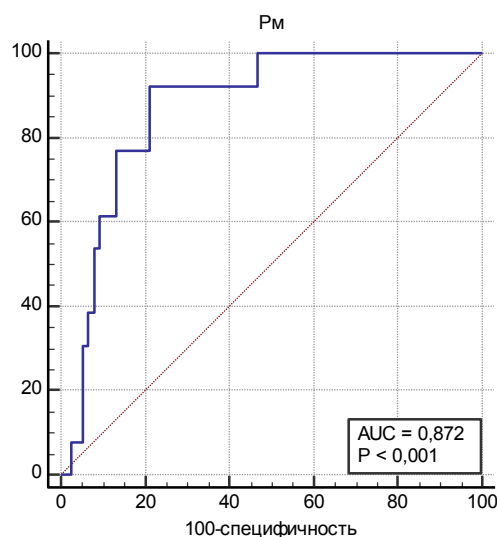


**Таблица 8.18** – Величины отношения шансов развития метастазирования у больных раком ободочной кишки в первые пять лет после операции для отдельных предикторов и всей модели в целом с учетом иммунологических и генетических факторов

Предиктор модели	Отношение шансов	p
Экспрессия микроРНК 126a-5p	3,5	<0,01
Ранг ЦОК	4,3	<0,001
Число Т 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.		

Учет всех четырех предикторов многократно повышал информативность прогноза развития метастазов: отношение шансов для всей модели составило 30,7 (p=0,015).

С помощью ROC-анализа было определено критическое значение прогностического критерия  $P_m$ , при превышении которого риск развития метастатического поражения повышался. Разделительная точка cut-off составила 0,67 (таблица 8.19). 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. Диагностическая чувствительность модели была 89,5%, диагностическая специфичность 78,7% (p<0,001) (рисунок 8.24).



**Рисунок 8.24.** ROC-кривая соотношения диагностической чувствительности (Sensitivity) и специфичности (Specificity) при различных значениях коэффициента прогноза метастазирования в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки с учетом иммунологических и генетических факторов

Площадь под ROC кривой соответствовала  $0,872 \pm 0,0431$  (доверительный интервал при 95% 0,784 - 0,934). ROC кривая статистически значимо отличалась от диагональной опорной линии ( $z=8,62$  при  $p<0,0001$ ).

**Таблица 8.19** – Показатели ROC анализа информативности оценки риска летального исхода в первые пять лет после операции у больных раком ободочной кишки с учетом иммунологических и генетических факторов

Criterion	ДЧ	95% CI ДЧ	ДС	95% CI ДС	ОШ
>0,116067	100,00	75,3 - 100,0	53,33	41,4 - 64,9	2,14
>0,319075	92,31	64,0 - 99,8	53,33	41,4 - 64,9	1,98
>0,425853	92,31	64,0 - 99,8	68,67	67,7 - 87,3	14,33
>0,56031	90,92	46,2 - 95,0	72,86	67,7 - 87,3	23,61
<b>&gt;0,674161</b>	<b>89,50</b>	<b>46,2 - 95,0</b>	<b>78,67</b>	<b>76,8 - 93,4</b>	<b>30,67</b>
>0,694383	81,54	31,6 - 86,1	86,67	76,8 - 93,4	24,62
>0,718641	75,54	31,6 - 86,1	90,67	81,7 - 96,2	16,59
>0,7439206	53,85	25,1 - 80,8	90,67	81,7 - 96,2	15,77
>0,775035	53,85	25,1 - 80,8	92,00	83,4 - 97,0	16,73
>0,79273	38,46	13,9 - 68,4	92,00	83,4 - 97,0	14,81
>0,806039	38,46	13,9 - 68,4	93,33	85,1 - 97,8	5,77
>0,826814	30,77	9,1 - 61,4	93,33	85,1 - 97,8	4,62
>0,876277	30,77	9,1 - 61,4	94,67	86,9 - 98,5	5,77
>0,89271	7,69	0,2 - 36,0	94,67	86,9 - 98,5	1,44
>0,902534	7,69	0,2 - 36,0	97,33	90,7 - 99,7	2,88
>0,925179	0,00	0,0 - 24,7	97,33	90,7 - 99,7	0,00

Примечание: ДЧ – диагностическая чувствительность, 95% CI – доверительный интервал, ДС – диагностическая специфичность, ОШ – отношение шансов. Жирным шрифтом выделено значение и параметры точки cut-off.

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

Математическое выражение динамической модели имело вид:

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

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

ЦОК – число циркулирующих опухолевых клеток в периферическом кровотоке;

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

По критерию F ( $F(2,99)=3,18$ ) разработанная модель имела статистическую значимость  $p=0,045$  относительно предсказательной ценности.

### **Клинический пример 5.**

Больная Х., 56г., поступила в отделение абдоминальной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России с диагнозом рак сигмовидной кишки с жалобами на запоры, примесь крови в кале, похудание. При поступлении больной выполнена фиброколоноскопия с биопсией, выявлен рак сигмовидной кишки. Установлен диагноз: С-г сигмовидной кишки, T4N1M0 ст.3, гр2.

До оперативного вмешательства больной проведено исследование циркулирующих опухолевых клеток периферической крови, по результатам которого выявлено 10 ЦОК.

После предоперационной подготовки выполнена операция: резекция сигмовидной кишки, лимфодиссекция. Гистологический анализ - G2 аденокарцинома с инвазией в клетчатку, метастатическим поражением лимфатических узлов.

Послеоперационный период протекал гладко.

Уровень экспрессии микроРНК 126а-5р в опухолевой ткани составил 0,15.

При ранжировании ЦОК присвоено значение ранга 3.

Доля Treg лимфоцитов составила 5,5%, доля опухолевых клеток с иммунофенотипом CD326+HLA-ABC+ - 15,6%.

По результатам иммуногистохимического исследования выявлена экспрессия ZEB1 опухолевыми клетками 70%.

Был вычислен коэффициент  $R_m$ , учитывающий уровень экспрессии микроРНК-126а-5р, ранжированного числа ЦОК в периферической крови, числа

T-регуляторных клеток в ткани и экспрессии рецепторов HLA-ABC на CD326+ опухолевых клетках

$$P = \exp(34,3*0,15 + 0,28*3 + 0,16*5,5 - 0,035*15,6 - 4,4) / (1 + \exp(34,3*0,15 + 0,28*3 + 0,16*5,5 - 0,035*15,6 - 4,4)) = 0,872$$

Значение коэффициент  $R_m$  составило 0,872. Риск развития отдаленного метастатического поражения в послеоперационном периоде определен как высокий.

В дальнейшем больная получала курсы ХТ. При динамическом наблюдении при УЗИ и СРКТ – контроле выявлено метастатическое поражение печени через 12 месяцев после оперативного лечения.

Полученные клинические данные подтверждены результатами математического моделирования, где по величине экспрессии маркера эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1 на опухолевых клетках и числу ЦОК в периферическом кровотоке могут быть определены вероятные сроки метастазирования.

Математическое выражение динамической модели имело вид:

$$T = -0,31*10 - 0,42*70 + 43,08 = 10,58 \text{ мес.}$$

Для данной больной сроки появления новых метастазов (мес.) в динамике наблюдения после операции составили 10,58 мес.

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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогнозирование течения онкологических заболеваний и разработка персонализированных подходов к лечению является актуальной научной и клинической проблемой.

Среди факторов оценки индивидуального прогноза выделяют: а) характеризующие биологические свойства опухоли (генетические и эпигенетические особенности, экспрессия различных рецепторов, обуславливающих ее гетерогенность, локализация и размеры первичного очага, длительность заболевания до лечения, состояние окружающих опухоль тканей, клинико-анатомическую форму и темпы роста опухоли, поражение регионарных лимфоузлов); б) связанные с особенностями организма больного (пол, возраст, наследственность, сопутствующая патология, иммунный и гормональный статус, этническая принадлежность); в) обусловленные методами лечения (объем оперативных вмешательств, комбинированные и комплексные методы лечения, их периодичность и последовательность).

Прорывные открытия, сделанные в последние десятилетия в области молекулярной биологии и генетики, позволили проводить более тщательное исследование как самой опухоли, так и регуляторных систем организма, в ходе взаимодействия между которыми и определяется исход заболевания. Локальные условия представляются важным аспектом канцерогенеза и опухолевой прогрессии. В микроокружении опухолей развиваются процессы, способствующие их росту: гипоксия, иммуносупрессия, воспалительные реакции, результатом которых является неоангиогенез и повышение проницаемости сосудов, изменение внеклеточного матрикса, что облегчает метастазирование опухолевых клеток, претерпевающих ЭМП. Системный характер опухолевого процесса определяется миграцией таких клеток по кровеносным и лимфатическим сосудам, формированием метастатических ниш, иммунологическими и метаболическими нарушениями и дисфункцией различных органов при развитии метастазов. Важнейшую роль в метастатическом каскаде играют тесно

взаимосвязанные ОСК и ЦОК, а также иммунологическое микроокружение опухоли (Grillet F. et al., 2017; Atreya I. et al., 2019; Wang X. et al., 2020; Hervieu C. et al., 2021; Златник Е.Ю. и соавт., 2018; Златник Е.Ю. и соавт., 2020).

Диагностика и лечение колоректального рака продолжает оставаться одной из наиболее актуальных проблем современной онкологии, поскольку заболеваемость и смертность, связанная с ним, продолжает нарастать во всем мире (Bray F. et al., 2018; Siegel R.L. et al., 2019; Akimoto N. et al., 2021; Sung H. et al., 2021; Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова В.В., 2020). Прогнозирование течения КРР в основном зависит от TNM стадии, гистопатологических критериев 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. По современным представлениям гетерогенность КРР не сводится к расположению опухоли в кишечнике и различной степени дифференцировки ее клеток, а связана с генетическими и эпигенетическими особенностями, активностью сигнальных путей, лимфоцитарной инфильтрацией, на основании чего выделены молекулярные подтипы с разным прогнозом и требующие различного лечения, включая таргетные препараты и иммунотерапию. Во всем мире исследователи уделяют большое внимание изучению локального иммунитета при КРР, учитывая особенности толстой кишки как органа с наибольшей микробной обсемененностью и присутствием широкого спектра антигенов, а также уровням ОСК в опухоли и ЦОК в крови как значимым факторам прогноза. Однако только в немногих работах делаются попытки обобщения и установления взаимосвязей между процессами, характеризуемыми этими показателями и оценки их вклада в прогноз заболевания (Xu F., 2018; Leone K. et al., 2018; Picard E. et al., 2020; Lin C.C. et al., 2020; Zhong X. et al., 2020).

В связи с этим нами была поставлена **цель**: разработать подход к прогнозированию течения рака ободочной кишки на основе комплексного анализа

клеточных и молекулярных характеристик опухолевых клеток и их микроокружения.

Нами было проведено исследование профиля транскрипционной активности микро-РНК и их генов мишеней в опухолевой ткани толстой кишки, уровня циркулирующих опухолевых клеток крови и профиля транскрипционной активности микроРНК изолированных ЦОК, экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток и эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевой ткани, параметров системного и локального иммунитета, рассматриваемых в качестве микроокружения для ЦОК и ОСК соответственно, проведен биоинформационный анализ участия микроРНК в регуляции ЭМП и стволовклеточного опухолевого потенциала, что послужило основой разработки новых прогностических алгоритмов течения заболевания и риска развития неблагоприятных исходов заболевания, с учетом которых могут быть разработаны подходы к персонализированному лечению больных.

Работа выполнена на материале, полученном от 351 больного раком ободочной кишки II стадии заболевания (T3-4N0M0) с наличием неблагоприятных факторов прогноза (низкая степень дифференцировки, лимфоваскулярная/перинеуральная 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. Материалом исследования являлись: периферическая кровь больных, парафиновые блоки опухолевой ткани, свежемороженая опухолевая и нормальная ткани толстой кишки, изолированные циркулирующие опухолевые клетки. Лечение больных проводилось в соответствии со стандартами, больные II-III стадий после проведения оперативного вмешательства получали адъювантную химиотерапию по схеме FOLFOX, больные IV стадии с резектабельными метастазами в печень, подвергались одновременному оперативному вмешательству по удалению первичной опухоли и метастаза в печень в объеме резекции R0 с последующими курсами ХТ по схеме FOLFOX.

В работе использовали современные иммунологические, иммуногистохимические методы исследования, метод детекции и сепарации ЦОК, молекулярно-генетические методы исследования; с использованием современных алгоритмов провели биоинформационный анализ данных множественного параллельного секвенирования микроРНК и поиск генов-мишеней для исследуемых микроРНК; оценивали клиничко-патологические характеристики больных; для прогноза неблагоприятных событий после операции использовали метод логистической регрессии, анализ бессобытийной выживаемости пациентов проводили с использованием метода множительной оценки Каплана-Майера, для расчета прогностических алгоритмов применяли статистические методы: регрессионный анализ Кокса, логистической регрессии с пошаговым включением переменных в модель.

Среди опухолей больных исследованной нами когорты выявлено преобладание умеренно дифференцированных (G2) над высоко (G1)- и низкодифференцированными опухолями (G3): 55,3, 15,4, и 29,3% соответственно. Распределение по уровню инвазии опухоли показало преобладание опухолей, прорастающих все слои стенки кишки с распространением в жировую клетчатку без поражения соседних органов (T3) над опухолями с уровнем инвазии T1-T2: 57,3 и 15,1% случаев соответственно. Наличие гистологических факторов неблагоприятного прогноза в виде лимфоваскулярной и периневральной инвазии в опухоли выявлено в 89,7% и 83,8% случаев соответственно. В исследуемой когорте преобладали больные, в опухолях которых отмечена умеренная степень лимфоцитарной инфильтрации, что составило 48%, тогда как больных со слабой и выраженной степенью лимфоцитарной инфильтрации было 33,0 и 19,0% соответственно.

Исходя из данных современной литературы, 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).



Кроме основных характеристик опухоли, определяющих ее метастатический потенциал, таких как локализация, гистологическое строение, пролиферативная активность, иммунофенотип, молекулярно-биологические особенности, важными являются и те, которые влияют на возможность циркуляции опухолевых клеток в кровотоке, а это прежде всего факторы иммунной системы.

В литературе рассматривается возможность того, что метастазирование происходит на ранних (доклинических) этапах развития опухоли, однако, клетки, колонизирующие метастатические ниши, способны долго находиться в дормантном состоянии и активизируются при различных, не до конца понятных воздействиях, вероятно, различных для разных опухолей и больных. В прошлом были предложены различные модели метастазирования, от предположения об общем клоне происхождения как первичной опухоли, так и метастазов, до гипотез полностью независимого генеза метастазирования и первичной опухоли (Allgayer H. et al., 2020). В большинстве случаев солидного рака, включая колоректальный рак, диссеминированные опухолевые клетки в крови или костном мозге можно обнаружить даже на ранних стадиях развития первичной опухоли (Sai B., Xiang J., 2018).

Большинство ЦОК погибает в течение нескольких часов, и лишь небольшая часть обладает способностью инициировать опухоль (Toyoshima K. et al., 2015). Наличие ЦОК в крови связано с агрессивным течением КРР (Tan Y., Wu H., 2018), вследствие чего в некоторых исследованиях данный показатель рассматривается как многообещающий неинвазивный диагностический и прогностический маркер при метастатическом КРР (Bork U. et al., 2015; Tsai W.S. et al., 2016). Другие авторы, напротив, предполагают, что диссеминация опухолевых клеток происходит транзиторно (Hinz S. et al., 2015).

Прогностическая и предиктивная ценность ЦОК была показана не только для метастатического, но и для неметастатического КРР (Seeberg L.T. et al., 2015; Bork U. et al., 2015). Появляется все больше свидетельств гетерогенности ЦОК, включающих разнообразный пул клеток: эпителиальные опухолевые клетки,

клетки, подвергающиеся ЭМП, и опухолевые стволовые клетки, которые могут циркулировать по отдельности или группами (Giuliano M. et al., 2018). В исследованиях показано, что раннее обнаружение ЦОК может отражать метастатический потенциал опухоли и помогать в мониторинге лечения пациентов с локализованными и генерализованными формами КРР (Chemi F. et al., 2021).

Количество ЦОК в системе кровообращения напрямую связано с риском метастазирования и стадией развития опухоли (Maas M. et al., 2017) и обратно коррелирует с ответом на противоопухолевую терапию (Agelaki S. et al., 2015). Корреляция наличия и уровней ЦОК с сосудистой/периневральной инвазией, степенью дифференцировки опухоли все еще остается неопределенной, результаты различных авторов разноречивы (Sastre J. et al., 2008; Cheng B. et al., 2019; Muşină A.M. et al., 2021).

В некоторых работах рассматривается возможная связь ЦОК со стволовыми клетками опухоли (Pantel K. et al., 2009). Известно, что опухолевые стволовые клетки, являются минорной самообновляющейся популяцией, которая необходима для инициации и поддержания роста новообразования. ОСК представляют собой «глубокий резерв» опухоли в состоянии покоя (G0) и, как следствие, являются наиболее радио- и химиорезистентной клеточной популяцией (Clarke M.F., Fuller M., 2006). Циркулирующие опухолевые клетки, имеющие признаки ОСК, были обнаружены у больных КРР, что подтверждает гипотезу о тесной связи ОСК и процессов метастазирования (Grillet F. et al., 2017).

В результате проведенного нами исследования по определению наличия ЦОК в крови при различных клинико-морфологических характеристиках больных и их опухолей были выявлены статистически значимые различия, определяющие инвазивный потенциал опухолевых клеток. Выявлена связь количества ЦОК в периферической крови и стадии заболевания ( $p \leq 0,05$ ); так, при увеличении стадии заболевания отмечено повышение частоты выявления ЦОК от II к IV стадиям и повышение доли больных с уровнем ЦОК выше 3. Показано сопряжение наличия ЦОК и их количества с уровнем прорастания опухоли в стенку кишки и

подлежащие ткани, а также с имеющимся метастатическим поражением регионарных лимфоузлов и отдаленных органов ( $p \leq 0,05$ ). Умеренная и низкая степени дифференцировки опухоли и высокая степень ее злокачественности, а также, наличие лимфоваскулярной инвазии и слабой лимфоцитарной инфильтрации опухоли ассоциировано с наличием ЦОК в периферической крови в количестве выше 3-х клеток ( $p \leq 0,05$ ). Локализация опухолевого процесса в различных отделах толстой кишки, пол и возраст больных, а также наличие периневральной инвазии и гистологическая структура опухоли не продемонстрировали значимых различий по уровню ЦОК.

Нами было установлено, что обнаружение ЦОК в периферической крови чаще наблюдается при наличии активирующих мутаций в гене *KRAS* (Кит О.И. и соавт., 2016), причем у таких больных прогностически значимый для прогрессирования процесса уровень ЦОК был ниже, чем у больных без такой мутации (патент RU 2613142).

Наши результаты в целом соответствуют данным мировой литературы о том, с какими клинико-морфологическими показателями связано наличие ЦОК у больных КРР. В большинстве источников, включая метаанализы, отмечена прямая связь наличия ЦОК с распространенностью опухоли, с инвазией, с низкой степенью дифференцировки, и обратная – с общей и бессобытийной выживаемостью больных (Rahbari N.N. et al., 2010; Tsai W.S. et al., 2016; Tan Y. et al., 2018; Pan R.J. et al., 2021). В некоторых работах подчеркиваются различия между значением ЦОК у больных ранних (I-II) и распространенных (III-IV) стадий (Bork U. et al., 2015; Rothé F. et al., 2019). Имеющиеся в литературе противоречия в оценке их дискриминантного уровня во многом связаны с особенностями опухолей и выборкой больных, а также с разными методами определения (Veugne L. et al., 2021). Отсутствие ЦОК в ряде случаев при наличии генерализованного процесса может быть связано с отсутствием или слабой экспрессией на их мембране эпителиального маркера EpCam (CD326), вследствие чего они не регистрируются системой CellSearch. Прогностическая значимость EpCam+ и EpCam- ЦОК рассмотрена в некоторых работах, при этом на

немногочисленных группах больных показано, что при раке легкого с выживаемостью были связаны только EpCam+ (de Wit S. et al., 2015); позже теми же авторами были получены сходные результаты по РМЖ и предстательной железы.

Разные методы демонстрируют разноречивые результаты, в литературе ставится вопрос о наиболее адекватном из них. Среди известных в настоящее время технология CellSearch, проточная цитометрия, иммуноцитохимия, ПЦР в реальном времени, масс-спектрометрия (Jaeger B.A. et al., 2014; Abouleila Y. et al., 2019; Muşinǎ A.M. et al., 2021).

В нашей стране данное исследование является одним из немногих, анализирующих ЦОК при раке ободочной кишки, и единственным, оценивающим их уровень не только в связи с клинико-патологическими характеристиками больных, но и в контексте изменений системного и локального иммунитета, молекулярных особенностей опухолевых клеток, включая ОСК, и обобщающих полученные результаты в виде прогностических алгоритмов.

Поскольку дальнейшая судьба ЦОК и во многом способность их к выживанию зависит от их окружения в кровотоке, нами методами проточной цитометрии и ИФА были исследованы иммунологические факторы у больных с наличием и отсутствием ЦОК как вне зависимости от распространенности рака ободочной кишки, так и с ее учетом. Исходя из важности процессов миграции и ЭМП для превращения тканевых опухолевых клеток в циркулирующие, мы также провели исследование ряда факторов локального иммунитета и некоторых характеристик опухолевых клеток, потенциально способных влиять на эти процессы.

Факторы врожденного и адаптивного иммунитета считаются мощным оружием иммунной системы против ЦОК и, действительно, только единичные из опухолевых клеток существуют в крови достаточно продолжительное для их регистрации время, хотя, опухоль выбрасывает в кровоток миллионы клеток ежедневно (Chang Y.S. et al., 2000). В отношении нейтрофилов и отчасти моноцитов крови в литературе сложилось представление об их ЦОК-

стимулирующей роли, опосредованной через формирование защитного комплекса с ними (Heeke S. et al., 2019), нетоз (Vorobjeva N.V., Chernyak B.V., 2020; Azzouz D. et al., 2021), секрецию колониестимулирующих факторов (G-CSF) и хемокинов (IL-8), участвующих в метастазировании опухоли (Shojaei F. et al., 2009), например, путем усиления экспрессии рецепторов адгезии (интегринов и селектина) на эндотелии капилляров, что способствует экстравазации ЦОК в органах-мишенях (Spicer J.D. et al., 2012). В отличие от них, НК-клетки могут уничтожать ЦОК в крови еще до их экстравазации, предотвращая таким образом метастазирование, при этом, как показано в экспериментальных исследованиях, наиболее эффективным является прямой перфорин-зависимый механизм, с помощью которого лизируется до 80% ЦОК, что выше, чем в результате непрямого пути, опосредованного через апоптоз-индуцирующие факторы (Brodbeck T. et al., 2014), а дефект системы НК-клеток вызывает опухолевую прогрессию: например, у мышей-опухоленосителей в печени, богатой НК-клетками, их TRAIL-опосредованный апоптоз, способствует ее метастатическому поражению (Gkountela S. et al., 2019).

При проведении клинических исследований установлено повышение количества НК-лимфоцитов в крови больных метастатическими опухолями (КРР, РМЖ, предстательной железы) по сравнению с донорами (Santos M.F. et al., 2014), однако для распространенного опухолевого процесса характерна низкая активность НК-клеток (López-Soto A. et al., 2017). У больных метастатическим РМЖ обнаружение ЦОК в количестве выше 5 в 7,5 мл крови сопровождалось снижением результатов цитолитического теста по сравнению с больными, у которых уровень ЦОК был ниже 5, что обратно коррелировало с их бессобытийной выживаемостью (Green T.L. et al., 2013; Santos M.F. et al., 2014). Таким образом, метастазирование, в т.ч., подтвержденное присутствием ЦОК, связано с угнетением функциональной активности НК-клеток. При колоректальном раке также описана обратная взаимосвязь между уровнем ЦОК и цитолитической активностью НК-клеток (Burz C. et al., 2018).

ЦОК инактивируют NK-клетки путем вовлечения тромбоцитов, взаимодействующих с ними (Zhong X. et al., 2020) с образованием агрегатов, в ходе чего тромбоциты выделяют цитокины, включая TGF- $\beta$ , вызывающий апоптоз иммунокомпетентных клеток путем угнетения экспрессии на них Bcl-2, а также противодействующий развитию перфорин-зависимой цитотоксичности и секреции интерферона- $\gamma$  NK-клетками (Leblanc R., Reugchaud O., 2016). Более того, при взаимодействии тромбоцитов с ЦОК может происходить перенос тромбоцитарного MHC-I на мембрану опухолевых клеток, что также препятствует NK-клеточному цитолизу (Plaske T. et al., 2012).

Нами был проведен анализ уровней NK-клеток и некоторых их субпопуляций, считающихся функционально различными, у больных раком ободочной кишки II-IV стадий при отсутствии ЦОК и их различном уровне (1-3 ЦОК и более 3-х ЦОК).

Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшее количество отличий отмечено при разделении больных по наличию/отсутствию ЦОК вне зависимости от стадии. Наличие ЦОК характеризуется высокими уровнями NKT-клеток при снижении содержания NK-клеток, а среди последних - снижением CD16<sup>+</sup>56dim при возрастании CD16dim56bright клеток. При разделении по стадиям с учетом ЦОК максимальное количество отличий наблюдается у больных IV стадии. Они связаны с вышеописанным перераспределением субпопуляций натуральных киллеров, а также снижением количества перфорин-содержащих клеток при нарастании уровня ЦОК.

Снижение уровней NK- при высоком содержании NKT-клеток у больных с наличием ЦОК позволяет расценить такую картину как негативную в плане влияния на опухолевый рост. Хотя NKT-клетки являются немногочисленной субпопуляцией лимфоцитов, она, как и многие другие, гетерогенна. Описаны иммуносупрессивные CD4<sup>+</sup> NKT-клеток, способные подавлять функцию клеток-эффекторов за счет продукции IL-13 и TGF- $\beta$  (Terabe M. et al., 2000) и тем самым способствовать поляризации Th0 в Th2 тип, антагонистический для 1 типа Т-хелперов, реализующих клеточные иммунные реакции, включая реакции

противоопухолевого иммунитета. Кроме того, описаны иммуносупрессивные свойства CD8<sup>+</sup> NKT-клеток (Zhou L. et al., 2008). Показано, что у больных раком почки количество активированных T-regs имеет тесную положительную взаимосвязь с уровнем активированных NKT-клеток (CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>), что характеризует однонаправленную динамику содержания данных субпопуляций на фоне опухолевого роста (Борисов А.Г., Савченко А.А., Кудрявцев И.В. и соавт., 2017). Имеются сведения о более высоком уровне NKT-клеток в образцах тканей недифференцированных опухолей пищевода по сравнению с высокодифференцированными (Кит О.И. и соавт., 2015), что, возможно, связано с преобладанием среди них вышеназванных субпопуляций. Совокупность этих данных предполагает отрицательную роль, по крайней мере, части NKT-клеток в микроокружении различных злокачественных опухолей. При исследовании взаимосвязи иммунного статуса больных раком ободочной кишки и результатов их лечения была установлена негативная корреляция уровня NKT-клеток с бессобытийной выживаемостью больных, при этом подробный анализ T-клеточного и NK-клеточного звена не выявил значимых различий в зависимости от стадии КРР и характеристик опухоли (Krijgsman D. et al., 2019). В свете изложенного полученные нами различия по уровням NK- и NKT-клеток позволяют оценить их как более неблагоприятные у больных с наличием ЦОК.

Для обследованных нами больных раком ободочной кишки всех стадий при наличии ЦОК характерен более высокий уровень CD16<sup>dim</sup>56<sup>bright</sup> NK-клеток и более низкое соотношение CD16<sup>+</sup>56<sup>dim</sup>/CD16<sup>dim</sup>56<sup>bright</sup> клеток, что свидетельствует о снижении антитело-зависимой и перфорин/гранзим-зависимой цитотоксичности под действием ЦОК, которые, по-видимому, способны подавлять функциональную активность натуральных киллеров, облегчая гематогенное метастазирование опухоли. Имеющееся в литературе представление о незрелости CD16<sup>dim</sup>56<sup>bright</sup> клеток (Michel T. et al., 2016; Stabile H. et al., 2017; Stabile H. et al., 2018) и повышение их уровня в присутствии ЦОК, предполагает возможность такого механизма. При исследовании микроокружения гепатоцеллюлярной карциномы опухоль-инфильтрирующие NK-клетки чаще

имеют CD56bright фенотип, который формируется при взаимодействии с PD-L1 в условиях гипоксии (Albini A. et al., 2018). Кроме того, они содержат мало STAT5A и STAT5B, продуцируют высокие количества TGF $\beta$ 1, стимулирующего выработку ими VEGF (De Palma M. et al., 2017) и таким образом вместо проявления цитотоксической активности участвуют в формировании проонкогенного микроокружения. Мы не исключаем, что и в нашем исследовании CD56bright NK-клетки крови могут обладать подобными свойствами с учетом их высокого содержания в условиях циркуляции опухолевых клеток.

Наиболее интересные данные получены нами по уровням CD335+ (NKp46) клеток, которые различались в зависимости от стадии рака ободочной кишки: при II стадии они преобладали у больных с наличием ЦОК, а при местно-распространенном и генерализованном процессе – при отсутствии ЦОК. Данный рецептор присутствует на зрелых NK-клетках, его экспрессия нарастает по мере их созревания, доказано его участие в распознавании опухолевых клеток (Hadad U. et al., 2015). По всей вероятности, полученные нами различия в зависимости от наличия ЦОК и распространенности опухолевого процесса, демонстрируют большую сохранность системы NK при II стадии, что позволяет ей реагировать на наличие в крови ЦОК повышением функционально активной субпопуляции, а по мере нарастания стадии опухоли резервы системы истощаются.

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 кислородного взрыва в гранулоцитах и моноцитах после стимуляции fMLF. Вне зависимости от стадии у больных с наличием ЦОК по сравнению с отсутствием ЦОК наблюдались сходные изменения: повышение кислородного взрыва в моноцитах и гранулоцитах, стимулированных fMLF; тем не менее, отмечено повышение процента фагоцитирующих моноцитов, что может говорить об активации врожденного иммунитета. Раздельный анализ показателей фагоцитоза по стадиям рака ободочной кишки выявил, что наличие ЦОК у больных сопровождается



стимуляцией фагоцитоза при локализованном процессе и угнетением при генерализованном, однако, и в последнем случае сохраняется и даже нарастает способность гранулоцитов и моноцитов генерировать активные формы кислорода.

Обращает на себя внимание установленное нами во многих случаях повышение ответа нейтрофилов и моноцитов на fMLF в тесте Phagoburst. fMLF, один из N-формилпептидов, является продуктом метаболизма, протекающего в митохондриях и в клетках бактерий (*E. coli*). Хотя он и обозначен в наборах для оценки активности фагоцитоза как низкостимулирующий агент генерации АФК вследствие слабого влияния на сборку центрального фермента кислород-зависимых цитолитических реакций НАДФН-оксидазы, он известен как мощный хемоаттрактант нейтрофилов, стимулятор их миграции в очаг воспаления, продукции цитокинов, и других видов активности гранулоцитов (He H.Q., Ye R.D., 2017). Описано его значение в развитии воспалительных заболеваний кишечника; кроме того, формил-пептидные рецепторы (FPR), являются одним из классов паттерн-распознающих рецепторов для PAMP и DAMP, и через последние fMLF может оказывать стимулирующее действие на опухолевый рост (Li L. et al., 2016; Weiß E., Kretschmer D., 2018). Такое действие отмечено у одного из агонистов FPR2 (антимикробного белка LL-37), сходного с fMLF по происхождению и спектру биологической активности (Coffelt S.B. et al., 2009). Известны проонкогенные свойства многих провоспалительных факторов, включая LL-37 (Chen X. et al., 2018), кроме того, его ростостимулирующая активность может быть опосредована стимуляцией миграции нейтрофилов, проонкогенная роль которых описана в литературе (Szczerba V.M. et al., 2019). Продукция АФК, наряду с формированием внеклеточных нейтрофильных ловушек, моделированием внеклеточного матрикса, угнетением функций T-эффекторов, стимуляцией неоангиогенеза (Coffelt S.B. et al., 2016; Burz C. et al., 2018; Guo B. et al., 2019) являются механизмами, опосредующими участие нейтрофилов, обладающих высокой пластичностью и многофункциональностью, в процессе метастазирования опухоли (Mollinedo F., 2019). Как было показано на экспериментальных моделях, у мышей-опухоленосителей с кластерами,

состоящими из ЦОК и нейтрофилов, метастазирование происходило быстрее, чем при наличии ЦОК без нейтрофилов, что предполагает роль последних в этом процессе, реализуемую не только через провоспалительные цитокины, но и продукцию АФК (Szczerba V.M. et al., 2019). Авторы считают, что при канцерогенезе КРР перекись водорода гранулоцитарного происхождения вызывает мутации ДНК в клетках эпителия и стимулирует инвазивный рост (Canli Ö. et al., 2017). Кроме того, продукция АФК клетками миелоидного ряда может стимулировать опухолевый рост паракринно.

В клинических исследованиях было показано, что у больных метастатическим РМЖ присутствие ЦОК и величина моноцитарно-лимфоцитарного соотношения являются предикторами общей выживаемости. При ТНР найдены корреляции ЦОК с количеством моноцитов крови, при HER2+ опухолях – с количеством нейтрофилов, а при ER+ опухолях их наличие или отсутствие не было связано с количественными показателями белой крови (De Giorgi U. et al., 2019). На основании полученных результатов авторы предлагают использовать коэффициенты моноциты/лимфоциты и нейтрофилы/лимфоциты наряду с уровнем ЦОК в качестве прогностических (Miklikova S. et al., 2020).

Описана значимость совместного определения ЦОК и моноцитов в качестве биомаркера КРР (Hamm A. et al., 2016; Liu Q. et al., 2016). На способности вызывать быстрый апоптоз моноцитов основано действие химиопрепарата трабектедина (Germano G. et al., 2018), что предполагает их проонкогенные свойства; более детальное исследование взаимоотношений противоопухолевых лекарственных средств и факторов врожденного иммунитета, в частности моноцитарно-макрофагального звена, может привести к развитию новых подходов к иммунотерапии онкологических заболеваний (Mantovani A., Allavena P., 2015).

Итак, полученные нами данные свидетельствуют о том, 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.

Различия показателей адаптивного иммунитета в зависимости от стадии КРР, приведенные в нашем исследовании, вполне объяснимы и в целом соответствуют описанным в литературе (Абакушина Е.В. и соавт., 2015), однако, учет наличия/отсутствия и количественного содержания ЦОК вносит дополнительные детали. Так, при II стадии учет уровня ЦОК позволил выявить снижение содержания CD4+CD25+ клеток и повышение CD8+CD25+ клеток в образцах, содержащих ЦОК в количестве выше 3. Наибольшее количество различий в зависимости от уровня ЦОК обнаружено при III стадии рака ободочной кишки: уровень ЦОК выше 3 сопровождается снижением содержания Т-хелперов при повышении их активационных субпопуляций; при этом отмечено увеличение уровня цитотоксических Т-лимфоцитов с нарастанием экспрессии маркера ранней (CD25) и снижением - маркеров поздней активации (HLA-DR, CD95). Высокий уровень ЦОК при IV стадии характеризуется нарастанием Т-цитотоксических клеток с маркером ранней активации CD69.

Повышение уровня CD8+CD25+ клеток отмечено при II и III стадиях, причем при II их возрастание наступало только при наличии ЦОК выше 3, а при III уже при уровне ЦОК 1-3, что может свидетельствовать о некоторой активации Т-звена, хотя эта субпопуляция и остается минорной по сравнению с другими активационными (Onda M. et al., 2019). Судя по данным литературы, эти клетки относятся к регуляторным. В работе Chakraborty S. и соавт. описана и подробно охарактеризована на экспериментальных моделях опухолевого микроокружения субпопуляция CD8+CD25+CD127- Т-клеток, имеющая ряд фенотипических и функциональных отличий от FOXP3+CD8+ Tregs (Chakraborty S. et al., 2018). Повышение количества CD8+CD25+ при наличии высокого уровня ЦОК у наших больных II и III стадий может означать стимуляцию у таких больных регуляторных лимфоцитов CD8+ субпопуляции на фоне снижения уровня CD4+CD25+, наблюдаемого только при II стадии. При этом нами не было установлено различий ни между стадиями заболевания, ни между больными с

отсутствием или наличием ЦОК по такому часто исследуемому параметру как процент Tregs с фенотипом CD4+CD25+CD127dim/-. В литературе нередко указывается на их высокие уровни как на маркеры неблагоприятного прогноза при некоторых опухолях, тем не менее, эти данные неоднозначны. Так, не было установлено взаимосвязи между уровнями циркулирующих Tregs и ЦОК при метастатическом РМЖ (Stanzer S. et al., 2007), хотя при воспалительном РМЖ прямая связь между этими показателями была выявлена (Mego M. et al., 2016), как и при НМРЛ (Ye L. et al., 2017). При гепатоцеллюлярной карциноме показана взаимосвязь EpCam+ ЦОК с уровнем Tregs (Zhou Y. et al., 2016). В исследовании, проведенном нами ранее, однако, не было установлено взаимосвязи Tregs с уровнем ЦОК при III и IV стадиях НМРЛ (Златник Е.Ю. и др., 2017). Кроме того, сравнительное изучение циркулирующих и локальных Tregs, проведенное при меланоме кожи, показало нарастание по мере увеличения распространенности опухоли только локальных уровней этих лимфоцитов (Златник Е.Ю. и др., 2018). В данной работе это нашло подтверждение при изучении уровня опухолеинфильтрирующих Tregs, который оказался прогностически значимым и вошел в один из предлагаемых нами прогностических алгоритмов.

При анализе по стадиям нам удалось отметить ряд особенностей, касающихся Т-клеток памяти и активированных Т-лимфоцитов.

Т-лимфоциты памяти (Тm), несомненно, играют важнейшую роль при онкологических заболеваниях. Известны их различные субпопуляции, среди которых особое внимание привлекают Тcm (центральные клетки памяти) и Тем (эффektorные клетки памяти), относящиеся к CD8+, а также резидентные клетки (Тrm). В литературе неоднократно описано нарастание CD4m+ и CD8m+ клеток при злокачественных новообразованиях как в крови, так и в опухолевой ткани, однако, по-видимому, они функционально дефектны, т.к. повышение их количества не сопровождается противоопухолевым действием, как показано на примере рака яичника (Златник Е. Ю. и др., 2017) и рака молочной железы (Vahidi Y. et al., 2020). Как и другими авторами, нами выявлено нарастание уровня

CD8+Tm клеток в крови больных раком ободочной кишки IV стадии, которые, по всей вероятности, не препятствуют генерализации процесса.

Повышение у обследованных нами больных III стадии уровня активированных Т-хелперно-индукторных лимфоцитов всех изученных вариантов свидетельствует о некоторой стимуляции адаптивного Т-клеточного иммунитета, хотя снижение общего уровня Т-хелперов предполагает, что она компенсаторная; кроме того, снижение процента CD8+HLA-DR+ клеток у больных III стадии при наличии ЦОК может говорить о начинающемся истощении Т-цитотоксического звена.

Экспрессия рецептора CD69 развивается на наивных CD4+ Т-лимфоцитах в течение 1-2 часов после антигенной стимуляции, являясь фенотипическим признаком наиболее ранней стадии активации, вовлекающей гены, ответственные за синтез IL-2, и стимулирующей экспрессию рецепторов к нему на иммунокомпетентных клетках (Олейник Е.К. и соавт., 2006). Кроме того, она имеет решающее значение для формирования и поддержания Т-лимфоцитов памяти (Shinoda K. et al., 2012). Однако Т-клетки с высокой экспрессией молекулы CD69 способствуют опухолевой прогрессии: при контакте с аутологичными CD69+ Т-клетками опухоль-ассоциированные макрофаги приобретают способность к гиперпродукции иммуносупрессивного фермента IDO (Литвинова Л.С. и соавт., 2014). Описана также роль CD69+ Т-клеток в истощении опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов, с чем связана прогрессия опухоли, причем введение антител к CD69 нивелировало этот эффект (Mita Y. et al., 2018).

В связи с такими данными литературы, полученное нами возрастание уровня CD8+CD69+ клеток у больных IV стадии при наличии ЦОК по сравнению с их отсутствием может свидетельствовать о неблагоприятной (иммуносупрессивной) роли ЦОК.

Хотя при III стадии у больных с наличием ЦОК нами было обнаружено более высокое количество CD8+ лимфоцитов, чем у больных с отсутствием ЦОК, мы предполагаем функциональную неполноценность этих клеток,

формирующуюся под действием ЦОК. Нами ранее получены данные о том, что у больных КРР с наличием ЦОК по сравнению с больными с отсутствием ЦОК происходит снижение числа статистически значимых корреляционных связей количества CD8<sup>+</sup> клеток с уровнями других клеток иммунной системы, наблюдаемое при II, III, IV стадиях, а утрата обратной корреляция между процентом CD8<sup>+</sup> клеток в крови и экспрессией N-кадгерина в ткани опухоли, предположительно говорит о потере контроля над ЭМП со стороны иммунной системы (Ситковская А.О., 2021). В литературе есть сообщения о том, что ЦОК, гиперэкспрессирующие цитокератины СК8 вместе с СК18 и СК19, ингибируют взаимодействие МНС I с TCR на CD8<sup>+</sup> клетках (Wu M.S. et al., 2013), что препятствует распознаванию клеток-мишеней, и об усилении апоптоза CD8<sup>+</sup> лимфоцитов под действием ЦОК (Gordon N. et al., 2009; Strauss L. et al., 2009).

Таким образом, судя по полученным данным, наличие ЦОК и в ряде случаев их уровень оказывают негативное влияние на показатели адаптивного Т-клеточного иммунитета больных раком ободочной кишки.

В литературе описан разный характер взаимосвязей уровней ЦОК с факторами клеточного иммунитета при различных опухолях. Авторы приводят данные о том, что при метастатическом РМЖ низкое общее количество лимфоцитов при высоком уровне ЦОК является независимым фактором негативного прогноза общей и бессобытийной выживаемости (De Giorgi U. et al., 2012). При воспалительном РМЖ присутствие ЦОК коррелировало со снижением уровней CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, синтезирующих TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  (Mego M. et al., 2016). При IV стадии НМРЛ также установлена обратная корреляция между уровнями ЦОК, NK- и Т-клеток CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, а также CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, тогда как корреляция уровня ЦОК с метастазированием была прямой (Ye L. et al., 2017; Sun W.W. et al., 2017). Нами ранее у больных НМРЛ с III стадией были показаны прямые корреляции уровней ЦОК с содержанием CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, обратные - с содержанием CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>m</sup>, фагоцитарной активностью нейтрофилов, а также нивелирование большинства из них при генерализации процесса (Златник Е.Ю., Бахтин А.В., Новикова И.А. и др., 2017).

При анализе уровней цитокинов в крови больных с разной распространенностью рака ободочной кишки выявлено статистически значимое повышение уровня IL-6 при III - IV стадиях по сравнению с II. Кроме того, при III стадии в сравнении со II отмечены тенденции к снижению уровня IL-1 $\beta$  и повышению уровня IFN- $\alpha$ , а при IV – тенденция к повышению уровня IL-8, хотя и статистически незначимая вследствие высокой вариабельности данных.

Стратификация больных по уровням ЦОК позволила выявить еще ряд различий. При положительных значениях ЦОК определяется снижение уровней TNF- $\alpha$  и IL-10 у больных с II стадией, и повышение уровней IL-8 в IV стадии. Кроме хорошо известного участия IL-6 и IL-8 в неоангиогенезе и метастатических превращениях нормального плоскоклеточного эпителия (Łukaszewicz-Zajac M. et al., 2012), а также в привлечении нейтрофилов в опухоль, рост которой они стимулируют, их связывают также с процессом ЭМП, реализуемого через сигнальные пути JAK/STAT3 (Liu R.Y. et al., 2014). IL-6 повреждает ДНК, угнетает апоптоз и старение опухолевых клеток, вследствие чего является инициатором и промотором канцерогенеза (Szczerba V.M. et al., 2019). В обзоре Long X. и соавт., суммирующем многочисленные данные о биологической роли IL-8 при опухолях, подчеркивается его активность в аутокринной и паракринной регуляции ЭМП, неоангиогенезе и стимуляции экспрессии ММП (Long X. et al., 2016). Авторы рассматривали прежде всего роль IL-8 в микроокружении опухоли, но, поскольку микроокружением ЦОК является плазма крови, мы считаем, что эти данные можно экстраполировать и на нее. Итак, наличие ЦОК, как и увеличение стадии заболевания способствует формированию неблагоприятного цитокинового состава сыворотки, участвующего в дальнейшем прогрессировании опухоли.

События, происходящие в ткани, оказывают не меньшее влияние на развитие метастазирования. Нами ранее установлено выраженное снижение числа и изменение направленности корреляционных связей между количеством опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов различных субпопуляций, и опухолевых клеток, экспрессирующих маркеры пролиферации и эпителиально-

мезенхимального перехода, у больных II-IV стадий КРР с наличием ЦОК по сравнению с больными с отсутствием ЦОК, что указывает на роль ЦОК в формировании иммунного дисбаланса на локальном уровне, для которого их значимость оказалась выше, чем стадия заболевания (Ситковская А.О., 2021). 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).

Учитывая роль ОСК в опухолевом росте, в данной работе мы оценивали экспрессию их маркеров (CD44, CD133, ALDH1) при различных клинко-морфологических характеристиках. При оценке экспрессии маркера ОСК CD44 нами показано, что увеличение стадии заболевания сопровождалось увеличением этого показателя от II к IV стадии. Отсутствовали различия экспрессии CD44 при аденокарциноме и перстневидно-клеточном раке, однако, положительная экспрессия CD44 реже отмечалась при муцинозной аденокарциноме, при которой частота случаев с отрицательной экспрессией CD44 преобладала над положительной в 2,5 раза.

Доля опухолей с экспрессией другого маркера ОСК - CD133 при II и III стадиях практически не отличалась между собой и нарастала при IV стадии, причем наиболее часто наблюдалась в случаях аденокарциномы и перстневидноклеточного рака, статистически значимо превышая экспрессию в муцинозных аденокарциномах.

Выявлено увеличение доли опухолей, экспрессирующих маркер ЭМП ZEB1 при увеличении стадии заболевания; в опухолях IV стадии она была найдена во всех случаях. Не обнаружено связи экспрессии ZEB1 с гистологическими особенностями опухоли: степенью дифференцировки, степенью злокачественности опухоли, гистологической структурой опухоли, лимфоваскулярной и периневральной инвазией, однако, отмечены различия в зависимости от лимфоцитарной инфильтрации: при слабой инфильтрации она



была выше, чем при умеренной и выраженной. В отличие от CD44 и CD133, положительная экспрессия ZEB1 нарастала при увеличении количества пораженных регионарных лимфатических узлов.

Проведенный анализ выявил статистически значимую связь экспрессии CD44, CD133, ALDH1 и ZEB1 и:

- стадии заболевания (CD44 ( $p=0,027$ ), CD133 ( $p=0,047$ ), ALDH1 ( $p=0,003$ ), ZEB1 ( $p<0,001$ ));
- степени выраженности лимфоцитарной инфильтрации (CD44 ( $p<0,001$ ), CD133 ( $p<0,001$ ), ALDH1 ( $p<0,001$ ), ZEB1 ( $p<0,001$ ));
- уровня инвазии опухоли T (CD44 ( $p<0,001$ ), CD133 ( $p<0,001$ ), ALDH1 ( $p=0,018$ ), ZEB1 ( $p<0,001$ ));
- наличия дистантных метастазов (CD44 ( $p<0,001$ ), CD133 ( $p<0,001$ ), ALDH1 ( $p<0,001$ ), ZEB1 ( $p=0,002$ )).

Статистически значимая связь экспрессии трех из четырех исследованных параметров выявлена и для:

- периневральной инвазии опухолевыми клетками (CD44 ( $p=0,002$ ), CD133 ( $p=0,003$ ), ALDH1 ( $p=0,010$ ));
- статуса лимфатических узлов N (CD44 ( $p<0,001$ ), CD133 ( $p=0,002$ ), ZEB1 ( $p=0,022$ )).

Два из четырех исследованных параметра продемонстрировали значимую связь с:

- степенью злокачественности опухоли (CD44 ( $p<0,001$ ), ALDH1 ( $p<0,001$ ));
- гистологической структурой опухоли (CD44 ( $p=0,042$ ), CD133 ( $p=0,005$ ));
- лимфоваскулярной инвазией (CD44 ( $p<0,001$ ), CD133 ( $p=0,041$ ));
- метастатическим индексом лимфоузлов (CD44 ( $p<0,001$ ), ZEB1 ( $p<0,001$ )).

Выявлена единственная значимая связь исследованных параметров и степени дифференцировки опухоли (ALDH1 ( $p<0,01$ )).

Локализация опухоли в различных отделах толстой кишки не продемонстрировала значимой связи ни с одним из исследованных параметров.

Итак, экспрессия CD44 оказалась связана с 10 исследованными клинико-патологическими параметрами из 12; CD133 – с 8, ALDH1 – с 7, ZEB1 – с 6.

Анализ экспрессии маркеров ОСК и ЭМП при наличии и различном уровне ЦОК у больных исследуемой когорты показал, что частота обнаружения ЦОК в крови статистически значимо (в 1,3 раза) возрастала при фенотипе опухолевых клеток в ткани CD44+ ( $p=0,026$ ). Кроме того, выявлена статистически значимая связь между количеством ЦОК в периферической крови и экспрессией маркеров опухолевых стволовых клеток (CD133 ( $p=0,002$ ), ALDH1 ( $p<0,001$ )), ЭМП (ZEB1) ( $p<0,001$ ).

На той же когорте больных был изучен профиль транскрипционной активности микроРНК в опухолевой ткани с последующим биоинформационным анализом участия изученных микроРНК в регуляции ЭМП и стволовклеточного опухолевого потенциала, проанализирован профиль экспрессии микроРНК в изолированных ЦОК, изучен уровень экспрессии генов-мишеней в опухолевой ткани.

В ткани опухоли 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 раз 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. Выявлено изменение экспрессии в опухоли 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 ( $p<0,005$ ).

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, повышением 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 ( $p < 0,05$ )

В целом выявлено сходство профиля экспрессии микроРНК в опухоли и ЦОК при раке ободочной кишки, хотя имеются и некоторые различия. Уровень онкосупрессорной hsa-miR-26a-5p снижен в опухолях различных стадий до аналогичного уровня, но различается в ЦОК, что позволяет дифференцировать рак ободочной кишки с наличием и отсутствием метастазов.

Нами проведен биоинформационный анализ участия паттерна микроРНК в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода и стволовклеточного опухолевого потенциала с использованием баз BioCarta и Gene Ontology. Как по литературным, так и по нашим данным, в регуляции ЭМП, во многом определяющего метастазирование опухолей, принимают участие hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-143-3p, модулируя экспрессию генов-мишеней *MMP-2*, *MMP-14*, *CD44*, *VCAN*, *SPP1*, *FNI*, *COL1A2* и *SPARC*. При этом hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p и hsa-miR-25-3p участвуют в активации сигнальных механизмов, регулирующих ЭМП, в то время как, hsa-miR-143-3p обладает противоположным эффектом. Нами установлено повышение экспрессии hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p и hsa-miR-25-3p в опухолях больных с неблагоприятным исходом, тогда как уровень hsa-miR-143-3p понижался. В результате таких изменений стала возможна активация транскрипции *MMP-2* и *MMP-14* и, как следствие, деградация адгезивных контактов, за которую ответственны указанные ферменты. Экспрессия *MMP-2*

повышалась в 6,2 раза в опухолевой ткани больных и находилась в обратной корреляционной зависимости от уровня hsa-miR-143-3p ( $r = -0,384$   $p < 0,05$ ).

Другой механизм активации ЭМП связан с ремоделированием цитоскелета и взаимодействием белков ERM с CD44. Экспрессия *CD44* положительно модулируется hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-143-3p обуславливает снижение уровня данного гликопротеина. Повышение уровня hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p на фоне снижения экспрессии hsa-miR-143-3p может способствовать CD44-опосредованной активации ЭМП. Так, по результатам нашего исследования экспрессия *CD44* повышалась в 6,4 и раза и имела прямую корреляционную зависимость с уровнем hsa-miR-21-5p ( $r=0,671$ ,  $p < 0,05$ ) и обратную – с уровнем hsa-miR-143-3p ( $r= -0,560$ ,  $p < 0,01$ ).

Белки внеклеточного матрикса коллаген 1, витронектин и фибронектин также могут участвовать в запуске ЭМП опосредованно через SPARC. Гены *FNI*, *COL1A2* и *SPARC* являются мишенями для hsa-let-7i-5p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-92a-3p. Однако, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p отрицательно регулируют экспрессию генов коллагена и фибронектина, в то время как остальные исследуемые микроРНК оказывают положительный эффект на транскрипцию *FNI*, *COL1A2* и *SPARC*.

В нашем исследовании экспрессия *FNI* повышалась в 1,3 раза и *SPARC* – в 2,1 раза, но взаимосвязей с таргетирующими микроРНК обнаружено не было.

По результатам биоинформационного анализа, кроме ЭМП, исследуемые микроРНК регулируют сигнальные пути Wnt, Hedgehog и NF-κB, ответственные за дифференцировку, плюрипотентность, пролиферацию и выживаемость ОСК. 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. Результаты проведенного нами биоинформационного анализа свидетельствуют о том, что hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-92a-3p способны повышать экспрессию *CTNNB1*. Его экспрессия повышалась в опухолях больных в 1,3 раза и коррелировала с уровнем вышеназванных

микроРНК ( $p < 0,05$ ). Кроме того, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-let-7i-5p и hsa-miR-143-3p могут положительно регулировать уровень других участников сигнального пути - APC и GSK3 $\beta$ . В отсутствие сигнала, поступающего с рецептора, APC и GSK3 $\beta$  образуют комплекс с  $\beta$ -катенином, который впоследствии убиквитинилируется и подвергается протеосомной деградации. В опухолях больных обнаружено снижение экспрессии APC и GSK3 $\beta$  в 1,6 и 2,9 раза, соответственно. Нами установлена обратная корреляционная связь между экспрессией GSK3 $\beta$  и уровнем hsa-miR-126-5p ( $r = -0,701$ ,  $p < 0,01$ ) и hsa-miR-25-3p ( $r = -0,413$ ,  $p < 0,05$ ), экспрессией APC и уровнем hsa-let-7i-5p ( $r = -0,613$ ,  $p < 0,01$ ), hsa-miR-126-5p ( $r = -0,311$ ,  $p < 0,05$ ) и hsa-miR-21-5p ( $r = -0,408$ ,  $p < 0,05$ ). Помимо повышенного уровня микроРНК отрицательно регулировать транскрипцию указанных генов могут и другие эпигенетические факторы. Например, гиперметилирование промоторной области APC может приводить к подавлению экспрессии данного гена (Arnold C.N. et al., 2004). Также сообщалось, что длинная некодирующая РНК BDNF-AS может ингибировать экспрессию GSK3 $\beta$  при колоректальном раке (Zhi H., Lian J., 2018).

Сигнальный путь Hedgehog начинается с рецептора PTCH, который передает сигнал на SMO, что позволяет отделиться Gli1/2 от SUFU. В результате Gli1/2 проникает в ядро и выступает в роли транскрипционного фактора. Нами установлено, что hsa-miR-126-5p положительно регулирует экспрессию *PTCH1*, hsa-miR-92a-3p – экспрессию *SUFU*, hsa-let-7i-5p и hsa-miR-143-3p – *GLI-2*. По результатам исследования статистически значимые различия по сравнению с нормальной тканью были характерны только для *SUFU*, экспрессия данного гена повышалась в 1,2 раза. Однако корреляционных связей с уровнем hsa-miR-92a-3p обнаружено не было.

Семейство белков NF- $\kappa$ B представляют собой транскрипционные факторы, которые регулируют экспрессию большого числа генов, участвующих в воспалительных, стрессовых реакциях, росте и развитии ОСК. У млекопитающих выделяют 2 класса данного семейства. NF $\kappa$ B1 (субъединица p50) и NF $\kappa$ B2 (субъединица p52) относятся к классу I, RELA (субъединица p65), RELB и REL

относятся к классу II (Liu T. et al., 2017). 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. В ходе биоинформационного анализа нами установлено, что hsa-miR-143-3p может таргетировать TNF и подавлять его экспрессию. Тем не менее, статистически значимых различий в уровне относительной экспрессии TNF по сравнению с нормальной тканью выявить не удалось. Выше упоминалось, что по нашим данным увеличение стадии и наличие ЦОК характеризуется снижением уровня TNF-α в сыворотке, а статистически значимого повышения IL-1β при нарастании распространенности опухоли не отмечено, наблюдалась лишь тенденция к его повышению у больных с наличием ЦОК при IV стадии. Таким образом, нам не удалось подтвердить участие цитокинов в сигнальном пути NF-κB ни на локальном, ни на системном уровне.

*NFKB1* выступает мишенью для hsa-miR-21-5p и hsa-miR-92a-3p, которые способны положительно регулировать его экспрессию. Полученные результаты свидетельствуют о повышении экспрессии *NFKB1* в 2,3 раза. Обнаружена прямая корреляционная связь между экспрессией *NFKB1* и уровнем hsa-miR-21-5p ( $r=0,753$ ,  $p<0,01$ ).

На основании результатов биоинформационного анализа и последующей валидации можно предположить, что нарушения сигнальных механизмов, регулирующих ЭМП и процессы жизнедеятельности ОСК, связаны с метастазированием и неблагоприятным прогнозом при раке ободочной кишки. Обнаруженные пары микроРНК-ген проясняют эпигенетические особенности опухолей толстой кишки и открывают перспективы для разработки новых терапевтических агентов и схем лечения КРР.

Учитывая известные из литературы и полученные нами данные о роли CD44 в прогрессировании рака толстой кишки и связи его экспрессии в опухоли со стволовыми свойствами клеток, а также с распространенностью процесса, включая как клинические характеристики больных, так и уровень ЦОК у них, мы

закключаем, что в регуляцию этих процессов вносят вклад микроРНК, усиливая их (*hsa-miR-21-5p*) или ингибируя (*hsa-miR-143-3p*). Выявленная нами связь уровня ЦОК с *CD44+* фенотипом опухолевых клеток в ткани ( $p=0,026$ ), а также прямая корреляция экспрессии *CD44* с уровнем *hsa-miR-21-5p* ( $r=0,671$ ,  $p<0,05$ ) и обратная – с уровнем *hsa-miR-143-3p* ( $r= -0,560$ ,  $p<0,01$ ) говорят о взаимосвязях микроРНК, ОСК и ЦОК в ходе ЭМП.

Нами было проведено сравнительное исследование содержания в опухолях больных раком ободочной кишки с наличием и отсутствием отдаленных метастазов клеток лимфоцитарного ряда и опухолевых, экспрессирующих маркеры ОСК. 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 молекул главного комплекса гистосовместимости I типа HLA-ABC и HLA-E и *CD274* (PD-L1). Сравнение тех же характеристик в группах больных без учета стадии, а ранжированных по уровням клеток, экспрессирующих один из маркеров ОСК (*CD44* или *CD133*), сопровождается изменением 8 и 6 из 17 исследованных параметров соответственно. При коэкспрессии *CD44+* и *CD133+* различия наблюдаются по 11 показателям, включающим как клетки иммунного микроокружения, так и опухолевые. Среди них особенно важными представляются характеризующие локальную иммуносупрессию: высокий уровень Т-reg и лимфоцитов, экспрессирующих *CD279* (PD-1) наряду с низким содержанием натуральных киллеров с маркерами *CD56*, тем более значимую, что в литературе описана чувствительность ОСК к НК-клеточному лизису (Canter R.J. et al., 2016). Кроме того, нами выявлено снижение экспрессии *CD274* (PD-L1) на лимфоцитах при ее повышении на опухолевых клетках. Интересно, что экспрессия PD-L1 на обоих видах клеток, по-видимому, связана с *CD44+*, но не с

CD133+ ОСК. Повышение экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках в присутствии CD44+CD133+ клеток сопровождается снижением на них экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости, в отличие от опухолей с высокой раздельной экспрессией CD44+ или CD133+, в которых экспрессия главного комплекса гистосовместимости I типа не только не снижается, но даже возрастает. Однако, поскольку это относится не только к HLA-ABC, ответственному за инициальный этап иммунного ответа в виде презентации антигенов, но и к HLA-E, у которого известны иммуносупрессивные свойства и гиперэкспрессия которого связана со снижением выживаемости больных раком ободочной кишки, такие изменения, по-видимому, следует расценивать как неблагоприятные. Кроме того, экспрессия главного комплекса гистосовместимости I типа препятствует NK-клеточному цитолизу, что отчасти подтверждается наблюдаемым снижением уровня натуральных киллеров в микроокружении опухоли.

Это соответствует данным литературы о том, что усиление экспрессии PD-L1 вносит вклад в избегание действия иммунной системы опухолевыми клетками, в частности, через сигнальную ось ЭМП/β-catenin/STT3/PD-L1, действующую и в обычных опухолевых клетках, но особенно активную – в ОСК. (Hsu J.M. et al., 2018).

Итак, разделение больных на группы в зависимости от наличия/отсутствия ОСК, коэкспрессирующих CD44 и CD133, позволяет получить более детальную картину иммунологического микроокружения, чем разделение по распространенности опухоли. Найденные нами неблагоприятные различия лимфоцитарного микроокружения в опухолях с присутствием ОСК, коэкспрессирующих исследованные маркеры, соответствует данным литературы, характеризующим различные свойства CD44+, CD133+ и CD44+CD133+ ОСК. Так, опухолевые клетки, экспрессирующие рецептор CD44 в большей степени, чем CD133, связаны с метастазированием КРР в печень и неблагоприятным прогнозом заболевания (Jing F. et al., 2015); сочетанная экспрессия обоих маркеров оказалась более значимой для негативного прогноза КРР по сравнению



с их отдельной оценкой (Horst D. et al., 2009). Такие клинические проявления, по-видимому, развиваются вследствие того, что у клеток, коэкспрессирующих CD44 и CD133, более выражено свойство «стволовости», т.к. они более активно формировали сфероиды, чем клетки с отдельной экспрессией этих маркеров (Tsunekuni K. et al., 2019). На клетках РМЖ было показано, что экспрессия PD-L1 также коррелирует с фенотипом Ep-CAM+/CD44high/CD24low20 и Ep-CAM+/CD90+, вследствие более активных в них сигнальных путей Notch3 и mTOR (Mansour F.A. et al., 2020) и является одним из ключевых участников формирования «стволовости» (Almozyan S. et al., 2017).

При изучении взаимосвязи химиочувствительности КРР, мутантного и дикого типа *EGFR* и коэкспрессии или отдельной экспрессии CD44 и CD133 в опухолях было выявлено, что CD133 обуславливает первичную резистентность к иринотекану, а коэкспрессия обоих маркеров - приобретенную резистентность к анти-EGFR таргетным препаратам (Khelwatty S.A. et al., 2019).

Полученные нами результаты могут быть использованы с прогностической целью. Кроме приведенных выше данных по химиорезистентности, они могут иметь отношение и к иммунорезистентности. Например, если исходить из того, что для применения ИКТ системы PD-1/PD-L1 необходима их экспрессия на PD-1 лимфоцитах и PD-L1 на опухолевых клетках, то стратификация больных в зависимости от наличия/отсутствия CD44+CD133+ ОСК оказывается более информативной, чем по распространенности опухоли.

В работе Evangelou Z. и соавт. приводятся ссылки на разноречивые данные мета-анализов оценки прогностической значимости экспрессии PD-L1 на опухолевых и иммунных клетках (Evangelou Z. et al., 2020). Так, по данным Kim H.M. и соавт. на материале 7877 случаев, высокая экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках связана с низкой бессобытийной выживаемостью (Kim H.M. et al., 2017), а в работе Huang W. и соавт. показана аналогичная связь этого параметра также и с общей выживаемостью (Huang W. et al., 2019). Хотя значимость экспрессии PD-L1 на TILs не столь подробно исследована, она представляется важной в прогностическом плане (Zhao T. et al., 2017). Описано ее

противоположное значение по сравнению с тем, какое придается экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках, т.е., более высокая экспрессия маркера на иммунных клетках наблюдается у больных с более высокой общей и безрецидивной выживаемостью (Li X. et al., 2016; Huang W. et al., 2019). При этом представляется важной выраженная лимфоцитарная инфильтрация опухоли, создающая ее иммунное микроокружение с активированным PD-1/PD-L1 путем (Kim H.R. et al., 2016). В связи с этим обнаруженное нами снижение экспрессии PD-L1 на TILs в опухолях с коэкспрессией CD44+CD133+ предполагает неблагоприятный прогноз у таких больных. Повышение экспрессии PD-1 на TILs также было расценено как прогностически информативное, хотя оно отмечено не при нарастании распространенности опухолевого процесса (напротив, при отдаленном метастазировании наблюдалось снижение данного показателя), а именно при наличии опухолевых клеток, коэкспрессирующих маркеры ОСК.

Как показали результаты проведенной статистической обработки с применением регрессионного анализа Кокса и логистической регрессии с пошаговым включением переменных, оба показателя (процент CD44+ опухолевых клеток и процент PD-1+ TILs) оказались статистически значимыми в плане прогноза риска летального исхода и были внесены в прогностические алгоритмы как факторы, влияющие на общую выживаемость. В круг этих факторов входит также уровень ЦОК, важнейшей стратегией выживания которых в крови является экспрессия ими иммуносупрессирующих молекул, в частности, гиперэкспрессия PD-L1, что при связывании с мембранной молекулой PD-1 на Т-эффекторных лимфоцитах угнетает их активность (Tian M. et al., 2016), а индукция PD-1 на Т-клетках под действием PD-L1+ ЦОК может вызывать иммунорезистентность опухолевых клеток (Wang X. et al., 2016).

Общая выживаемость больных, связанная с прогрессированием основного заболевания, была изучена нами стандартными клиническими методами с построением графиков выживаемости по Каплану-Мейеру. Ее показатели уменьшались при наличии исходного регионарного и отдаленного метастазирования до операции, что типично для КРР, как и для других опухолей.

Однако проведение регрессионного анализа Кокса (модель пропорциональных рисков) для оценки влияния молекулярно-генетических и иммунологических показателей крови и опухолевых клеток на сроки летального исхода и величину общей выживаемости позволило выявить ряд факторов, не зависящих от исходной распространенности опухоли. При проведении регрессионного анализа в качестве коварианты рассматривали стадию заболевания; все показатели, предлагаемые нами в качестве прогностических, были независимыми от стадии.

Оценивали связь риска развития неблагоприятного исхода в течение пяти лет после операции (летального исхода или отдаленного метастазирования) с исследованными молекулярно-генетическими, иммунологическими, иммуногистохимическими параметрами и уровнем ЦОК.

При анализе иммунологических показателей крови методом пошагового регрессионного анализа были отобраны два из них – содержание CD16dim56bright (% от количества натуральных киллеров) и концентрация в крови IL-6 и было показано, что риск летального исхода усиливался при их уровне, превышающим медиану.

Среди маркеров ОСК, экспрессию которых оценивали методом проточной цитометрии, статистически значимое влияние на общую выживаемость больных было установлено для CD326+CD133+: увеличение экспрессии промиелина-1 (CD133+) на опухолевых клетках выше 11,1% сопровождалось повышением в 1,98 раз риска развития летального исхода в течение пятилетнего послеоперационного периода ( $p=0,05$ ).

По данным иммуногистохимического исследования прогностическая значимость была показана не только для CD133+, но и для CD44+, а также маркера эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1, экспрессия которых в ткани опухоли повышала риск летального исхода у больных в 1,62 ( $p=0,013$ ), 1,92 ( $p=0,001$ ) и 1,88 раза ( $p=0,002$ ) соответственно. Интересно, что, в отличие от них, экспрессия ALDH1 оказалась не связана с общей выживаемостью больных. Это соответствует данным Раскина Г.А. о том, что изменение количества ALDH1+ клеток не является прогностически значимым для прогрессирования рака толстой

кишки, хотя автор экстраполирует этот вывод на ОСК в принципе, не рассматривая в этом качестве отдельно CD44+ клетки (Раскин Г.А., 2014). В виде примера иммунофенотипической и связанной с ней функциональной гетерогенности ОСК-подобных клеток по различным видам активности в литературе приводятся данные о корреляции экспрессии PD-L1 с фенотипом ОСК Ep-CAM+/CD44high/CD24low20, но не с ALDHhi (Mansour F.A. et al., 2020), что позволяет предположить причину полученных нами различий между ALDH1+ и CD44+ клетками в подобных особенностях.

Поскольку мы исходим из того, что ЦОК и ОСК, участвуя в процессе метастазирования, тесно связаны между собой, и, возможно, представляют одни и те же клетки в разном микроокружении, мы провели регрессионный анализ Кокса по оценке изолированного и совместного с экспрессией CD44+ и CD133+ влияния ЦОК на общую выживаемость, в результате чего выявлено, что одновременный учет экспрессии маркеров ОСК и количества ЦОК в крови расширяет прогностические возможности, но только для сочетания CD44+ (выше 10%) и ЦОК (выше 2), которое сопровождалось повышением риска летального исхода в 1,58 раза, а для ЦОК выше 4 – в 7,2 раза; оба варианта показали статистическую значимость ( $p=0,002$  и  $p<0,001$  соответственно) и были независимыми факторами.

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%, что характеризует хорошее качество прогностического теста. Итак, с повышением экспрессии CD44+ в опухолевой ткани и числа ЦОК в периферическом кровотоке вероятность развития летального исхода больных раком ободочной кишки после операции повышалась.

Несмотря на то, что при использовании системы CellSearch нижним порогом позитивности уровня ЦОК, начиная с которого проба рассматривается

как положительная, для КРР является 3 клетки в 7,5 мл крови, области низких значений ЦОК являются объектом исследования во многих работах (Gazzaniga P. et al., 2013; Seeberg L.T. et al., 2015). Нами проведена стратификация проб по уровням ЦОК (0, от 1 до 3 ЦОК, от 4 до 9 ЦОК, 10 ЦОК и выше) и выполнено сравнительное исследование общей выживаемости больных при разных уровнях ЦОК. За пятилетний срок наблюдения кумулятивная выживаемость среди пациентов, у которых ЦОК в крови отсутствовали, снизилась до 0,633, при ЦОК от 1 до 3 до 0,565, при ЦОК от 4 до 9 клеток до 0,5 и при ЦОК 10 и выше до 0,164. Различие выживаемости пациентов четырех подгрупп в зависимости от числа ЦОК было статистически значимым (log-rank 11,59,  $p=0,009$ ); результаты говорят о возможности их использования для прогнозирования.

Кроме того, при разработке прогностических алгоритмов нами был выявлен еще один информативный комплекс предикторов, позволяющий осуществить эффективное ранжирование больных по риску развития летального исхода. С помощью метода логистической регрессии с пошаговым включением переменных в модель была сформирована совокупность взаимодополняющих по значимости предикторов летального исхода с учетом иммунологических и генетических факторов: уровень экспрессии микроРНК 25-3p (характеризующей участие в регуляции пролиферативного и метастатического потенциала), рецепторов клеточной гибели CD279+(PD-1) на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, ранжированное число ЦОК и экспрессия рецепторов главного комплекса гистосовместимости I типа на опухолевых клетках (HLA-ABC), способствующих их распознаванию иммунными клетками. Иммунные нарушения, связанные с усилением гибели иммунокомпетентных клеток, «ускользание» опухолевых клеток от иммунного надзора на фоне циркуляции опухолевых клеток способствовали развитию неблагоприятного исхода заболевания.

Для числа CD45+CD279+ лимфоцитов по итогам ROC-анализа критическое значение составило 31,9%, при превышении которого риск развития летального исхода у больных раком ободочной кишки в первые пять лет после операции повышался. Противоположную направленность имело количество опухолевых

клеток, экспрессирующих HLA-ABC, для которых критическое значение составило 54,2%: при снижении показателя ниже 54,2% включительно, риск развития летального исхода у больных возрастал. Учет всех четырех предикторов позволил определить прогноз летального исхода больных с большей информативностью: отношение шансов для всей модели составило 41,4 ( $p < 0,0001$ ) с прогностическим критерием P выше 0,56.

Риск летального исхода, определяемого основным заболеванием, несомненно, связан с метастазированием, тем не менее, при статистическом анализе риска метастазирования часть прогностически значимых параметров отличалась от тех, которые прогнозировали летальный исход. Так, по итогам регрессионного анализа было установлено, что одновременный учет у больного раком ободочной кишки экспрессии микроРНК-126а-5р, ранжированного числа ЦОК в периферической крови, числа Т-регуляторных клеток в микроокружении и экспрессии рецепторов HLA-ABC на CD326+ опухолевых клетках взаимно усиливает информативность прогноза развития метастатического поражения в послеоперационном периоде. Они были включены в уравнение, позволяющее определить коэффициент прогноза развития метастазов, причем учет всех четырех предикторов, из которых максимально значимым оказался ранг ЦОК, многократно повышал информативность прогноза развития метастазов: отношение шансов для всей модели составило 30,7 ( $p = 0,015$ ), тогда как для отдельных показателей оно составляло от 0,18 до 4,3.

Оценка риска метастазирования при различных показателях ИГХ-экспрессии маркеров ОСК и ЭМП, полученная методом регрессионного анализа Кокса, показала, что вероятность развития метастазов после операции повышалась при сочетании высокой экспрессии маркеров CD133+ (отношение шансов 1,94,  $p = 0,042$ ), и фактора ЭМП ZEB1 (отношение шансов 1,68,  $p = 0,012$ ) на опухолевых клетках, экспрессирующих EpCAM (CD326+). По экспрессии CD133+ сходные результаты были получены также методом проточной цитометрии. Наиболее значимое различие выживаемости, свободной от метастазирования, сложилось в зависимости от показателя экспрессии ZEB1,

выраженной в баллах, при точке разделения 3 балла и выше (log-rank 3,78,  $p=0,004$ ).

Таким образом, оценка экспрессии маркеров ОСК CD133+, и маркера ЭМП ZEB1 является информативной для прогноза риска развития метастазов в послеоперационном периоде. Кроме того, методом множественной регрессии была разработана модель, позволяющая в динамике определить сроки метастазирования по исходной величине экспрессии ZEB1 на опухолевых клетках и числу ЦОК (решение о выдаче патента на изобретение по заявке № 2022108351/14 от 30.03.2022 г.).

Итак, в работе с помощью многомерных статистических методов были определены совокупности параметров, которые дополнительно к стадии заболевания и независимо от нее, позволяли получить информацию о вероятности наступления неблагоприятных исходов не только по факту, но и по срокам развития, что подтверждено клиническими примерами.

Таким образом, проведенное 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 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 T-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- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , наличие ЦОК у больных II стадии характеризуется снижением содержания TNF- $\alpha$  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- $\kappa$ 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*, *SPP1*, *FNI*, *COL1A2*, *SPARC*, *CTNNB1*, *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 25-3р;

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 T 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 ДАННОЙ 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
- CAF – опухоль-ассоциированные фибробласты
- CAML - ассоциированные с опухолью макрофагоподобные клетки
- CD133 (проминин-1) – гликопротеин, член трансмембранных гликопротеинов, маркер опухолевых стволовых клеток
- CD166 – молекула адгезии активированных лейкоцитов (ALCAM), маркер опухолевых стволовых клеток
- CD44 – интегральный клеточный гликопротеин, играющий важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции, маркер опухолевых стволовых клеток
- CMS – молекулярные подтипы колоректального рака
- CXCR4 – рецептор хемокинов 4 типа, опосредует хемотаксис клеток
- EGFR – рецептор эпидермального фактора роста
- EpCAM – молекула клеточной адгезии эпителия (CD326)
- G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- Hedgehog – сигнальный путь, регулирующий дифференцировку клеток
- HIF-1 $\alpha$  - гипоксия – индуцибельный фактор
- IFN- $\gamma$  – интерферон гамма, растворимый цитокин, являющийся членом класса интерферонов II типа
- IL-6 – интерлейкин 6, может действовать как провоспалительный цитокин
- ILC – врожденные лимфоидные клетки
- MHC – главный комплекс гистосовместимости
- miR – микроРНК, малые некодирующие молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов
- MSI – микросателлитная нестабильность
- MSI-H – высокий уровень микросателлитной нестабильности
- MSI-L – низкий уровень микросателлитной нестабильности
- MSS – микросателлитная стабильность

NK-клетки – натуральные киллеры, тип цитотоксических лимфоцитов, участвующих в функционировании врождённого иммунитета

Notch – сигнальный путь, регулирует взаимодействие между клетками

PD1 – мембранный белок, рецептор программируемой клеточной гибели 1, играет роль в клеточной дифференцировке иммунных клеток

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

Th17 – Т-хелперные клетки

TIL – инфильтрирующие опухоль лимфоциты

TLR – толл-подобные рецепторы

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли

Treg – регуляторные Т-лимфоциты

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

ZEB1 – транскрипционный фактор, маркер эпителиально-мезенхимального перехода

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

KPP – колоректальный рак

ММП – матриксные металлопротеиназы

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

ОСК - опухолевые стволовые клетки

TAM – ассоциированные с опухолью макрофаги

ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абакушина, Е.В. Иммунотерапевтические подходы к лечению больных колоректальным раком / Е.В. Абакушина, Ю.В. Гельм, И.А. Пасова, [и др.] // Биохимия. - 2019. - Т. 84., № 7. - С. 923-933.
2. Абакушина, Е.В. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у онкологических больных при комбинированном лечении с включением адоптивной иммунотерапии / Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – Т.1, №1. – С.45-50.
3. Багиров, Н. С. Микробиом и рак: есть ли связь? Обзор литературы / Н. С. Багиров, И. Н. Петухов, Н. В. Дмитриев [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2018. – Т.3, спецвыпуск 1. – С.56-69.
4. Бережная, Н.М. Иммунология злокачественного роста / Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун – К.: Наукова думка. 2005. – 792 с.
5. Борисов, А.Г. Варианты иммунного реагирования при раке почки / А.Г. Борисов, А.А. Савченко, И.В. Кудрявцев [и др.] // Материалы конференции «Дни иммунологии в СПб 2017». Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19, Спецвыпуск. – С. 158-159.
6. Златник, Е.Ю. Взаимосвязи между иммунным статусом и количеством циркулирующих опухолевых клеток у больных раком легкого при различной распространенности и гистогенезе опухоли / Е.Ю. Златник, А.В. Бахтин, И.А. Новикова [и др.] // Российский аллергологический журнал. – 2017. – № 1. – С. 52-54.
7. Златник, Е.Ю. Иммунологические факторы в ткани меланомы кожи различной распространенности / Е.Ю. Златник, Ю.В. Пржедецкий, С.С. Кочуев [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2018. – Т. 13, № 1-1. – С. 44-48.
8. Златник, Е.Ю. Показатели клеточного иммунитета и количества циркулирующих опухолевых клеток у больных мелкоклеточным и немелкоклеточным раком легкого при различной распространенности и

гистогенезе опухолей / Е.Ю. Златник, А.В. Бахтин, И.А. Новикова // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 2. – С. 124. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26375>.

9. Златник, Е.Ю. 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 [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2020. – Т.19, №4. – С. 94-98.

10. Златник, Е.Ю. Прогностическая значимость тканевого уровня цитокинов при некоторых злокачественных опухолях / Е.Ю. Златник, А.Л. Базаев, С.С. Кочуев // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т.13, №2-1. – С.270-273.

11. Златник, Е.Ю. Роль иммунологической памяти в формировании противоопухолевого иммунитета у больных раком яичников на этапе неoadьювантного лечения / Е.Ю. Златник, Г.А. Неродо, А.Ю. Арджа [и др.] // Вестник РГМУ. – 2017. – №5. – С. 63-73.

12. Златник, Е.Ю. Факторы локального иммунитета у больных раком слизистой оболочки полости рта и языка с отсутствием и наличием регионарных метастазов и рецидивов / Е.Ю. Златник, П.В. Светицкий, И.А. Новикова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2015. – Т.1, №5. – С.953-957.

13. Златник, Е.Ю. Характеристика общего и локального клеточного иммунитета у больных раком яичника / Е.Ю. Златник, Г.А. Неродо, А.В. Бахтин [и др.] // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – №1. – С.72-75.

14. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2019 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, В.В. Петрова – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2020. 250 с. ISBN 978-5- 85502-251-3.

15. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова – М.: МНИОИ им.

П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020. - илл. – 239 с.

16. Кит, О.И. Молекулярная биология колоректального рака в клинической практике / О.И. Кит, Д.И. Водолажский // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, №4. – С. 531-540.

17. Кит, О.И. Циркулирующие опухолевые клетки как показатель лимфо-гематогенного метастазирования при колоректальном раке / О.И. Кит, И.А. Новикова, Ю.А. Геворкян [и др.] // Материалы XXI Российского онкологического конгресса (14-16 ноября 2017 г.). Злокачественные опухоли. – 2017. – Т. 7, № 3-S1. – С. 143-144.

18. Кит, О.И. Циркулирующие опухолевые клетки при колоректальном раке / О.И. Кит, П. Шуликов, И. Новикова [и др.] // Врач. – 2017. – № 5. – С. 42-45.

19. Кит, О.И. 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 [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – №1 (156). – С. 70-74.

20. Кит, О.И. Индивидуальный прогностический алгоритм риска прогрессирования рака пищевода после хирургического лечения / О.И. Кит, Е.Ю. Златник, А.Л. Базаев // Сибирский онкологический журнал. – 2020. – Т.19, №5. – С. 44-50.

21. Кит, О.И. Местный клеточный иммунитет при аденокарциноме и полипах толстой кишки / О.И. Кит, А.В. Шапошников, Е.Ю. Златник [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2012. – Т.76, №4. – С.11-16.

22. Кит, О.И. Роль микроРНК в регуляции сигнальных путей при меланоме / О.И. Кит, Д.И. Водолажский, Н.Н. Тимошкина // Молекулярная медицина. – 2017. – Т.15, № 1. – С. 15-23.

23. Кит, О.И. 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.

24. Кит, О.И. Факторы локального иммунитета при раке пищевода разной степени дифференцировки / О.И. Кит, А.Ю. Максимов, Е.Н. Колесников [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6. – С. 192. URL: <https://scienceeducation.ru/ru/article/view?id=23527>.
25. Кит, О.И. Циркулирующие опухолевые клетки и их связь с клинико-морфологическими характеристиками колоректального рака / О.И. Кит, В.Е. Колесников, Р.Е. Толмах [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2018. – Т. 99, № 1. – С. 5-9.
26. Колесников, В.Е. Лапароскопическая хирургия в лечении больных метастатическим колоректальным раком: дисс. ... докт. мед. наук: 14.01.12 / Колесников Владимир Евгеньевич – Ростов-на-Дону, 2019. – 251 с.
27. Литвинова, Л.С. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л.С. Литвинова, А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич [и др.] // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 7-26.
28. Никипелова, Е.А. Иммунологические критерии развития отдаленных метастазов рака толстой кишки / Е.А. Никипелова, О.И. Кит, А.В. Шапошников [и др.] // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. – 2017. – Т. 195-2, № 3-2. – С. 96-101.
29. Никипелова, Е.А. Локальные иммунологические и молекулярные аспекты колоканцерогенеза: дисс. ... докт. биол. наук: 14.01.12 / Никипелова Елена Алексеевна – Ростов-на-Дону, 2016. – 295 с.
30. 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. – Т.4, №72. – С. 74-81.
31. Олейник, Е.К. Маркеры активации лимфоцитов крови (CD25, CD71 М.И., CD95, HLA-DR) у онкологических больных / Е.К. Олейник, В.М. Шибяев, Е.К. Олейник // Гематология и трансфузиология. – 2006. – Т. 51, №1 – С. 18-22.
32. Олейникова, Н.А. Новое в классификации злокачественных эпителиальных опухолей толстой кишки. (ВОЗ, 2019, 5-е издание) / Н.А.

Олейникова, П.Г. Мальков, Н.В. Данилова // Архив патологии. – 2020. – Т.82, №3. – С.38-46.

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

34. 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.

35. Перельмутер, В.М. Иммуновоспалительные реакции в микроокружении гетерогенны, пластичны, определяют противоопухолевый эффект или агрессивное поведение опухоли / В.М. Перельмутер, Л.А. Таширева, В.Н. Минских [и др.] // Журнал общей биологии. – 2017. – Т. 78, № 5. – С. 15-36.

36. Перельмутер, В.М. Иммуновоспалительные реакции в микроокружении гетерогенны, пластичны, определяют противоопухолевый эффект или агрессивное поведение опухоли / В.М. Перельмутер, Л.А. Таширева, В.Н. Манских [и др.] // Журнал общей биологии. – 2017. – Т.78, №5. – С.15-36.

37. Раскин, Г.А. Морфологическая оценка прогностических и предиктивных факторов при аденокарциноме толстой кишки: дисс. ... докт. мед. наук: 14.03.02, 14.01.12 / Раскин Григорий Александрович – СПб., 2014. – 250 с.

38. Сепиашвили, Р.И. Физиология естественных киллеров / Р.И. Сепиашвили, И.П. Балмасова. – М.: Медицина-Здоровье, 2005. – 456 с.

39. Ситковская, А.О. Иммунологические и иммуногистохимические аспекты циркуляции опухолевых клеток при колоректальном раке: дисс. ... канд.



биол. наук: 14.01.12 / Ситковская Анастасия Олеговна – Ростов-на-Дону, 2021. – 174 с.

40. Ситковская, А.О. 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 [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=30107>.

41. Станоевич, У. Клиническое значение результатов молекулярно-генетических исследований толстой кишки при колоректальном раке: дисс. ... докт. мед. наук: 14.01.12 / Станоевич Углеша – М., 2016. – 235 с.

42. Табаков, Д.В. Гетерогенность популяций НК- и НКТ-лимфоцитов у здоровых доноров / Д.В. Табаков, Т.Н. Заботина, А.А. Борунова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19, №4. – С.401-408.

43. Тарасов, В.А. Аберрантная экспрессия микроРНК при развитии злокачественных опухолей толстой кишки / В.А. Тарасов, Д.Г. Матишов, Е.Ф. Шин [и др.] // Генетика. – 2014. – Т.50, №10. – С. 1232-1244.

44. Титов, К.С. Влияние стволовых клеток опухоли на прогноз при локализованной меланоме кожи / К.С. Титов, А.М. Казаков, М.А. Барышникова, [и др.] // Вопросы онкологии. - 2020. - Т. 66, № 5. - С. 535-539.

45. Титов, К.С. Некоторые молекулярные и иммунологические факторы прогноза трижды негативного рака молочной железы / К.С. Титов, А.М. Казаков, М.А. Барышникова [и др.] // Онкогинекология. - 2019. – Т32, № 4. - С. 26-34.

46. Харченко, Е.П. Микробиота, иммунная система и колоректальный рак / Е.П. Харченко, И.А. Соловьев // Тазовая хирургия и онкология. – 2017. – Т.7, №4. – С. 11-19.

47. Чердынцева, Н.В. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии / Н.В. Чердынцева, И.В. Митрофанова, М.А. Булдаков [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 16, №4. – С.61-74.

48. Abakushina E.V., Popova L.I., Mikhailovsky N.V., [et al.] The advantages and challenges of anticancer dendritic cell vaccines and NK cells in adoptive cell immunotherapy // *Vaccines* (Basel). 2021 Nov 19;9(11):1363. doi: 10.3390/vaccines9111363.
49. Abdalla T.S.A, Meiners J., Riethdorf S. et al., Prognostic value of preoperative circulating tumor cells counts in patients with UICC stage I-IV colorectal cancer. *PLoS One*. 2021 Jun 10;16(6):e0252897.
50. Abdelsattar Z.M., Wong S.L., Regenbogen S.E. et al. Colorectal cancer outcomes and treatment patterns in patients too young for average-risk screening. *Cancer*. 2016 Mar 15;122(6):929-34.
51. Abouleila Y., Onidani K., Ali A. et al. Live single cell mass spectrometry reveals cancer-specific metabolic profiles of circulating tumor cells. *Cancer Sci*. 2019;110(2):697–706.
52. Aceto N. Bring along your friends: Homotypic and heterotypic circulating tumor cell clustering to accelerate metastasis. *Biomed. J*. 2020;43:18–23.
53. Aceto N., Bardia A., Miyamoto D.T. et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014;158:1110–1122.
54. Acharyya S., Massague J. Arresting supporters: targeting neutrophils in metastasis. *Cell Res*. 2016 Mar;26(3):273-4.
55. Adams D.L., Adams D.K., Alpaugh R.K. et al. Circulating Cancer-Associated Macrophage-Like Cells Differentiate Malignant Breast Cancer and Benign Breast Conditions. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. 2016;25:1037–1042.
56. Adams D.L., Martin S.S., Alpaugh R.K. et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111:3514–3519.
57. Aderetti D.A., Hira V.V.V., Molenaar R.J. et al. The hypoxic peri-arteriolar glioma stem cell niche, an integrated concept of five types of niches in human glioblastoma. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018 Apr;1869(2):346-354.

58. Agelaki S., Kalykaki A., Markomanolaki H. et al. Efficacy of Lapatinib in Therapy-Resistant HER2-Positive Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. *PLoS One*. 2015 Jun 17;10(6):e0123683.
59. Agnoletto C., Corrà F., Minotti L. et al. Heterogeneity in Circulating Tumor Cells: The Relevance of the Stem-Cell Subset. *Cancers (Basel)*. 2019 Apr 5;11(4):483.
60. Agnoletto C., Minotti L., Brulle-Soumare L., et al. Heterogeneous expression of EPCAM in human circulating tumour cells from patient-derived xenografts. *Biomark Res*. 2018 Oct 30;6:31.
61. Akimoto N., Ugai T., Zhong R. et al. Rising incidence of early-onset colorectal cancer - a call to action. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Apr;18(4):230-243
62. Al Habyan S., Kalos C., Szyborski J. et al. Multicellular detachment generates metastatic spheroids during intra-abdominal dissemination in epithelial ovarian cancer. *Oncogene*. 2018;37:5127–5135.
63. Alamodi A.A., Eshaq A.M., Hassan S.Y. et al. Cancer stem cell as therapeutic target for melanoma treatment. *Histol Histopathol*. 2016 Dec;31(12):1291-301.
64. Albin A., Bruno A., Noonan D.M. et al. Contribution to Tumor Angiogenesis From Innate Immune Cells Within the Tumor Microenvironment: Implications for Immunotherapy. *Front Immunol*. 2018 Apr 5;9:527
65. Alix-Panabieres C., Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013;59(1):110–118
66. Allard W.J., Matera J., Miller M.C. et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 15;10(20):6897-904.
67. Allgayer H., Leupold J.H., Patil N. Defining the «Metastasome»: Perspectives from the genome and molecular landscape in colorectal cancer for metastasis evolution and clinical consequences. *Semin Cancer Biol*. 2020 Feb;60:1-13.

68. Almozyan S., Colak D., Mansour F., et al. PD-L1 promotes OCT4 and Nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining PI3K/AKT pathway activation. *Int J Cancer*. 2017 Oct 1;141(7):1402-1412.
69. Aloia L., McKie M.A., Huch M. Cellular plasticity in the adult liver and stomach. *J Physiol*. (2016) 594:4815–25.
70. Angius A., Scanu A.M., Arru C. et al. Portrait of Cancer Stem Cells on Colorectal Cancer: Molecular Biomarkers, Signaling Pathways and miRNAome. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 5;22(4):1603.
71. Aramini B., Masciale V., Grisendi G. et al. Cancer stem cells and macrophages: molecular connections and future perspectives against cancer. *Oncotarget*. 2021 Feb 2;12(3):230-250.
72. Arnold C.N., Goel A., Niedzwiecki D. et al. APC promoter hypermethylation contributes to the loss of APC expression in colorectal cancers with allelic loss on 5q. *Cancer Biol Ther*. 2004 Oct;3(10):960-4.
73. Arnold C.R., Mangesius J., Skvortsova I.I. et al. The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Front Oncol*. 2020 Feb 20;10:164.
74. Arnold M., Abnet C.C., Neale R.E. et al. Global burden of 5 major types of gastrointestinal cancer. *Gastroenterology*. 2020; 159: 335-349.e15.
75. Athauda A., Segelov E., Ali Z. et al. Integrative molecular analysis of colorectal cancer and gastric cancer: What have we learnt? *Cancer Treat Rev*. 2019 Feb;73:31-40.
76. Atreya C.E., Yaeger R., Chu E. Systemic Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: From Current Standards to Future Molecular Targeted Approaches. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book*. 2017;37:246–256.
77. Atreya I., Kindermann M., Wirtz S. Innate lymphoid cells in intestinal cancer development. *Semin Immunol*. 2019 Feb;41:101267
78. Auffray C., Fogg D., Garfa M. et al. Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science*. 2007;317:666–670.

79. Ayob A.Z., Ramasamy T.S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci.* 2018 Mar 6;25(1):20.
80. Azzouz D., Khan M.A., Palaniyar N. ROS induces NETosis by oxidizing DNA and initiating DNA repair. *Cell Death Discov.* 2021 May 18;7(1):113.
81. Bahri R., Pateras I.S., D'Orlando O. et al. IL-15 suppresses colitis-associated colon carcinogenesis by inducing antitumor immunity. *Oncoimmunology.* 2015 Jan 22;4(9):e1002721.
82. Bailey C.E., Hu C-Y., You Y.N. et al. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975–2010. *JAMA Surg* 2015;150:17–22
83. Bakouny Z., Choueiri T.K. IL-8 and cancer prognosis on immunotherapy. *Nat Med.* 2020 May;26(5):650-651.
84. Balcells I, Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol.* 2011 Jun 25;11:70.
85. Baranovskaya S., Martin Y., Alonso S. et al. Down-regulation of epidermal growth factor receptor by selective expansion of a 5'-end regulatory dinucleotide repeat in colon cancer with microsatellite instability. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 15;15(14):4531-7.
86. Bassani B., Baci D., Gallazzi M. et al. Natural Killer Cells as Key Players of Tumor Progression and Angiogenesis: Old and Novel Tools to Divert Their Pro-Tumor Activities into Potent Anti-Tumor Effects. *Cancers (Basel).* 2019 Apr 1;11(4):461.
87. Battle E., Clevers H. Cancer Stem Cells Revisited. *Nat. Med.* 2017;23:1124–1134. doi: 10.1038/nm.4409
88. Battle E., Massagué J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity.* 2019 Apr 16;50(4):924-940.
89. Bayon L.G., Izquierdo M.A., Sirovich I. et al. Role of Kupffer cells in arresting circulating tumor cells and controlling metastatic growth in the liver. *Hepatology.* 1996;23:1224–1231

90. Becht E., De Reynies A., Giraldo N.A. et al. Immune and stromal classification of colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. *Clin Cancer Res: Off J Am Assoc Cancer Res* 2016;22:4057–66
91. Becht E., Giraldo N.A., Lacroix L. et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol.* 2016, 17:218
92. Bendell J., Hubbard J., O’Neil B.H. et al. Phase 1b/II study of cancer stemness inhibitor napabucasin in combination with FOLFIRI +/- bevacizumab (bev) in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients (pts). *Ann Oncol* 2017; 28: iii150–3.
93. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.
94. Bertazza L., Mocellin S. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. *Curr Med Chem.* 2010;17(29):3337-3352.
95. Bharat A., McQuattie-Pimentel A.C., Budinger G.R.S. Non-classical monocytes in tissue injury and cancer. *Oncotarget.* 2017 Nov 21;8(63):106171-106172.
96. Bill R., Christofori G. The relevance of EMT in breast cancer metastasis: Correlation or causality? *FEBS Lett.* 2015 Jun 22;589(14):1577-87.
97. Bindea G., Mlecnik B., Tosolini M. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity.* 2013 Oct 17;39(4):782-95.
98. Binnewies M., Roberts E.W., Kersten K. et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018 May;24(5):541-550
99. Blois S.M., Klapp B.F., Barrientos G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: Unravelling the functions of DC and NK cells. *J. Reprod. Immunol.* 2011;88:86–92.

100. Boone B.A., Orlichenko L., Schapiro N.E. et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) enhances autophagy and neutrophil extracellular traps in pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther.* 2015;22:326-334.
101. Bork U., Grützmann R., Rahbari N.N. et al. Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 14;20(30):10296-304
102. Bork U., Rahbari N.N., Schölch S. et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. *Br J Cancer* 2015;112(8):1306-1313.
103. Borovski T., De Sousa E. Melo F. et al. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.* 2011 Feb 1;71(3):634-9.
104. Borsig L., Wong R., Feramisco J. et al. Heparin and cancer revisited: Mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98:3352–3357.
105. Brandt W.D., Matsui W., Rosenberg J.E. et al. Urothelial carcinoma: stem cells on the edge. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Dec;28(3-4):291-304.
106. Brannon A.R., Vakiani E., Sylvester B.E. et al. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome Biol.* 2014 Aug 28;15(8):454.
107. Brastianos P.K., Carter S.L., Santagata S. et al. Genomic Characterization of Brain Metastases Reveals Branched Evolution and Potential Therapeutic Targets. *Cancer Discov.* 2015 Nov;5(11):1164-1177.
108. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424.
109. Bray, F. The Changing Global Burden of Cancer: Transitions in Human Development and Implications for Cancer Prevention and Control / F. Bray, I. Soerjomataram // *Disease Control Priorities, Third Edition, Vol. 3: Cancer* - P. 23-44.

110. Bremnes R.M., Busund L.T., Kilvær T.L. et al. The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016 Jun;11(6):789-800
111. Brierley J. D., Gospodarowicz M. K., Wittekind C. (eds.) *UICC TNM Classification of Malignant Tumours*, 8<sup>th</sup> Edition. Wiley-Blackwell: Oxford 2017. 272 p. ISBN: 978-1-119-26357-9.
112. Brodbeck T., Nehmann N., Bethge A. et al. Perforin-dependent direct cytotoxicity in natural killer cells induces considerable knockdown of spontaneous lung metastases and computer modelling-proven tumor cell dormancy in a HT29 human colon cancer xenograft mouse model. *Mol. Cancer.* 2014;13:244.
113. Brown E.J., Frazier W.A. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 2001;11:130–5.
114. Brugnoli F., Grassilli S., Al-Qassab Y. et al. CD133 in breast cancer cells: more than a stem cell marker. *J Oncol.* (2019) 2019:7512632.
115. Bruno A., Bassani B., D'Urso D.G. et al. Angiogenin and the MMP9-TIMP2 axis are up-regulated in proangiogenic, decidual NK-like cells from patients with colorectal cancer. *FASEB J.* 2018 Oct;32(10):5365-5377.
116. Bu P., Wang L., Chen K.Y. et al. A miR-34a-Numb Feedforward Loop Triggered by Inflammation Regulates Asymmetric Stem Cell Division in Intestine and Colon Cancer. *Cell Stem Cell.* 2016 Feb 4;18(2):189-202.
117. Burr R., Gilles C., Thompson E.W. et al. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Circulating Tumor Cells, the Precursors of Metastasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2020;1220:11–34
118. Burton E.R., Libutti S.K. Targeting TNF-alpha for cancer therapy. *J Biol.* 2009 Oct 23;8(9):85
119. Burz C., Pop V.V., Buiga R. et al. Circulating tumor cells in clinical research and monitoring patients with colorectal cancer. *Oncotarget.* 2018 May 11;9(36):24561-24571.
120. Cai X., Janku F., Zhan Q. et al. Accessing Genetic Information with Liquid Biopsies. *Trends Genet* 2015;31(10):564–575



121. Cai Z., Cao Y., Luo Y. et al. Signalling mechanism(s) of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in tumour therapeutic resistance. *Clin Chim Acta*. 2018 Aug;483:156-163.
122. Campomenosi P., Gini E., Noonan D.M. et al. A comparison between quantitative PCR and droplet digital PCR technologies for circulating microRNA quantification in human lung cancer. *BMC Biotechnol*. 2016 Aug 18;16(1):60.
123. Canli Ö., Nicolas A.M, Gupta J. et al. Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Induce Epithelial Mutagenesis. *Cancer Cell*. 2017 Dec 11;32(6):869-883.e5.
124. Canter R.J., Grossenbacher S.K., Ames E. et al. Immune targeting of cancer stem cells in gastrointestinal oncology. *J Gastrointest Oncol*. 2016 Apr;7(Suppl 1):S1-S10.
125. Cao Y., Zhang H., Zheng L. et al. Identification of the Core MicroRNAs and Potential Molecular Mechanisms in Sarcoidosis Using Bioinformatics Analysis. *Front Mol Biosci*. 2021;8:644232.
126. Capp J-P. Cancer stem cells: from historical roots to a new perspective. *J Oncol*. (2019) 2019:5189232.
127. Caramel J., Ligier M., Puisieux A. Pleiotropic Roles for ZEB1 in Cancer. *Cancer Res*. 2018 Jan 1;78(1):30-35.
128. Carpentino J.E., Hynes M.J., Appelman H.D. et al. Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. *Cancer Res*. 2009;69:8208–8215.
129. Carvajal-Hausdorf D., Altan M., Velcheti V. et al. Expression and clinical significance of PD-L1, B7-H3, B7-H4 and TILs in human small cell lung Cancer (SCLC). *J Immunother Cancer*. 2019 Mar 8;7(1):65.
130. Castriconi R., Carrega P., Dondero A. et al. Molecular Mechanisms Directing Migration and Retention of Natural Killer Cells in Human Tissues. *Front Immunol*. 2018 Oct 11;9:2324.

131. Ceelen W., Ramsay R.G., Narasimhan V. et al. Targeting the Tumor Microenvironment in Colorectal Peritoneal Metastases. *Trends Cancer*. 2020 Mar;6(3):236-246.
132. Celià-Terrassa T., Kang Y. Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev*. 2016 Apr 15;30(8):892-908.
133. Chaffer C.L., Brueckmann I., Scheel C. et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 10;108(19):7950-5.
134. Chakraborty S., Bhattacharjee P., Panda A.K. et al. Prevalence of the CD25+KIR+CD127-FOXP3-CD8+T-cell subset determines the dynamics of tumor immune surveillance. *Immunol Cell Biol*. 2018 Nov;96(10):1035-1048.
135. Chang Y.S., di Tomaso E., McDonald D.M. et al. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14608-13.
136. Chao M.P., Tang C., Pachynski R.K. et al. Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy. *Blood* 2011;118:4890–901.
137. Charafe-Jauffret E. Ginestier C., Bertucci F. et al. ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program. *Cancer Res* 2013; 73: 7290–7300.
138. Chemi F., Mohan S., Guevara T. et al. Early Dissemination of Circulating Tumor Cells: Biological and Clinical Insights. *Front Oncol*. 2021 May 7;11:672195.
139. Chen B., Xia Z., Deng Y.N., et al. Emerging microRNA biomarkers for colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Open Biol*. 2019;9(1):180212
140. Chen C., Zhao S., Karnad A. et al. The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications. *J. Hematol. Oncol*. 2018;11:64
141. Chen J., Xia Q., Jiang B. et al. Prognostic value of cancer stem cell marker ALDH1 expression in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015a;10(12):e0145164.

142. Chen J., Zhang L., Ma S. et al. The aberrant expressions of MACC1, ZEB1, and KLF4 in hepatocellular carcinoma and their clinical significance. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019 Sep 1;12(9):3653-3661.
143. Chen X., Zou X., Qi G., et al. Roles and Mechanisms of Human Cathelicidin LL-37 in Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(3):1060-1073.
144. Cheng B., Tong G., Wu X., et al. Enumeration And Characterization Of Circulating Tumor Cells And Its Application In Advanced Gastric Cancer. *Onco Targets Ther.* 2019 Sep 25;12:7887-7896.
145. Cheng L., Wu Q., Huang Z. et al. L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. *EMBO J.* 2011 Mar 2;30(5):800-13
146. Chiorean E.G., Nandakumar G., Fadelu T. et al. Treatment of Patients with Late-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *JCO Glob Oncol.* 2020 Mar;6:414-438. doi: 10.1200/JGO.19.00367.
147. Chiossone L., Dumas P.Y., Vienne M. et al. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2018 Nov;18(11):671-688.
148. Choi H.S., Ha S.Y., Kim H.M. et al. The prognostic effects of tumor infiltrating regulatory T cells and myeloid derived suppressor cells assessed by multicolor flow cytometry in gastric cancer patients. *Oncotarget.* 2016 Feb 16;7(7):7940-51.
149. Clarke M.F., Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell.* 2006 Mar 24;124(6):1111-5.
150. Clinton S.K., Giovannucci E.L., Hursting, S.D. The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. *J Nutr.* 2020 Apr 1;150(4):663-671. doi: 10.1093/jn/nxz268.
151. Codony-Servat J., Rosell R. Cancer stem cells and immunoresistance: clinical implications and solutions. *Transl Lung Cancer Res.* 2015 Dec;4(6):689-703.
152. Codony-Servat J., Verlicchi A., Rosell R. Cancer stem cells in small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2016 Feb;5(1):16-25.

153. Coffelt S.B., Tomchuck S.L., Zvezdaryk K.J. et al. Leucine leucine-37 uses formyl peptide receptor-like 1 to activate signal transduction pathways, stimulate oncogenic gene expression, and enhance the invasiveness of ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2009 Jun;7(6):907-15.
154. Coffelt S.B., Wellenstein M.D., de Visser K.E. Neutrophils in cancer: Neutral no more. *Nat. Rev. Cancer.* 2016;16:431–446.
155. Cohen J.D., Li L., Wang Y. et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018; 359: 926–930.
156. Cohen R., Rousseau B., Vidal J. et al. Immune Checkpoint Inhibition in Colorectal Cancer: Microsatellite Instability and Beyond. *Target Oncol.* 2020 Feb;15(1):11-24.
157. Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B. et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Investig.* 2013;123:3446–3458.
158. Cooper W.A., Tran T., Vilain R.E. et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer.* 2015 Aug;89(2):181-8.
159. Corcoran R.B., André T., Atreya C.E. et al. Combined BRAF, EGFR, and MEK inhibition in patients with BRAFV600E-mutant colorectal cancer. *Cancer Discovery* 2018;8:428–43.
160. Cun J., Yang Q. Bioinformatics-based interaction analysis of miR-92a-3p and key genes in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2018;107:117-128.
161. Dallas M.R., Liu G., Chen W.C. et al. Divergent roles of CD44 and carcinoembryonic antigen in colon cancer metastasis. *FASEB J* 2012;26(6):2648–56.
162. De Giorgi U., Mego M., Scarpi E. et al. Association between circulating tumor cells and peripheral blood monocytes in metastatic breast cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2019 Aug 14;11:1758835919866065.

163. De Giorgi U., Mego M., Scarpi E. et al. Relationship Between Lymphocytopenia and Circulating Tumor Cells as Prognostic Factors for Overall Survival in Metastatic Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer*. 2012;12:264–269.
164. De Palma M., Biziato D., Petrova T.V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2017 Aug;17(8):457-474.
165. de Wit S., Manicone M., Rossi E. et al. EpCAM<sup>high</sup> and EpCAM<sup>low</sup> circulating tumor cells in metastatic prostate and breast cancer patients. *Oncotarget*. 2018 Nov 2;9(86):35705-35716.
166. de Wit S., Rossi E., Weber S. et al. Single tube liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2019 Jun 15;144(12):3127-3137.
167. de Wit S., van Dalum G., Lenferink A.T. et al. The detection of EpCAM(+) and EpCAM(-) circulating tumor cells. *Sci Rep*. 2015 Jul 17;5:12270.
168. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009 Mar;14(1):3-9.
169. Del Vecchio M., Bajetta E., Canova S. et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 15;13(16):4677-85.
170. Deneve E., Riethdorf S., Ramos J. et al. Capture of Viable Circulating Tumor Cells in the Liver of Colorectal Cancer Patients. *Clin. Chem*. 2013;59:1384–1392.
171. Deng B., Wang B., Fang J. et al. MiRNA-203 suppresses cell proliferation, migration and invasion in colorectal cancer via targeting of EIF5A2. *Sci Rep*. 2016 Jul 4;6:28301.
172. Dennis K.L., Blatner N.R., Gounari F. et al. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr Opin Oncol*. 2013 Nov;25(6):637-45.
173. Desai A., Yan Y., Gerson S.L. Concise Reviews: Cancer Stem Cell Targeted Therapies: Toward Clinical Success. *Stem Cells Transl Med*. 2019 Jan;8(1):75-81.
174. Dhar M., Lam J.N., Walser T. et al. Functional profiling of circulating tumor cells with an integrated vortex capture and single-cell protease activity assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018;115:9986–9991.

175. Di Caro G., Marchesi F., Laghi L. et al. Immune cells: plastic players along colorectal cancer progression. *J Cell Mol Med.* 2013 Sep;17(9):1088-95.
176. Dienstmann R., Vermeulen L., Guinney J. et al. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2017;17:79–92.
177. Dieu-Nosjean M.C., Giraldo N.A., Kaplon H. et al. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol Rev.* 2016 May;271(1):260-75.
178. Ding L., Lan Z., Xiong X. et al. The Dual Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 17;19(9):2791.
179. Dohadwala M., Wang G., Heinrich E. et al. The role of ZEB1 in the inflammation-induced promotion of EMT in HNSCC. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010 May;142(5):753-9.
180. Domingo-Domenech J., Vidal S.J., Rodriguez-Bravo V. et al. Suppression of acquired docetaxel resistance in prostate cancer through depletion of notch- and hedgehog-dependent tumor-initiating cells. *Cancer Cell.* 2012 Sep 11;22(3):373-88.
181. Du L., Wang H., He L., et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):6751-60.
182. Duda D.G., Duyverman A.M., Kohno M. et al. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Dec 14;107(50):21677-82.
183. Etienne-Grimaldi M-C., Formento J-L., Francoual M. et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:4830–5.
184. Eusebi L.H., Ceccarelli C., Artesiani M.L. et al. 08.16: early onset colorectal cancer vs sporadic colorectal cancer: a clinicopathological and molecular comparison. *Dig Liver Dis* 2017;49:e185–6.
185. Evangelou Z., Papoudou-Bai A., Karpathiou G. et al. PD-L1 Expression and Tumor-infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: Clinicopathological Analysis in Women Younger than 40 Years Old. *In Vivo.* 2020 Mar-Apr;34(2):639-647.

186. Fabisiewicz A., Grzybowska E. CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Med. Oncol.* 2017;34:1–10.
187. Fan T., Zhao Q., Chen J.J. et al. Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009;112(1):185–191.
188. Fanali C., Lucchetti D., Farina M. et al. Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014;20(4):923–42.
189. Feinberg A.P. The key role of epigenetics in human disease prevention and mitigation. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378: 1323–1334.
190. Fidler I.J., Nicolson G.L. Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *J Natl Cancer Inst.* 1976 Nov;57(5):1199-202.
191. Fidler M.M., Soerjomataram I., Bray F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. *Int J Cancer.* 2016 Dec 1;139(11):2436-46.
192. Finsterbusch M., Khare V., Campregher C. et al. An intracytoplasmic IL-10 receptor variant permits rapid reduction in STAT3 activation. *Genes Immun.* 2011 Oct;12(7):575-81.
193. Fonseca N.A., Cruz A.F., Moura V. et al. The cancer stem cell phenotype as a determinant factor of the heterotypic nature of breast tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017 May;113:111-121.
194. Francart M.E., Lambert J., Vanwynsberghe A.M. et al. Epithelial-mesenchymal plasticity and circulating tumor cells: Travel companions to metastases. *Dev. Dyn.* 2018;247:432–450.
195. Fridman W.H., Zitvogel L., Sautès-Fridman C. et al. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Dec;14(12):717-734.
196. Fu L., Zhu Y., Jing W. et al. Incorporation of circulating tumor cells and whole-body metabolic tumor volume of 18F-FDG PET/CT improves prediction of

outcome in IIIB stage small-cell lung cancer. *Chin J Cancer Res.* 2018 Dec;30(6):596-604.

197. Gagnière J., Raisch J., Veziat J. et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(2):501-518.

198. Galizia G., Gemei M., Orditura M. et al. Postoperative detection of circulating tumor cells predicts tumor recurrence in colorectal cancer patients. *J Gastrointest Surg* 2013;17(10):1809–1818.

199. Gangnus R., Langer S., Breit E. et al. Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004 May 15;10(10):3457-64.

200. Gao W., Chen Y., Yang J. et al. Clinical Perspectives on Liquid Biopsy in Metastatic Colorectal Cancer. *Front Genet.* 2021 Jan 28;12:634642.

201. Garde Noguera J., Jantus-Lewintre E., Gil-Raga M. et al. Role of RAS mutation status as a prognostic factor for patients with advanced colorectal cancer treated with first-line chemotherapy based on fluoropyrimidines and oxaliplatin, with or without bevacizumab: A retrospective analysis *Mol Clin Oncol.* 2017;6(3):403-408.

202. Garrigós N., Gallego J., Guillén-Ponce C. et al. Circulating tumour cell analysis as an early marker for relapse in stage II and III colorectal cancer patients: a pilot study. *Clin Transl Oncol* 2010;12:142–7.

203. Gavin P.G., Colangelo L.H., Fumagalli D. et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res: Off J Am Assoc Cancer Res* 2012;18:6531–41.

204. Gazzaniga P., Gradilone A., Petracca A. et al. Molecular markers in circulating tumor cells from metastatic colorectal cancer patients. *J Cell Mol Med* 2010;14:2073–7.

205. Gazzaniga P., Raimondi C., Gradilone A. et al. Circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer: do we need an alternative cutoff? *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139(8):1411–6.



206. Genna A., Vanwynsberghe A.M., Villard A.V. et al. EMT-Associated Heterogeneity in Circulating Tumor Cells: Sticky Friends on the Road to Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 19;12(6):1632.
207. Germain C., Gnjatic S., Tamzalit F. et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Apr 1;189(7):832-44.
208. Germano G., Mauri G., Siravegna G. et al. Parallel Evaluation of Circulating Tumor DNA and Circulating Tumor Cells in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2018 Mar;17(1):80-83.
209. Giraldo N.A., Becht E., Pagès F. et al. Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015 Jul 1;21(13):3031-40.
210. Giuliano M., Shaikh A., Lo H.C. et al. Perspective on Circulating Tumor Cell Clusters: Why It Takes a Village to Metastasize. *Cancer Res*. 2018 Feb 15;78(4):845-852.
211. Gkountela S., Castro-Giner F., Szczerba B.M. et al. Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding. *Cell*. 2019;176:98–112.
212. Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol*. 2017 Apr 1;3(4):524-548.
213. Gloushankova N.A., Zhitnyak I.Y., Rubtsova S.N. Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Progression. *Biochemistry (Mosc)*. 2018 Dec;83(12):1469-1476.
214. Glumac P.M., LeBeau A.M. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Transl Med*. 2018 Jul 9;7(1):18.
215. Gmeiner W.H. Recent Advances in Our Knowledge of mCRC Tumor Biology and Genetics: A Focus on Targeted Therapy Development. *Onco Targets Ther*. 2021 Mar 25;14:2121-2130.

216. Gomes S.E., Pereira D.M., Roma-Rodrigues C. et al. Convergence of miR-143 overexpression, oxidative stress and cell death in HCT116 human colon cancer cells. *PLoS One*. 2018 Jan 23;13(1):e0191607.
217. Gonzalez D.M., Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*. 2014 Sep 23;7(344):re8. doi: 10.1126/scisignal.2005189.
218. Goossens S., Vandamme N., Van Vlierberghe P. et al. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. 2017;1868:584–591.
219. Goossens-Beumer I., Zeestraten E., Benard A. et al. The clinical prognostic value of combined analysis of Aldh1, Survivin, and EpCAM expression in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(12):2935–44.
220. Gordon N., Kleinerman E.S. The role of Fas/FasL in the metastatic potential of osteosarcoma and targeting this pathway for the treatment of osteosarcoma lung metastases. *Cancer Treat Res*. 2009;152:497-508.
221. Grange C., Tapparo M., Collino F. et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res*. 2011 Aug 1;71(15):5346-56.
222. Granot Z., Henke E., Comen E.A. et al. Tumor Entrained Neutrophils Inhibit Seeding in the Premetastatic Lung. *Cancer Cell*. 2011;20:300–314.
223. Green T.L., Cruse J.M., Lewis R.E. Circulating tumor cells (CTCs) from metastatic breast cancer patients linked to decreased immune function and response to treatment. *Exp. Mol. Pathol*. 2013;95:174–179.
224. Grillet F., Bayet E., Villeronce O. et al. Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in *ex vivo* culture. *Gut*. 2017 Oct;66(10):1802-1810.
225. Gruber I., Landenberger N., Staebler A. et al. Relationship between circulating tumor cells and peripheral T-cells in patients with primary breast cancer. *Anticancer Res*. 2013 May;33(5):2233-8.

226. Guan X., Ma F., Li C. et al. The prognostic and therapeutic implications of circulating tumor cell phenotype detection based on epithelial-mesenchymal transition markers in the first-line chemotherapy of HER2-negative metastatic breast cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2019 Jan 3;39(1):1. doi: 10.1186/s40880-018-0346-4.
227. Guibert N., Delaunay M., Lusque A. et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer* 2018, 120, 108–112.
228. Guinney J., Dienstmann R., Wang X. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21:1350–6.
229. Guitart A.V., Hammoud M., Dello Sbarba P. et al. Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp Hematol*. 2010 Oct;38(10):847-51.
230. Gül N., Babes L., Siegmund K. et al. Macrophages eliminate circulating tumor cells after monoclonal antibody therapy. *J. Clin. Investig*. 2014;124:812–823.
231. Guo B., Oliver T.G. Partners in Crime: Neutrophil-CTC Collusion in Metastasis. *Trends Immunol*. 2019 Jul;40(7):556-559.
232. Gupta P.B., Pastushenko I., Skibinski A. et al. Phenotypic plasticity: driver of cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Cell Stem Cell*. 2019; 24:65–78.
233. Haber D.A., Velculescu V.E. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov*. 2014 Jun;4(6):650-61.
234. Hackenberg M., Sturm M., Langenberger D. et al. miRanalyzer: a microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37, 68–76.
235. Hadad U., Thauland T.J., Martinez O.M. et al. NKp46 Clusters at the Immune Synapse and Regulates NK Cell Polarization. *Front Immunol*. 2015 Sep 25;6:495.
236. Hallermalm K., De Geer A., Kiessling R. et al. Autocrine secretion of Fas ligand shields tumor cells from Fas-mediated killing by cytotoxic lymphocytes. *Cancer Res*. 2004 Sep 15;64(18):6775-82.

237. Hamilton G., Rath B., Klameth L. et al. Small cell lung cancer: Recruitment of macrophages by circulating tumor cells. *OncoImmunology*. 2015;5:e1093277.
238. Hamm A., Prenen H., Van Delm W. et al. Tumour-educated circulating monocytes are powerful candidate biomarkers for diagnosis and disease follow-up of colorectal cancer. *Gut*. 2016 Jun;65(6):990-1000.
239. Hammer Q., Rückert T., Romagnani C. Natural killer cell specificity for viral infections. *Nat Immunol*. 2018 Aug;19(8):800-808.
240. Hanna N. Role of natural killer cells in control of cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1982;1:45–64.
241. Hanna R.N., Cekic C., Sag D. et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science*. 2015;350:985–990.
242. Hanssen A., Riebensahm C., Mohme M. et al. Frequency of Circulating Tumor Cells (CTC) in Patients with Brain Metastases: Implications as a Risk Assessment Marker in Oligo-Metastatic Disease. *Cancers (Basel)*. 2018 Dec 19;10(12):527.
243. Harada N., Mizoi T., Kinouchi M. et al. Introduction of antisense CD44S CDNA down-regulates expression of overall CD44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2001; 91(1):67–75.
244. Harper K.L., Sosa M.S., Entenberg D. et al. Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer. *Nature*. 2016 Dec 22;540(7634):588-592.
245. He H.Q., Ye R.D. The Formyl Peptide Receptors: Diversity of Ligands and Mechanism for Recognition. *Molecules*. 2017 Mar 13;22(3):455.
246. He H.W., Wang N.N., Yi X.M. et al. Low-level serum miR-24-2 is associated with the progression of colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2018 Feb 6;21(2):261-267.

247. He Y., Rozeboom L., Rivard C.J. et al. PD-1, PD-L1 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Relationship with Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Med Sci Monit.* 2017 Mar 9;23:1208-1216.
248. Heeke S., Mograbi B., Alix-Panabières C. et al. Never Travel Alone: The Crosstalk of Circulating Tumor Cells and the Blood Microenvironment. *Cells.* 2019 Jul 13;8(7):714.
249. Heiler S., Wang Z., Zöller M. Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes - the incentive push. *World J Gastroenterol.* 2016 Jul 14;22(26):5971-6007.
250. Hendricks A., Dall K., Brandt B. et al. Longitudinal Analysis of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer Patients by a Cytological and Molecular Approach: Feasibility and Clinical Application. *Front Oncol.* 2021 Jun 28;11:646885.
251. Hernández R., Sánchez-Jiménez E., Melguizo C. et al. Downregulated microRNAs in the colorectal cancer: diagnostic and therapeutic perspectives. *BMB Rep.* 2018 Nov;51(11):563-571.
252. Hernández-Camarero P., Jiménez G., López-Ruiz E. et al. Revisiting the dynamic cancer stem cell model: Importance of tumour edges. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018 Nov;131:35-45.
253. Hervieu C., Christou N., Battu S. et al. The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials. *Cancers (Basel).* 2021 Mar 4;13(5):1092.
254. Hinz S., Röder C., Tepel J. et al. Cytokeratin 20 positive circulating tumor cells are a marker for response after neoadjuvant chemoradiation but not for prognosis in patients with rectal cancer. *BMC Cancer.* 2015 Dec 16;15:953.
255. Hiraiwa K., Takeuchi H., Hasegawa H. et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol* 2008;15:3092–100.
256. Holah N.S., Aiad H.A., Asaad N.Y. et al. Evaluation of the Role of ALDH1 as Cancer Stem Cell Marker in Colorectal Carcinoma: An Immunohistochemical Study. *J Clin Diagn Res.* 2017 Jan;11(1):EC17-EC23.

257. Holowatyj A.N., Ruterbusch J.J., Rozek L.S. et al. Racial/ethnic disparities in survival among patients with young-onset colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2016;34:2148–56.
258. Hong Y., Fang F., Zhang Q. Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int J Oncol*. 2016 Dec;49(6):2206-2216.
259. Hongo T., Yamamoto H., Jiromaru R. et al. PD-L1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, mismatch repair deficiency, EGFR alteration and HPV infection in sinonasal squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2021 Nov;34(11):1966-1978. doi: 10.1038/s41379-021-00868-w.
260. Horst D., Kriegl L., Engel J. et al. Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Invest*. 2009 Oct;27(8):844-50.
261. Horst D., Scheel S.K., Liebmann S. et al. The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *J. Pathol*. 2009;219:427–434.
262. Hosseini H., Obradović M.M.S., Hoffmann M. et al. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*. 2016 Dec 22;540(7634):552-558.
263. Hou Y., Liu Y., Zhao X. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 in colon cancer. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(7):574–7.
264. Hsu J.M., Xia W., Hsu Y.H. et al. STT3-dependent PD-L1 accumulation on cancer stem cells promotes immune evasion. *Nat Commun*. 2018 May 15;9(1):1908.
265. Hu J.L., He G.Y., Lan X.L. et al. et al. Inhibition of ATG12-mediated autophagy by miR-214 enhances radiosensitivity in colorectal cancer. *Oncogenesis*. 2018 Feb 20;7(2):16.
266. Huang B.Y., Zhan Y.P., Zong W.J. et al. The PD-1/B7-H1 pathway modulates the natural killer cells versus mouse glioma stem cells. *PLoS One*. 2015 Aug 12;10(8):e0134715.
267. Huang C.Y., Chiang S.F., Ke T.W. et al. Clinical significance of programmed death 1 ligand-1 (CD274/PD-L1) and intra-tumoral CD8+ T-cell infiltration in stage II-III colorectal cancer. *Sci Rep*. 2018 Oct 23;8(1):15658).

268. Huang M.Y., Tsai H.L., Huang J.J. et al. Clinical Implications and Future Perspectives of Circulating Tumor Cells and Biomarkers in Clinical Outcomes of Colorectal Cancer. *Transl Oncol.* 2016;9:340–347.
269. Huang R., Zong X. Aberrant cancer metabolism in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis: Mechanisms in cancer progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017 Jul;115:13-22.
270. Huang W., Ran R., Shao B. et al. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Nov;178(1):17-33.
271. Huang X., Gao P., Song Y. et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2015;15:202.
272. Huang Y., Ma C., Zhang Q. et al. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget.* 2015 Jul 10;6(19):17462-78.
273. Huang Y., Song N., Ding Y. et al. Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis. *Cancer Res.* 2009 Oct 1;69(19):7529-37.
274. Hudspeth K., Donadon M., Cimino M. et al. Human liver-resident CD56(bright)/CD16(neg) NK cells are retained within hepatic sinusoids via the engagement of CCR5 and CXCR6 pathways. *J Autoimmun.* 2016 Jan;66:40-50.
275. Hwang W.L., Jiang J.K., Yang S.H. et al. MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells. *Nat Cell Biol.* 2014 Mar;16(3):268-80.
276. Ikeda M., Koh Y., Teraoka S. et al. Detection of AXL expression in circulating tumor cells of lung cancer patients using an automated microcavity array system. *Cancer Med.* 2020;9:2122–2133.
277. Irani S., Shokri G. The Role of miR-143, miR-145, and miR-590 in Expression Levels of CD44 and Vascular Endothelial Cadherin in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Middle East Journal of Cancer.* 2019; 10(3): 194-204.

278. Ishaque N., Abba M.L., Hauser C. Whole genome sequencing puts forward hypotheses on metastasis evolution and therapy in colorectal cancer. *Nat Commun.* 2018 Nov 14;9(1):4782.
279. Ishikawa T., Okayama T., Sakamoto N. et al. Phase I clinical trial of adoptive transfer of expanded natural killer cells in combination with IgG1 antibody in patients with gastric or colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2018 Jun 15;142(12):2599-2609.
280. Islam F., Gopalan V., Smith R.A. et al. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res.* 2015 Jul 1;335(1):135-47.
281. Isvoranu G., Surcel M., Huică R.I. et al. Natural killer cell monitoring in cutaneous melanoma - new dynamic biomarker. *Oncol Lett.* 2019 May;17(5):4197-4206.
282. Jaeger B.A., Jueckstock J., Andergassen U. et al. Evaluation of two different analytical methods for circulating tumor cell detection in peripheral blood of patients with primary breast cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:491459.
283. Jia S., Zhang R., Li Z., et al. Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8:55632-45.
284. Jiang H., Lin X., Liu Y. et al. Transformation of epithelial ovarian cancer stemlike cells into mesenchymal lineage via EMT results in cellular heterogeneity and supports tumor engraftment. *Mol Med.* 2012 Oct 24;18(1):1197-208.
285. Jiang P., Lagenaur C.F., Narayanan V. Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule. *J Biol Chem.* 1999 Jan 8;274(2):559-62.
286. Jiménez G., Hackenberg M., Catalina P. et al. Mesenchymal stem cell's secretome promotes selective enrichment of cancer stem-like cells with specific cytogenetic profile. *Cancer Lett.* 2018 Aug 10;429:78-88.
287. Jing F., Kim H.J., Kim C.H. et al. Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. *Int J Oncol.* 2015 Apr;46(4):1582-8.



288. Jobin G., Rodriguez-Suarez R., Betito K. Association Between Natural Killer Cell Activity and Colorectal Cancer in High-Risk Subjects Undergoing Colonoscopy. *Gastroenterology*. 2017 Oct;153(4):980-987.
289. Jolly M.K., Mani S.A., Levine H. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): The 'fittest' for metastasis? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018 Dec;1870(2):151-157.
290. Jones E., Oliphant E., Peterson P. SciPy: Open source scientific tools for python. 2001. Available at: <http://www.scipy.org/>.
291. Joosse S.A., Gorges T.M., Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med* 2014; 7:1-11.
292. Joyce J.A., Pollard J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):239-52.
293. Junttila M.R., Mao W., Wang X. et al. Targeting LGR5+ cells with an antibody–drug conjugate for the treatment of colon cancer. *Sci. Transl. Med* 2015; 7(314): 314ra186.
294. Kallergi G., Markomanolaki H., Giannoukaraki V. et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2009;11(6):R84.
295. Kandimalla R., Gao F., Matsuyama T. et al. Genome-wide Discovery and Identification of a Novel miRNA Signature for Recurrence Prediction in Stage II and III Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2018 Aug 15;24(16):3867-3877.
296. Kanikarla-Marie P., Lam M., Menter D.G. et al. Platelets, circulating tumor cells, and the circulome. *Cancer Metastasis Rev*. 2017 Jun;36(2):235-248.
297. Kannan G.S., Aquino-Lopez A., Lee D.A. Natural killer cells in malignant hematology: A primer for the non-immunologist. *Blood Rev*. 2017 Mar;31(2):1-10.
298. Kasthuber E.R., Lowe S.W. Putting p53 in context. *Cell* 2017;170:1062–78.
299. Kawakita A., Yanamoto S., Yamada S. et al. MicroRNA-21 promotes oral cancer invasion via the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway by targeting DKK2. *Pathol Oncol Res*. 2014;20(2):253-61.

300. Kersten K., Coffelt S.B., Hoogstraat M. et al. Mammary tumor-derived CCL2 enhances pro-metastatic systemic inflammation through upregulation of IL1 $\beta$  in tumor-associated macrophages. *OncoImmunology*. 2017;6:e1334744.
301. Keum N., Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec;16(12):713-732.
302. Khelwatty S.A., Essapen S., Bagwan I. et al. Co-expression and prognostic significance of putative CSC markers CD44, CD133, wild-type EGFR and EGFRvIII in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2019 Mar 1;10(18):1704-1715.
303. Kidess-Sigal E., Liu H.E., Triboulet M.M. et al. Enumeration and targeted analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA mutations in CTCs captured by a label-free platform: Comparison to ctDNA and tissue in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7:85349–64.
304. Kim C., Hong Y., Lee H. et al. MicroRNA-195 desensitizes HCT116 human colon cancer cells to 5-fluorouracil. *Cancer Lett*. 2018 Jan 1;412:264-271.
305. Kim H.M., Lee J., Koo J.S. Clinicopathological and prognostic significance of programmed death ligand-1 expression in breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2017 Oct 17;17(1):690.
306. Kim H.R., Ha S.J., Hong M.H. et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep*. 2016 Nov 14;6:36956.
307. Kim H.R., Wheeler M.A., Wilson C.M. et al. Hylaronan facilitates invasion of colon carcinoma cells in vitro via interaction with CD44. *Cancer Res*. 2004;64:4569–4576.
308. Kim W.T., Ryu C.J. Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Rep*. 2017;50:285–98.
309. Klein C.A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):302-12.
310. Koch J., Steinle A., Watzl C. et al. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol*. 2013 Apr;34(4):182-91.

311. Koch M., Kienle P., Hinz U. et al. Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2005;241:199–205.
312. Kong D., Zhang D., Chu X. et al. Schizandrin A enhances chemosensitivity of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil through up-regulation of miR-195. *Biomed Pharmacother.* 2018 Mar;99:176-183.
313. Kopetz S., McDonough S.L., Lenz H-J. et al. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer (SWOG S1406). *J Clin Oncol.* 2021 Feb 1;39(4):285-294. doi: 10.1200/JCO.20.01994.
314. Korkaya H., Liu S., Wicha M.S. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest.* 2011 Oct;121(10):3804-9.
315. Krebs A.M., Mitschke J., Lasierra Losada M. et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol.* 2017 May;19(5):518-529.
316. Krijgsman D., de Vries N.L., Skovbo A. et al. Characterization of circulating T-, NK-, and NKT cell subsets in patients with colorectal cancer: the peripheral blood immune cell profile. *Cancer Immunol Immunother.* 2019 Jun;68(6):1011-1024.
317. Kulasinghe A., Kapeleris J., Kimberley R. et al. The prognostic significance of circulating tumor cells in head and neck and non-small-cell lung cancer. *Cancer Med.* 2018;7(12):5910–5919.
318. Kunihiro H., Kornelia P. Intratumoral Heterogeneity: More Than Just Mutations *Trends Cell Biol.* 2019 Jul;29(7):569-579.
319. Kuşoğlu A., Biray Avcı Ç. Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene.* 2019 Jan 10;681:80-85.
320. Lambert A.W., Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. Emerging biological principles of metastasis. *Cell.* 2017;168:670–691.
321. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Mar;15(3):178-96.

322. Lawson D.A., Kessenbrock K., Davis R.T. et al. Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nat. Cell Biol.* 2018; 20: 1349–1360.
323. Le D.T., Uram J.N., Wang H. et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372:2509–20.
324. Leblanc R., Peyruchaud O. Metastasis: new functional implications of platelets and megakaryocytes. *Blood.* 2016 Jul 7;128(1):24-31.
325. Legrand N., Huntington N.D., Nagasawa M. et al. Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha)) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo .*Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:13224–9.
326. Lehmann W., Mossmann D., Kleemann J. et al. ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types. *Nat Commun.* 2016 Feb 15;7:10498.
327. Leone K., Poggiana C., Zamarchi R. The Interplay between Circulating Tumor Cells and the Immune System: From Immune Escape to Cancer Immunotherapy. *Diagnostics (Basel).* 2018 Aug 30;8(3):59.
328. Levy E.M., Bianchini M., Von Euw E.M., et al. Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2008 Mar;32(3):633-41).
329. Li J., Chen Y., Zhao J. et al. miR-203 reverses chemoresistance in p53-mutated colon cancer cells through downregulation of Akt2 expression. *Cancer Lett.* 2011 May 1;304(1):52-9.
330. Li J., Du L., Yang Y. et al. MiR-429 is an independent prognostic factor in colorectal cancer and exerts its anti-apoptotic function by targeting SOX2. *Cancer Lett.* 2013 Feb 1;329(1):84-90.
331. Li L., Chen K., Xiang Y., et al. New development in studies of formyl-peptide receptors: critical roles in host defense. *J Leukoc Biol.* 2016 Mar;99(3):425-35.
332. Li M., Zhang B., Zhang Z. et al. Stem cell-like circulating tumor cells indicate poor prognosis in gastric cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:981261.

333. Li W.J., Wang Y., Liu R. et al. MicroRNA-34a: Potent Tumor Suppressor, Cancer Stem Cell Inhibitor, and Potential Anticancer Therapeutic. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Mar 8;9:640587.
334. Li X., Wetherilt C.S., Krishnamurti U. et al. Stromal PD-L1 Expression Is Associated With Better Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *Am J Clin Pathol.* 2016 Oct;146(4):496-502.
335. Li Y., Sun Z., Liu B. et al. Tumor-suppressive miR-26a and miR-26b inhibit cell aggressiveness by regulating FUT4 in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2017 Jun 22;8(6):e2892.
336. Li Y., Wang P., Wu L.L. et al. miR-26a-5p Inhibit Gastric Cancer Cell Proliferation and Invasion Through Mediated Wnt5a. *Onco Targets Ther.* 2020 Mar 27;13:2537-2550.
337. Liao T.T., Yang M.H. Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness. *Mol Oncol.* 2017 Jul;11(7):792-804.
338. Lin C.C., Liao T.T., Yang M.H. Immune Adaptation of Colorectal Cancer Stem Cells and Their Interaction With the Tumor Microenvironment. *Front Oncol.* 2020 Nov 18;10:588542. doi: 10.3389/fonc.2020.588542.
339. Lindemans C.A., Calafiore M., Mertelsmann A.M. et al. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature.* 2015 Dec 24;528(7583):560-564.
340. Liu D., Sun J., Zhu J. et al. Expression and clinical significance of colorectal cancer stem cell marker EpCAM<sup>high</sup>/CD44<sup>+</sup> in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2014 May;7(5):1544-1548.
341. Liu G.H., Zhou Z.G., Chen R. et al. Serum miR-21 and miR-92a as biomarkers in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2013 Aug;34(4):2175-81.
342. Liu J., Liu F., Li X. et al. Screening key genes and miRNAs in early-stage colon adenocarcinoma by RNA-sequencing. *Tumour Biol.* 2017 Jul;39(7):1010428317714899.

343. Liu Q., Liao Q., Zhao Y. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) facilitate distant metastasis of malignancies by shielding circulating tumor cells (CTC) from immune surveillance. *Med Hypotheses*. 2016 Feb;87:34-9.
344. Liu R.Y., Zeng Y., Lei Z. et al. JAK/STAT3 signaling is required for TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *Int J Oncol*. 2014 May;44(5):1643-51.
345. Liu T., Zhang L., Joo D. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023–6.
346. Liu X., Taftaf R., Kawaguchi M. et al. Homophilic CD44 interactions mediate tumor cell aggregation and polyclonal metastasis in patient-derived breast cancer models. *Cancer Discov*. 2019;9:96–113.
347. Liu Y., Hu X., Hu L. et al. Let-7i-5p enhances cell proliferation, migration and invasion of ccRCC by targeting HABP4. *BMC Urol*. 2021 Mar 28;21(1):49.
348. Liu Z., Kuang W., Zhou Q. et al. TGF- $\beta$ 1 secreted by M2 phenotype macrophages enhances the stemness and migration of glioma cells via the SMAD2/3 signalling pathway. *Int J Mol Med*. 2018 Dec;42(6):3395-3403.
349. Loh C.-Y., Chai J.Y., Tang T.F. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*. 2019;8:1118.
350. Long X., Ye Y., Zhang L. et al. IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review). *Int J Oncol*. 2016 Jan;48(1):5-12.
351. López-Soto A., Gonzalez S., Smyth M.J. et al. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell*. 2017;32:135–154.
352. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15, 550.
353. Lu Y.X., Yuan.L, Xue X.L. et al. Regulation of colorectal carcinoma stemness, growth, and metastasis by an miR-200c-Sox2-negative feedback loop mechanism. *Clin Cancer Res*. 2014 May 15;20(10):2631-42.

354. Łukaszewicz-Zajac M., Mroczko B., Kozłowski M. et al. Higher importance of interleukin 6 than classic tumor markers (carcinoembryonic antigen and squamous cell cancer antigen) in the diagnosis of esophageal cancer patients. *Dis Esophagus*. 2012 Apr;25(3):242-9.
355. Lundgren P., Thaiss C.A. The microbiome-adipose tissue axis in systemic metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2020 Apr 1;318(4):G717-G724.
356. Luo X., Wu Y., Ji M. et al. Combined Plasma MicroRNA and Fecal Occult Blood Tests in Early Detection of Colorectal Cancer. *Clin Lab*. 2019 May 1;65(5).
357. Ma L., Dong L., Chang P. CD44v6 engages in colorectal cancer progression. *Cell Death Dis*. 2019 Jan 10;10(1):30.
358. Maas M., Hegemann M., Rausch S. et al. Circulating tumor cells and their role in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2017 Aug 22;21(1):24–31.
359. Madison B.B., Jeganathan A.N., Mizuno R. et al. Let-7 Represses Carcinogenesis and a Stem Cell Phenotype in the Intestine via Regulation of Hmga2. *PLoS Genet*. 2015 Aug 5;11(8):e1005408.
360. Mager L.F., Wasmer M.H., Rau T.T. et al. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2016 Apr 19;6:96.
361. Malki A., ElRuz R.A., Gupta I. et al. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 24;22(1):130.
362. Mannino M.H., Zhu Z., Xiao H. et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett*. 2015 Oct 28;367(2):103-7.
363. Mansour F.A., Al-Mazrou A., Al-Mohanna F. et al. PD-L1 is overexpressed on breast cancer stem cells through notch3/mTOR axis. *Oncoimmunology*. 2020 Mar 3;9(1):1729299.
364. Mantovani A., Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp Med*. 2015 Apr 6;212(4):435-45.
365. Marisa L., Ayadi M., Balogoun R. et al. Clinical utility of colon cancer molecular subtypes: validation of two main colorectal molecular classifications on the PETACC-8 phase III trial cohort. *J Clin Oncol* 2017;35:3509.

366. Markopoulos G.S, Roupakia E., Tokamani M. et al. Roles of NF- $\kappa$ B Signaling in the Regulation of miRNAs Impacting on Inflammation in Cancer. *Biomedicines*. 2018;6(2):40.
367. Marzagalli M., Fontana F., Raimondi M. et al. Cancer Stem Cells-Key Players in Tumor Relapse. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 20;13(3):376.
368. Massagué J., Obenauf A.C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016 Jan 21;529(7586):298-306.
369. Masugi Y., Nishihara R., Yang J. et al. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cells in colorectal cancer. *Gut*. 2017 Aug;66(8):1463-1473
370. Mathieu J., Zhang Z., Zhou W. et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res*. 2011 Jul 1;71(13):4640-52.
371. Matsusaka S., Suenaga M., Mishima Y. et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci* 2011;102(6):1188–1192.
372. Mattner J., Wirtz S. Friend or Foe? The Ambiguous Role of Innate Lymphoid Cells in Cancer Development. *Trends Immunol*. 2017 Jan;38(1):29-38.
373. Mazumdar J., O'Brien W.T., Johnson R.S. et al. O<sub>2</sub> regulates stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nat Cell Biol*. 2010 Oct;12(10):1007-13.
374. al. Circulating Tumor Cells (CTC) Are Associated with Defects in Adaptive Immunity in Patients with Inflammatory Breast Cancer. *J. Cancer*. 2016;7:1095–1104.
375. Meng C., Bai C., Brown T.D. et al. Human Gut Microbiota and Gastrointestinal Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2018 Feb;16(1):33-49.
376. Meng W.J., Yang L., Ma Q. et al. MicroRNA Expression Profile Reveals miR-17-92 and miR-143-145 Cluster in Synchronous Colorectal Cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Aug;94(32):e1297.
377. Mescoli C., Albertoni L., Pucciarelli S. et al. Isolated tumor cells in regional lymph nodes as relapse predictors in stage I and II colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:965–71.



378. Michael M.Z., O' Connor S.M., van Holst Pellekaan N.G. et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003 Oct;1(12):882-91.
379. Michel T., Poli A., Cuapio A. et al. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol.* 2016 Apr 1;196(7):2923-31.
380. Miklikova S., Minarik G., Sedlackova T. et al. Inflammation-Based Scores Increase the Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2020 May 1;12(5):1134.
381. Minoo P., Zlobec I., Peterson M. et al. Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. *Int J Oncol* 2010;37:707-18.
382. Mita Y., Kimura M.Y., Hayashizaki K. et al. Crucial role of CD69 in anti-tumor immunity through regulating the exhaustion of tumor-infiltrating T cells. *Int Immunol.* 2018 Nov 14;30(12):559-567.
383. Mitra A., Mishra L., Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget.* 2015;6:10697-711.
384. Mogilyansky E., Rigoutsos I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ.* 2013 Dec;20(12):1603-14.
385. Moharil R.B., Dive A., Khandekar S. et al. Cancer stem cells: An insight. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2017 Sep-Dec;21(3):463.
386. Molina-Cerrillo J., San Román M., Pozas J. et al. BRAF Mutated Colorectal Cancer: New Treatment Approaches. *Cancers (Basel).* 2020 Jun 14;12(6):1571.
387. Mollinedo F. Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis. *Trends Immunol.* 2019 Mar;40(3):228-242.
388. Molnar B., Ladanyi A., Tanko L. et al. Circulating tumor cellclusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001;7:4080–5.

389. Monzo M., Navarro A., Bandres E. et al. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res.* 2008 Aug;18(8):823-33.
390. Muftuoglu Y., Pajonk F. Targeting Glioma Stem Cells. *Neurosurg Clin N Am.* 2021 Apr;32(2):283-289.
391. Muinao T., Deka Boruah H.P., Pal M. Diagnostic and Prognostic Biomarkers in ovarian cancer and the potential roles of cancer stem cells - An updated review. *Exp Cell Res.* 2018 Jan 1;362(1):1-10.
392. Munro M.J., Wickremesekera S.K., Peng L. et al. Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *J Clin Pathol.* 2018 Feb;71(2):110-116.
393. Muşină A.M., Zlei M., Mentel M. et al. Evaluation of circulating tumor cells in colorectal cancer using flow cytometry. *J Int Med Res.* 2021 Sep;49(9):300060520980215. doi: 10.1177/0300060520980215.
394. Nagahara M., Mimori K., Kataoka A. et al. Correlated expression of CD47 and SIRPA in bone marrow and in peripheral blood predicts recurrence in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2010 Sep 15;16(18):4625-35.
395. Nagy Á., Lánckzy A., Menyhárt O. et al. Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Sci Rep.* 2018;8(1):9227.
396. Najafi M., Farhood B., Mortezaee K. Cancer Stem Cells (CSCs) in Cancer Progression and Therapy. *J. Cell. Physiol.* 2019;234:8381–8395.
397. Navarro M., Nicolas A., Ferrandez A. et al. Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: an update. *World J Gastroenterol.* 2017; 23: 3632-3642.
398. Nawshad A., Lagamba D., Polad A. et al. Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs.* 2005;179(1-2):11-23.
399. Naxerova K., Reiter J.G., Brachtel E. et al. Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer. *Science.* 2017 Jul 7;357(6346):55-60.

400. Nazemalhosseini-Mojarad E., Mohammadpour S., Torshizi Esafahani A. et al. Intratumoral infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in colorectal cancer patients: Independent of oncogenetic features. *J Cell Physiol.* 2019 Apr;234(4):4768-4777.
401. Negin B.P., Cohen S.J. Circulating tumor cells in colorectal cancer: past, present, and future challenges. *Curr Treat Options Oncol.* 2010 Jun;11(1-2):1-13.
402. Nersesian S., Glazebrook H., Toulany J. et al. Naturally Killing the Silent Killer: NK Cell-Based Immunotherapy for Ovarian Cancer. *Front Immunol.* 2019 Aug 9;10:1782.
403. Nicolazzo C., Raimondi C., Mancini M. et al. Monitoring PD-L1 positive circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients treated with the PD-1 inhibitor Nivolumab. *Sci Rep.* 2016;6:31726.
404. Nishida N., Nagahara M., Sato T. et al. Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic miRNA clusters. *Clin Cancer Res.* 2012 Jun 1;18(11):3054-70.
405. Nomura Y., Yamashita T., Oishi N. et al. De Novo Emergence of Mesenchymal Stem-Like CD105+ Cancer Cells by Cytotoxic Agents in Human Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol.* 2017 Apr;10(2):184-189.
406. Novellademunt L., Antas P., Li V.S. Targeting wnt signaling in colorectal cancer. A review in the theme: cell signaling: proteins, pathways, and mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 309(8): C511–C521.
407. Nurgali K., Jagoe R.T., Abalo R. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Front Pharmacol.* 2018 Mar 22;9:245.
408. O'Donnell J.S., Teng M.W.L., Smyth M.J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019 Mar;16(3):151-167.
409. Olingy C.E., Dinh H.Q., Hedrick C.C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol.* 2019 Aug;106(2):309-322.

410. Onda M., Kobayashi K., Pastan I. Depletion of regulatory T cells in tumors with an anti-CD25 immunotoxin induces CD8 T cell-mediated systemic antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Mar 5;116(10):4575-4582.
411. Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur. J. Cancer*. 2010;46:1271–1277.
412. Oskarsson T., Batlle E., Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell* 2014; 14:306-21.
413. Ostenfeld M.S., Jeppesen D.K., Laurberg J.R. et al. Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res*. 2014 Oct 15;74(20):5758-71.
414. Ou B., Zhao J., Guan S., Lu A. Survival of Colorectal Cancer in Patients With or Without Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *Dig Dis Sci*. 2016 Mar;61(3):881-9.
415. Padua D., Massagué J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res*. 2009 Jan;19(1):89-102.
416. Pagès F., Mlecnik B., Marliot F. et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*. 2018;391(10135):2128–2139.
417. Pan B., Shen J., Cao J., Zhou Y. et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Sci. Rep*. 2015;5:16053.
418. Pan G., Liu Y., Shang L. et al. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance. *Cancer Commun (Lond)*. 2021 Mar;41(3):199-217.
419. Pan R.J., Hong H.J., Sun J. et al. Detection and Clinical Value of Circulating Tumor Cells as an Assisted Prognostic Marker in Colorectal Cancer Patients. *Cancer Manag Res*. 2021 Jun 8;13:4567-4578.
420. Pang R., Law W.L., Chu A.C. et al. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell*. 2010 Jun 4;6(6):603-15.

421. Pantel K., Alix-Panabières C., Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Jun;6(6):339-51.
422. Pantel K., Brakenhoff R.H., Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008 May;8(5):329-40.
423. Pantel K., Brakenhoff R.H., Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008 May;8(5):329-40.
424. Pantel K., Speicher M.R. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene*. 2016 Mar 10;35(10):1216-24.
425. Papadaki M.A., Stoupis G., Theodoropoulos P.A. et al. Circulating tumor cells with stemness and epithelial-to-mesenchymal transition features are chemoresistant and predictive of poor outcome in metastatic breast cancer. *Mol. Cancer Ther*. 2019;18:437–447.
426. Park I.J., Yu C.S., Lim S.B. et al. Ratio of metastatic lymph nodes is more important for rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 21;21(11):3274-81.
427. Park J., Wysocki R.W., Amoozgar Z. et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci. Transl. Med*. 2016;8:361ra138.
428. Pastushenko I., Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol*. 2019 Mar;29(3):212-226.
429. Peach G., Kim C., Zacharakis E. et al. Prognostic significance of circulating tumour cells following surgical resection of colorectal cancers: a systematic review. *Br J Cancer* 2010;102:1327–34.
430. Peltier H.J., Latham G.J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. 2008 May;14(5):844-52.
431. Pernet S., Terme M., Voron T. et al. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 14;20(14):3738-50.

432. Petitprez F., Fossati N., Vano Y. et al. PD-L1 Expression and CD8+ T-cell Infiltrate are Associated with Clinical Progression in Patients with Node-positive Prostate Cancer. *Eur Urol Focus*. 2019 Mar;5(2):192-196.
433. Picard E., Verschoor C.P., Ma G.W. et al. Relationships Between Immune Landscapes, Genetic Subtypes and Responses to Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2020 Mar 6;11:369.
434. Pichler M., Ress A.L., Winter E. et al. MiR-200a regulates epithelial to mesenchymal transition-related gene expression and determines prognosis in colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2014 Mar 18;110(6):1614-21.
435. Pitroda S.P., Chmura S.J., Weichselbaum R.R. Integration of radiotherapy and immunotherapy for treatment of oligometastases. *Lancet Oncol*. 2019;20(8):e434–e442.
436. Placke T., Örgel M., Schaller M. et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res*. 2012 Jan 15;72(2):440-8.
437. Plaks V, Kong NW, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell* 2015; 16:225-38.
438. Plantureux L., Crescence L., Dignat-George F. et al. Effects of platelets on cancer progression. *Thromb Res*. 2018 Apr;164 Suppl 1:S40-S47.
439. Poltavets V., Kochetkova M., Pitson S.M. et al. The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. *Front. Oncol.* (2018) 8:431.
440. Pretzsch E., Bösch F., Neumann J. et al. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *J Oncol*. 2019 Sep 19;2019:7407190.
441. Puglisi M.A., Tesori V., Lattanzi W. et al. Colon cancer stem cells: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2013 May 28;19(20):2997-3006.
442. Qian X., Yu J., Yin Y. et al. MicroRNA-143 inhibits tumor growth and angiogenesis and sensitizes chemosensitivity to oxaliplatin in colorectal cancers. *Cell Cycle*. 2013 May 1;12(9):1385-94.

443. Rahbari N.N., Aigner M., Thorlund K. et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 May;138(5):1714-26.
444. Rahbari N.N., Bork U., Kircher A. et al. Compartmental differences of circulating tumor cells in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2195–202.
445. Rahbari N.N., Bork U., Motschall E. et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2012 Jan 1;30(1):60-70. doi: 10.1200/JCO.2011.36.9504.
446. Rammer M., Webersinke G., Haitchi-Petnehazy S. et al. MicroRNAs and their role for T stage determination and lymph node metastasis in early colon carcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2017 Oct;34(6-7):431-440.
447. Rassouli F.B., Matin M.M., Saeinasab M. Cancer stem cells in human digestive tract malignancies. *Tumour Biol*. 2016 Jan;37(1):7-21.
448. Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):111-5.
449. Riethdorf S., O'Flaherty L., Hille C. et al. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018 Feb 1;125:102-121.
450. Roelands J., Kuppen P., Vermeulen L. et al. Immunogenomic classification of colorectal cancer and therapeutic implications. *Int J Mol Sci* 2017;18:2229.
451. Romano G. Modalities to enumerate circulating tumor cells in the bloodstream for cancer prognosis and to monitor the response to the therapy. *Drugs Today (Barc)*. 2017 Sep;53(9):501-514.
452. Rong J., Xu L., Hu Y. et al. Inhibition of let-7b-5p contributes to an anti-tumorigenic macrophage phenotype through the SOCS1/STAT pathway in prostate cancer. *Cancer Cell Int*. 2020 Sep 29;20:470.
453. Rossi E., Fabbri F. CTCs 2020: Great Expectations or Unreasonable Dreams. *Cells*. 2019 Aug 27;8(9):989.

454. Rothé F., Maetens M., Rouas G. et al. CTCs as a prognostic and predictive biomarker for stage II/III Colon Cancer: a companion study to the PePiTA trial. *BMC Cancer*. 2019 Apr 3;19(1):304.
455. Rovida E., Peppicelli S., Bono S. et al. The metabolically-modulated stem cell niche: a dynamic scenario regulating cancer cell phenotype and resistance to therapy. *Cell Cycle*. 2014;13(20):3169-75.
456. Rozek L.S., Schmit S.L., Greenon J.K. et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Crohn's-Like Lymphoid Reaction, and Survival From Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016 May 12;108(8):djw027.
457. Sai B., Xiang J. Disseminated tumour cells in bone marrow are the source of cancer relapse after therapy. *J Cell Mol Med*. 2018 Dec;22(12):5776-5786.
458. Sakuma K., Sasaki E., Kimura K. et al. HNRNPLL, a newly identified colorectal cancer metastasis suppressor, modulates alternative splicing of CD44 during epithelial-mesenchymal transition. *Gut*. 2018 Jun;67(6):1103-1111.
459. Sansone P., Berishaj M., Rajasekhar V.K. et al. Evolution of Cancer Stem-like Cells in Endocrine-Resistant Metastatic Breast Cancers Is Mediated by Stromal Microvesicles. *Cancer Res*. 2017 Apr 15;77(8):1927-1941.
460. Santos M.F., Mannam V.K.R., Craft B.S. et al. Comparative analysis of innate immune system function in metastatic breast, colorectal, and prostate cancer patients with circulating tumor cells. *Exp. Mol. Pathol*. 2014;96:367–374.
461. Saraiva A.L., Carneiro F. New Insights Into the Role of Tissue Eosinophils in the Progression of Colorectal Cancer: A Literature Review. *Acta Med Port*. 2018 Jun 29;31(6):329-337.
462. Saridaki Z., Weidhaas J.B., Lenz H.J. et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in KRAS predicts improved outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with salvage cetuximab/panitumumab monotherapy. *Clin Cancer Res*. 2014 Sep 1;20(17):4499-4510.
463. Sastre J., Maestro M.L., Puente J. et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Ann Oncol* 2008;19(5):935–938.



464. Saunders M., Iveson T. Management of advanced colorectal cancer: state of the art. *Br J Cancer*. 2006 Jul 17;95(2):131-8.
465. Saute's-Fridman C., Lawand M., Giraldo N.A. et al. Tertiary lymphoid structures in cancers: prognostic value, regulation, and manipulation for therapeutic intervention. *Front Immunol*. 2016;7:407.
466. Seeberg L.T., Waage A., Brunborg C. et al. Circulating tumor cells in patients with colorectal liver metastasis predict impaired survival. *Ann Surg*. 2015 Jan;261(1):164-71.
467. Shah A., Patel S., Pathak J. et al. The evolving concepts of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Scientific World Journal*. 2014 Jan 21;2014:842491.
468. Shevyrev D., Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol*. 2020 Jan 14;10:3100.
469. Shibata M., Hoque M.O. Targeting Cancer Stem Cells: A Strategy for Effective Eradication of Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 May 27;11(5):732.
470. Shinoda K., Tokoyoda K., Hanazawa A. et al. Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 8;109(19):7409-14.
471. Shintani Y., Abulaiti A., Kimura T. et al. Pulmonary fibroblasts induce epithelial mesenchymal transition and some characteristics of stem cells in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2013 Aug;96(2):425-33.
472. Shojaei F., Wu X., Qu X. et al. G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106:6742–6747.
473. Sia D., Jiao Y., Martinez-Quetglas I. et al. Identification of an immune-specific class of hepatocellular carcinoma, based on molecular features. *Gastroenterology* 2017, 153:812-826.
474. Siegel R.L., Miller K.D., Goding Sauer A. et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 May;70(3):145-164.

475. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017 Jan;67(1):7-30.
476. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019 Jan;69(1):7-34.
477. Siegel R.L., Miller K.D., Fedewa S.A. et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017 May 6;67(3):177-193.
478. Siegel R.L., Torre L.A., Soerjomataram I. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults. *Gut.* 2019 Dec;68(12):2179-2185.
479. Sim G.C., Martin-Orozco N., Jin L. et al. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS<sup>+</sup> Treg expansion in melanoma patients. *J Clin Invest.* 2014 Jan;124(1):99-110.
480. Simanshu D.K., Nissley D.V., McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell* 2017;170:17–33.
481. Simeone P., Trerotola M., Franck J. et al. The multiverse nature of epithelial to mesenchymal transition. *Semin Cancer Biol.* 2019 Oct;58:1-10.
482. Singh S., Arcaroli J., Thompson D.C. et al. Acetaldehyde and retinaldehyde-metabolizing enzymes in colon and pancreatic cancers. *Adv Exp Med Biol* 2015;815:281–294.
483. Siravegna G., Marsoni S., Siena S. et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14:531–548.
484. Sistigu A., Di Modugno F., Manic G. et al. Deciphering the loop of epithelial-mesenchymal transition, inflammatory cytokines and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017 Aug;36:67-77.
485. Sleeman J.P. The lymph node pre-metastatic niche. *J Mol Med (Berl).* 2015 Nov;93(11):1173-84.
486. Sneath R.J., Mangham D.C. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol.* 1998;51(4):191–200.
487. Sojka D.K., Tian Z., Yokoyama W.M. Tissue-resident natural killer cells and their potential diversity. *Semin Immunol.* 2014 Apr;26(2):127-31.

488. Solinas C., Pusole G., Demurtas L. et al. Tumor infiltrating lymphocytes in gastrointestinal tumors: Controversies and future clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017 Feb;110:106-116.
489. Song J., Wang L., Ma Q. et al. Let-7i-5p inhibits the proliferation and metastasis of colon cancer cells by targeting kallikrein-related peptidase 6. *Oncol Rep.* 2018 Sep;40(3):1459-1466.
490. Spicer J.D., McDonald B., Cools-Lartigue J.J. et al. Neutrophils Promote Liver Metastasis via Mac-1-Mediated Interactions with Circulating Tumor Cells. *Cancer Res.* 2012;72:3919–3927.
491. Spira A., Yurgelun M.B., Alexandrov L. et al. Precancer atlas to drive precision prevention trials. *Cancer Res.* 2017; 77:1510–1541.
492. Srinivasan T., Walters J., Bo P. et al. NOTCH signaling regulates asymmetric cell fate of fast- and slow-cycling colon cancer initiating cells. *Cancer Res.* 2016;76:3411–3421.
493. Stabile H., Fionda C., Gismondi A. et al. Role of Distinct Natural Killer Cell Subsets in Anticancer Response. *Front Immunol.* 2017 Mar 16;8:293.
494. Stabile H., Fionda C., Santoni A. et al. Impact of bone marrow-derived signals on NK cell development and functional maturation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018 Aug;42:13-19.
495. Stanzer S., Dandachi N., Balic M. et al. Resistance to Apoptosis and Expansion of Regulatory T Cells in Relation to the Detection of Circulating Tumor Cells in Patients with Metastatic Epithelial Cancer. *J. Clin. Immunol.* 2007;28:107–114.
496. Steinert G., Scholch S., Niemietz T. et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res.* 2014;74:1694–1704.
497. Stemmler M.P., Eccles R.L., Brabletz S. et al. Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nat. Cell Biol.* 2019;21:102–112.
498. Stoffel E.M., Koeppe E., Everett J. et al. Germline Genetic Features of Young Individuals With Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2018 Mar;154(4):897-905.e1.

499. Strauss L., Bergmann C., Whiteside T.L. Human circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells kill autologous CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 2009 Feb 1;182(3):1469-80.
500. Sun C., Zhang L., Zhang W. et al. Expression of PD-1 and PD-L1 on Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predicts Prognosis in Patients with Small-Cell Lung Cancer. *Onco Targets Ther.* 2020 Jul 3;13:6475-6483.
501. Sun W.-W., Xu Z.-H., Lian P. et al. Characteristics of circulating tumor cells in organ metastases, prognosis, and T lymphocyte mediated immune response. *OncoTargets Ther.* 2017;10:2413–2424.
502. Sun Z., Li D., Wu H., Hou B. Tumour stem cell markers CD133 and CD44 are useful prognostic factors after surgical resection of pancreatic neuroendocrine tumours. *Oncol Lett.* 2020 Dec;20(6):341.
503. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249.
504. Suzuki H.I., Katsura A., Matsuyama H. et al. MicroRNA regulons in tumor microenvironment. *Oncogene.* 2015 Jun 11;34(24):3085-94.
505. Szczerba B.M., Castro-Giner F., Vetter M. et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature.* 2019 Feb;566(7745):553-557.
506. Taieb J., Lapeyre-Prost A., Laurent Puig P. et al. Exploring the best treatment options for BRAF-mutant metastatic colon cancer. *Br J Cancer.* 2019 Sep;121(6):434-442.
507. Taieb J., Le Malicot K., Shi Q. et al. Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016 Dec 31;109(5):djw272.
508. Takahashi M., Sung B., Shen Y. et al. Boswellic acid exerts antitumor effects in colorectal cancer cells by modulating expression of the let-7 and miR-200 microRNA family. *Carcinogenesis.* 2012 Dec;33(12):2441-9.

509. Tan Y., Wu H. The significant prognostic value of circulating tumor cells in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Curr Probl Cancer*. 2018 Jan-Feb;42(1):95-106.
510. Tang X.J., Wang W., Hann S.S. Interactions among lncRNAs, miRNAs and mRNA in colorectal cancer. *Biochimie*. 2019 Aug;163:58-72.
511. Taniguchi H., Moriya C., Igarashi H. et al. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer. *Cancer Sci*. 2016 Nov;107(11):1556-1562.
512. Tay Y., Zhang J., Thomson A.M. et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1124-8.
513. Terabe M., Matsui S., Noben-Trauth N. et al. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol*. 2000 Dec;1(6):515-20.
514. Terrié E., Coronas V., Constantin B. Role of the calcium toolkit in cancer stem cells. *Cell Calcium*. 2019 Jun;80:141-151.
515. Theodoropoulos P.A., Polioudaki H., Agelaki S. et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett*. 2010 Feb 1;288(1):99-106.
516. Thorsteinsson M., Jess P. The clinical significance of circulating tumor cells in non-metastatic colorectal cancer--a review. *Eur J Surg Oncol*. 2011 Jun;37(6):459-65.
517. Thorsteinsson M., Letormos G.S., Jess P. Low number of detectable circulating tumor cells in non-metastatic colon cancer. *Anticancer Res* 2011;31(2):613–617.
518. Tian M., Zhang Y., Liu Z. et al. The PD-1/PD-L1 inhibitory pathway is altered in pre-eclampsia and regulates T cell responses in pre-eclamptic rats. *Sci Rep*. 2016 Jun 9;6:27683.
519. Tlaskalova-Hogenova H., Tuckova L. et al. Interaction of mucosal microbiota with the innate immune system. *Scand J Immunol*. 2005 Jul;62 suppl 1:106-13.

520. Tohme S., Yazdani H.O., Al-Khafaji A.B. et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res.* 2016;76:1367–1380.
521. Tokarz P., Blasiak J. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment. *Acta Biochim Pol.* 2012;59(4):467-74.
522. Torino F., Bonmassar E., Bonmassar L. et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer patients. *Cancer Treat Rev.* 2013 Nov;39(7):759-72.
523. Toyoshima K., Hayashi A., Kashiwagi M. et al. Analysis of circulating tumor cells derived from advanced gastric cancer. *Int J Cancer.* 2015 Aug 15;137(4):991-8.
524. Tran B., Kopetz S., Tie J. et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011;117:4623–32.
525. Trinh A., Trumpi K., De Sousa E. et al. Practical and robust identification of molecular subtypes in colorectal cancer by immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 2017;23:387–98.
526. Tsai W.S., Chen J.S., Shao H.J. et al. Circulating Tumor Cell Count Correlates with Colorectal Neoplasm Progression and Is a Prognostic Marker for Distant Metastasis in Non-Metastatic Patients. *Sci Rep.* 2016 Apr 14;6:24517.
527. Tsukamoto M., Inuma H., Yagi T. et al. Circulating Exosomal MicroRNA-21 as a Biomarker in Each Tumor Stage of Colorectal Cancer. *Oncology.* 2017;92(6):360-370.
528. Tsunekuni K., Konno M., Haraguchi N. et al. CD44/CD133-Positive Colorectal Cancer Stem Cells are Sensitive to Trifluridine Exposure. *Sci Rep.* 2019 Oct 16;9(1):14861.
529. Tu J., Xu H., Ma L. et al. Nintedanib enhances the efficacy of PD-L1 blockade by upregulating MHC-I and PD-L1 expression in tumor cells. *Theranostics.* 2022; 12(2):747-766.

530. Turajlic S., Swanton C. Metastasis as an evolutionary process. *Science*. 2016 Apr 8;352(6282):169-75.
531. Vacca P., Munari E., Tumino N. et al. Human natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer: Friends or foes? *Immunol Lett*. 2018 Sep;201:14-19.
532. Vahidi Y., Bagheri M., Ghaderi A. et al. CD8-positive memory T cells in tumor-draining lymph nodes of patients with breast cancer. *BMC Cancer*. 2020 Mar 30;20(1):257.
533. Van Cutsem E., Atreya C., André T. et al. LBA- 07 Updated results of the MEK inhibitor trametinib (T), BRAF inhibitor dabrafenib (D), and anti-EGFR antibody panitumumab (P) in patients (pts) with BRAF V600E mutated (BRAFM) metastatic colorectal cancer (mCRC). *Ann Oncol*. 2015;26:iv119-iv119
534. Van Cutsem E., Cervantes A., Adam R. et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016;27:1386–422.
535. Van den Eynde M., Mlecnik B., Bindea G. et al. Multiverse of immune microenvironment in metastatic colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2020 Sep 29;9(1):1824316.
536. van der Toom E.E., Verdone J.E., Pienta K.J. Disseminated tumor cells and dormancy in prostate cancer metastasis. *Curr Opin Biotechnol*. 2016 Aug;40:9-15.
537. Van Kaer L. Natural killer T cells as targets for immunotherapy of autoimmune diseases. *Immunol Cell Biol*. 2004 Jun;82(3):315-22.
538. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3: research0034.1
539. Vano Y.A., Petitprez F., Giraldo N.A. et al. Immune-based identification of cancer patients at high risk of progression. *Curr Opin Immunol*. 2018 Apr;51:97-102.
540. Vassalli G. Aldehyde dehydrogenases: not just markers, but functional regulators of stem cells. *Stem Cells Int*. (2019) 2019:3904645.
541. Venderbosch S., Nagtegaal I.D., Maughan T.S. et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled

analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res: Off J Am Assoc Cancer Res* 2014;20:5322–30.

542. Vermaat J.S., Nijman I.J., Koudijs M.J. Primary colorectal cancers and their subsequent hepatic metastases are genetically different: implications for selection of patients for targeted treatment. *Clin Cancer Res.* 2012 Feb 1;18(3):688-99.

543. Veyrune L., Naumann D.N., Christou N. Circulating Tumour Cells as Prognostic Biomarkers in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 8;22(8):3437.

544. Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525–32.

545. Vogelstein B., Kinzler K.W. The path to cancer - three strikes and you're out. *N Engl J Med.* 2015;373:1895–8.

546. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc).* 2020 Oct;85(10):1178-1190.

547. Waldner M.J., Foersch S., Neurath M.F. Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1248-53.

548. Wang J., Ni J., Song D. et al. The regulatory effect of has-circ-0001146/miR-26a-5p/MNAT1 network on the proliferation and invasion of osteosarcoma. *Biosci Rep.* 2020 Jun 26;40(6):BSR20201232.

549. Wang J.Y., Chang C.C., Chiang C.C. et al. Silibinin suppresses the maintenance of colorectal cancer stem-like cells by inhibiting PP2A/AKT/mTOR pathways. *J Cell Biochem* 2012;113(5):1733–43.

550. Wang J.Y., Wu C.H., Lu C.Y. et al. Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis. *World J Surg.* 2006;30:1007–1013.

551. Wang L., Chen K.Y., Srinivasan T. et al. A miR-34a-Numb Feedforward Loop Triggered by Inflammation Regulates Asymmetric Stem Cell Division in Intestine and Colon Cancer. *Cell Stem Cell.* 2016 Feb 4;18(2):189-202.



552. Wang L., Zuo X., Xie K. et al. The Role of CD44 and Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2018;1692:31-42.
553. Wang M., Zhao J., Zhang L. et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer.* 2017 Feb 25;8(5):761-773.
554. Wang S., Qu Y., Xia P., Chen Y., et al. Transdifferentiation of tumor infiltrating innate lymphoid cells during progression of colorectal cancer. *Cell Res.* 2020 Jul;30(7):610-622.
555. Wang W., Kandimalla R., Huang H. et al. Molecular subtyping of colorectal cancer: Recent progress, new challenges and emerging opportunities. *Semin Cancer Biol.* 2019 Apr;55:37-52.
556. Wang X., Duanmu J., Fu X. et al. Analyzing and validating the prognostic value and mechanism of colon cancer immune microenvironment. *J Transl Med.* 2020 Aug 28;18(1):324.
557. Wang X., Lan Z., He J. et al. LncRNA SNHG6 promotes chemoresistance through ULK1-induced autophagy by sponging miR-26a-5p in colorectal cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2019 Sep 9;19:234.
558. Wang X., Liu Y. PD-L1 expression in tumor infiltrated lymphocytes predicts survival in triple-negative breast cancer. *Pathol Res Pract.* 2020 Mar;216(3):152802.
559. Wang X., Sun Q., Liu Q. et al. CTC immune escapemediated by PD-L1. *Med. Hypotheses* 2016, 93, 138–139.
560. Wang Y.N., Chen Z.H., Chen W.C. Novel circulating microRNAs expression profile in colon cancer: a pilot study. *Eur J Med Res.* 2017 Nov 29;22(1):51.
561. Watson A.J., Collins P.D. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis.* 2011;29(2):222-8.
562. Wei J., Barr J., Kong L.Y. et al. Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Mol Cancer Ther.* 2010 Jan;9(1):67-78.
563. Wei L.E.I., Wang H.U.I., Yang F.E.N. et al. Interleukin-17 potently increases non-small cell lung cancer growth. *Mol. Med. Rep.* 2016;13:1673–1680.

564. Weiß E., Kretschmer D., Formyl-Peptide Receptors in Infection, Inflammation, and Cancer. *Trends Immunol.* 2018 Oct;39(10):815-829. doi: 10.1016/j.it.2018.08.005. Epub 2018 Sep 5. PMID: 30195466.
565. Welch D.R., Hurst D.R. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res.* 2019 Jun 15;79(12):3011-3027.
566. Weng M., Wu D., Yang C. et al. Noncoding RNAs in the development, diagnosis, and prognosis of colorectal cancer. *Transl Res.* 2017 Mar;181:108-120.
567. Werner S., Stenzl A., Pantel K. et al. Expression of Epithelial Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell Markers in Circulating Tumor Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2017;994:205-228.
568. WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours: WHO Classification of Tumours, Volume 1 - World Health Organization; 5th edition; 635 p. ISBN: 9283244990, 9789283244998
569. Wong S.C., Chan C.M., Ma B.B. et al. Clinical significance of cytokeratin 20- positive circulating tumor cells detected by a refined immunomagnetic enrichment assay in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15:1005–12.
570. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. The Continuous Update Project Expert Report 2018. Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: Colorectal Cancer. Accessed October 23, 2020. Available at: <https://www.wcrf.org/wp-content/uploads/2021/02/Colorectal-cancer-report.pdf>
571. Wu B., Sun C., Feng F. et al. Do relevant markers of cancer stem cells CD133 and Nestin indicate a poor prognosis in glioma patients? A systematic review and meta-analysis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015 May 14;34(1):44.
572. Wu L., Han L., Zhou C. et al. TGF- $\beta$ 1-induced CK17 enhances cancer stem cell-like properties rather than EMT in promoting cervical cancer metastasis via the ERK1/2-MZF1 signaling pathway. *FEBS J.* 2017 Sep;284(18):3000-3017.
573. Wu M.S., Li C.H., Ruppert J.G. et al. Cytokeratin 8-MHC class I interactions: a potential novel immune escape phenotype by a lymph node metastatic carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 22;441(3):618-23.

574. Wu S.T., Sun G.H., Hsu C.Y. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a nuclear factor kappa B-independent mechanism. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011 Sep;236(9):1022-9.
575. Wu Y., Huang C., Meng X. et al. Long Noncoding RNA MALAT1: Insights into its Biogenesis and Implications in Human Disease. *Curr Pharm Des*. 2015;21(34):5017-28.
576. Xie Y.H., Chen Y.X., Fang J.Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Mar 20;5(1):22.
577. Xu F., Li S., Zhang J. et al. Cancer Stemness, Immune Cells, and Epithelial-Mesenchymal Transition Cooperatively Predict Prognosis in Colorectal Carcinoma. *Clin Colorectal Cancer*. 2018 Sep;17(3):e579-e592.
578. Xu N., Papagiannakopoulos T., Pan G. et al. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*. 2009 May 15;137(4):647-58.
579. Ya G., Wang H., Ma Y. et al. Serum miR-129 functions as a biomarker for colorectal cancer by targeting estrogen receptor (ER)  $\beta$ . *Pharmazie*. 2017 Feb 1;72(2):107-112.
580. Yaeger R., Chatila W.K., Lipsyc M.D. et al. Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell*. 2018 Jan 8;33(1):125-136.e3.
581. Yamada T., Matsuda A., Koizumi M. et al. Liquid Biopsy for the Management of Patients with Colorectal Cancer. *Digestion*. 2019;99(1):39-45.
582. Yamakuchi M., Lotterman C.D., Bao C. et al. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 6;107(14):6334-9.
583. Yamakuchi M., Yagi S., Ito T. et al. MicroRNA-22 regulates hypoxia signaling in colon cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(5):e20291.
584. Yan L., Cao R., Liu Y. et al. MiR-21-5p Links Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype with Stem-Like Cell Signatures via AKT Signaling in Keloid Keratinocytes. *Sci Rep*. 2016;6:28281.

585. Yang C., Sun W., Cui W. et al. Procoagulant role of neutrophil extracellular traps in patients with gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015;8:14075–14086.
586. Yang L., Shi P., Zhao G. et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Feb 7;5(1):8.
587. Yang M.H., Chen C.L., Chau G.Y. et al. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2009 Nov;50(5):1464-74.
588. Yang M.H., Imrali A., Heeschen C. Circulating cancer stem cells: the importance to select. *Chin J Cancer Res.* 2015 Oct;27(5):437-49.
589. Yao T., Wu Z., Liu Y. et al. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) positivity correlates with poor prognosis in cervical cancer. *J Int Med Res.* 2014 Aug;42(4):1038-42.
590. Ye J., Wu D., Wu P. et al. The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment. *Tumour Biol.* 2014 May;35(5):3945-51.
591. Ye L., Zhang F., Li H. et al. Circulating Tumor Cells Were Associated with the Number of T Lymphocyte Subsets and NK Cells in Peripheral Blood in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Dis. Mark.* 2017;2017:5727815.
592. Yen L.C., Yeh Y.S., Chen C.W. et al. Detection of KRAS oncogene in peripheral blood as a predictor of the response to cetuximab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 1;15(13):4508-13.
593. Yeung T.M., Gandhi S.C., Wilding J.L. et al. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(8):3722–7.
594. Yoshida K., Yamamoto Y., Ochiya T. miRNA signaling networks in cancer stem cells. *Regen Ther.* 2021 Jan 29;17:1-7.
595. Yu X., Lin Y., Yan X. et al. CD133, Stem Cells, and Cancer Stem Cells: Myth or Reality? *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2011 Dec;7(4):253-259.
596. Yu X.F., Zou J., Bao Z.J., Dong J. miR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol.* 2011 Nov 14;17(42):4711-7.

597. Yuan S., Norgard R.J., Stanger B.Z. Cellular plasticity in cancer. *Cancer Discov.* (2019) 9:837–51.
598. Yue C., Jiang Y., Li P. et al. Dynamic change of PD-L1 expression on circulating tumor cells in advanced solid tumor patients undergoing PD-1 blockade therapy. *Oncoimmunology.* 2018;7(7):e1438111.
599. Zalewski A., Snook A.E., Waldman S.A. Stem cells as therapeutic targets in colorectal cancer. *Per Med.* 2021 Mar;18(2):171-183.
600. Zelistra J., Joosten S.P., van Andel H. et al. Stem cells CD44v isoform promotes intestinal cancer formation in APC(Min) mice downstream of Wnt signaling. *Oncogene.* 2013;33:665–670.
601. Zeuner A., Todaro M., Stassi G. et al. Colorectal cancer stem cells: from the crypt to the clinic. *Cell Stem Cell.* 2014 Dec 4;15(6):692-705.
602. Zhang C., Zhang L., Xu T. et al. Mapping the spreading routes of lymphatic metastases in human colorectal cancer. *Nat Commun.* 2020 Apr 24;11(1):1993.
603. Zhang G., Zhou H., Xiao H., et al. MicroRNA-92a functions as an oncogene in colorectal cancer by targeting PTEN. *Dig Dis Sci.* 2014 Jan;59(1):98-107.
604. Zhao T., Li C., Wu Y. et al. Prognostic value of PD-L1 expression in tumor infiltrating immune cells in cancers: A meta-analysis. *PLoS One.* 2017 Apr 28;12(4):e0176822.
605. Zhao Y., Dong Q., Li J., Zhang K. et al. Targeting Cancer Stem Cells and Their Niche: Perspectives for Future Therapeutic Targets and Strategies. *Semin. Cancer Biol.* 2018;53:139–155.
606. Zhi H., Lian J. LncRNA BDNF-AS suppresses colorectal cancer cell proliferation and migration by epigenetically repressing GSK-3 $\beta$  expression. *Cell Biochem Funct.* 2019;37(5):340-347.
607. Zhong C., Wu J.D., Fang M.M. et al. Clinicopathological significance and prognostic value of the expression of the cancer stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2015 Sep;36(10):7623-30.

608. Zhong X., Zhang H., Zhu Y. et al. Circulating tumor cells in cancer patients: developments and clinical applications for immunotherapy. *Mol Cancer*. 2020 Jan 24;19(1):15.
609. Zhou F., Mu Y.D., Liang J. et al. Expression and prognostic value of tumor stem cell markers ALDH1 and CD133 in colorectal carcinoma. *Oncol Lett*. 2014 Feb;7(2):507-512.
610. Zhou J., Appleton S.E., Stadnyk A. et al. CD8<sup>+</sup> gammadelta T regulatory cells mediate kidney allograft prolongation after oral exposure to alloantigen. *Transpl Int*. 2008 Jul;21(7):679-87.
611. Zhou W., Ke S.Q., Huang Z. et al. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol*. 2015 Feb;17(2):170-82.
612. Zhou Y., Wang B., Wu J. et al. Association of preoperative EpCAM Circulating Tumor Cells and peripheral Treg cell levels with early recurrence of hepatocellular carcinoma following radical hepatic resection. *BMC Cancer*. 2016;16:506.
613. Zhou Y., Xia L., Wang H. et al. Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017 Dec 22;9(70):33403-33415.
614. Zhu Q., Wang Z., Hu Y. et al. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2012;27(5):1660-8.
615. Zhuang X., Zhang H., Hu G. Cancer and Microenvironment Plasticity: Double-Edged Swords in Metastasis. *Trends Pharmacol Sci*. 2019 Jun;40(6):419-429.