

ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ С РАЗЛИЧНОЙ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬЮ, ДИНАМИКОЙ И ПРОГНОЗОМ

**Златник Е.Ю., Новикова И.А., Бондаренко Е.С., Ульянова Е.П.,
Ситковская А.О.**

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия*

Резюме. Одной из актуальных проблем современной медицины является прогноз течения злокачественных опухолей, оценка которого зависит как от их биологических свойств, так и от состояния иммунной системы больного. Поскольку свойства опухоли и реакции иммунной системы организма на нее тесно взаимосвязаны, в научном и клиническом плане представляется важным использовать их в качестве прогностических маркеров. Целью работы явилось выявление наиболее значимых иммунологических факторов для прогноза течения колоректального рака (КРР) на основе изучения показателей локального и системного иммунитета и некоторых характеристик опухолевых клеток больных с различной распространенностью и динамикой заболевания. У 299 первично выявленных больных КРР I-IV стадии на этапе хирургического лечения изучали состав клеточных и цитокиновых факторов в крови, а также в ткани опухоли, где, кроме того, оценивали количество опухолевых клеток, экспрессирующих маркеры стволовых (ОСК), молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) и PDL-1. Использованы методы проточной цитометрии, иммуногистохимического (ИГХ) и иммуноферментного анализа (ИФА). Проводили сравнение показателей больных, с различной распространенностью КРР до лечения (наличием/отсутствием регионарных и отдаленных метастазов) и с различной динамикой заболевания (отдаленное метастазирование и летальный исход в период наблюдения). Результаты исследования показали, что при регионарном метастазировании в крови возрастает количество NK и IL-6, снижается уровень CD4⁺, в ткани возрастает количество ОСК. Исходно генерализованный процесс с отдаленными метастазами характеризуется высоким содержанием в крови IL-6, моноцитов и гранулоцитов, отвечающих на fMLF, в ткани опухоли – количества NKT и ОСК при более низких уровнях в ней опухолевых клеток, экспрессирующих МНС и PDL-1, а также лимфоцитов, экспрессирующих PD-1/PDL-1. Неблагоприятной динамике КРР в виде развития метастазирования в период наблюдения предшествует повышение в крови количества функционально неактивных NK и IL-10, моноцитов и гранулоцитов, отвечающих на fMLF, а в ткани – повышение уровня ОСК и снижение экспрессии МНС. Летальному исходу предшествовало повышение в крови

Адрес для переписки:

*Златник Елена Юрьевна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ
344019, Россия, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63.
Тел.: 8 (961) 272-69-68.
E-mail: elena-zlatnik@mail.ru*

Address for correspondence:

*Zlatnik Elena Yu.
National Medical Research Center of Oncology
344019, Russian Federation, Rostov-on-Don, 14th line, 63.
Phone: 7 (961) 272-69-68.
E-mail: elena-zlatnik@mail.ru*

Образец цитирования:

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

For citation:

*E. Yu. Zlatnik, I. A. Novikova, E. S. Bondarenko,
E. P. Ulyanova, A. O. Sitkovskaya "Characteristics of local and
system immunity, and features of cancer stem cells in patients
with different stage, dynamics and prognosis of colorectal
carcinoma", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 1, pp. 121-134.
doi: 10.15789/1563-0625-COL-2352
DOI: 10.15789/1563-0625-COL-2352*

IL-6 при снижении NK-клеток субпопуляции CD16^{dim}CD56^{bright}, повышение уровня NKT-клеток и ОСК в ткани опухоли при снижении МНС-экспрессирующих опухолевых клеток.

В качестве прогностических факторов неблагоприятного течения КРР можно рассматривать высокие уровни IL-6 и IL-10, моноцитов и гранулоцитов, отвечающих на fMLF в крови, повышение уровня NKT-клеток и ОСК при снижении МНС-экспрессирующих опухолевых клеток в ткани. Особо внимания заслуживает снижение экспрессии PD-1/PDL-1 в клетках опухоли и лимфоцитах ее микроокружения при генерализованном КРР.

Ключевые слова: системный иммунитет, локальный иммунитет, стволовые опухолевые клетки, колоректальный рак, распространенность, динамика

CHARACTERISTICS OF LOCAL AND SYSTEM IMMUNITY, AND FEATURES OF CANCER STEM CELLS IN PATIENTS WITH DIFFERENT STAGE, DYNAMICS AND PROGNOSIS OF COLORECTAL CARCINOMA

Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Bondarenko E.S., Ulyanova E.P., Sitkovskaya A.O.

National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Clinical prognosis in malignant tumors` is among the most challenging problems of contemporary medicine. It is thought to depend on both biologic properties of tumor cells and patients` immune status. The features of tumor cells and immune reactions are closely interrelated and mutually conditioned. Therefore, possible application of their characteristics as prognostic markers is of great fundamental and clinical importance. The aim of our study is to find out the most significant immune factors for prognosis of colorectal cancer (CRC) based on estimation of local and system immune factors, and some characteristics of tumor cells in the patients at various stages of the disease and different clinical course. Cellular factors of immunity and cytokines were studied in blood and tumor tissue of 299 patients with colorectal cancer (stages I-IV). Malignant cells expressing stem cell markers CSC), MHC and PDL-1 molecules were also counted in the tumor tissue. Blood samples were drawn prior to operation, and tissue samples were taken during surgery being the 1st line of treatment. Flow cytometry techniques (FCM), immunohistochemistry (IHC), and ELISA approach were employed. We have compared data on the patients at different CRC stages (with or without local and distant metastases), as well as cases with different course of the disease (evolving distant metastases and fatal outcome during period of observation). Our results demonstrated increased amounts of NK-cells and IL-6 concentration, along with decreased percentage of blood CD4⁺ cells in the patients with local metastases, as well as higher CSC numbers in malignant tissue. The initially generalized CRC cases with distant metastases were characterized by high levels of blood IL-6, monocytes and granulocytes responding to fMLF, while in tumor tissue elevated amounts of NKT, CSC and decreased expression of MHC and PDL-1 were observed on tumor cells, like as lower PD-1/PDL-1 expression on tumor-infiltrating lymphocytes. Unfavorable CRC dynamics, i.e., metastasizing during the observation period was preceded by increased levels of IL-10 in blood, NK cells with poor cytotoxicity, monocytes and granulocytes responding to fMLF. In tumor tissue, overexpression of CSC markers and hypo-expression of MHC on tumor cells were noted. Fatal outcome was preceded by elevation of blood IL-6levels, tissue levels of NKT and CSC percentages, along with decreased NK cells subset (CD16^{dim}CD56^{bright}) in blood, and decline of MHC-expressing cells in the tumor. Thus, high blood levels of IL-6 and IL-10, fMLF-responding monocytes and granulocytes, as well as elevated amounts of NKT and CSC, hypo-expression of MHC in tumor tissue could be considered prognostic markers of unfavorable course in CRC patients. Decrease of PD-1/PDL-1 expression on tumor cells and lymphocytes from its microenvironment in advanced CRC is of special attention, because checkpoint inhibitors are prescribed in such cases.

Keywords: systemic immunity, local immunity, stem cells, colorectal cancer, stages, progression

Введение

Несмотря на прогресс в ранней диагностике и улучшении эффективности адъювантной химиотерапии, у многих пациентов колоректальным раком (КРР) наблюдается прогрессирование заболевания. Гистопатологическая классификация не всегда способна предсказать исход заболевания и терапевтический ответ, что подчеркивает необходимость поиска новых прогностических факторов индивидуального риска прогрессирования заболевания. Клональные, стромальные и иммунные характеристики КРР все чаще признаются важными для терапевтического воздействия. Важнейшей задачей современной медицины является применение полученных в результате исследования данных для клинической практики с целью предоставления индивидуального лечения каждому пациенту [6]. У большинства из них в течение 5 лет развивается прогрессирование заболевания в виде рецидива или метастазов, несмотря на хирургическое лечение и адъювантную терапию [29]. Одними из наиболее значимых факторов ограниченной эффективности лечения являются опухолевые стволовые клетки [8, 15, 28, 31]. При применении химио- или лучевой терапии меняется состав опухолевых клеток [5, 7], при этом сначала погибают опухолевые клетки с высокой пролиферативной активностью, за счет чего происходит уменьшение размера опухоли, в то время как ОСК выживают [30]. Рак толстой кишки, как и ряд других опухолей, рассматривается как заболевание стволовых клеток. ОСК по фенотипическим характеристикам являются гетерогенными и функционально ответственны за рецидив опухоли, метастазирование и химиорезистентность [7, 11, 21, 27].

Новые терапевтические подходы, в том числе иммунологические, направленные на уничтожение ОСК, находятся в фокусе исследований последних лет [11, 34]. Сочетание терапии, нацеленной на ОСК, и традиционной терапии может способствовать снижению химиорезистентности [30]. При исследовании циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) выявлено, что нередко они имеют маркеры ОСК, следовательно, последние могут обуславливать не только рецидивирование, но и метастазирование опухоли. В настоящее время как ЦОК, так и ОСК описаны в качестве диагностических и прогностических факторов, а также мишеней для возможной таргетной терапии [1, 11, 26, 39].

С учетом современных представлений об «иммуноредактировании» опухоли [12], в литературе рассматриваются механизмы, с помощью которых различные клетки иммунной системы способны ограничивать или стимулировать диссеминацию и персистенцию опухолевых клеток [23].

Для реализации своего метастатического потенциала опухолевые клетки эволюционируют в сторону снижения иммуногенности. В качестве стратегий их выживания в литературе описана потеря одних рецепторов (главного комплекса гистосовместимости, опухолевых антигенов) и гиперэкспрессия других (PD-L1, CD47); продукция факторов, угнетающих цитотоксическую и фагоцитарную активность иммунокомпетентных клеток; привлечение тромбоцитов, способных как механически, так и через выделение цитокинов блокировать активность натуральных киллеров [22, 24, 35] и др. И, хотя в целом кровоток считается враждебной средой для метастазирующих опухолевых клеток, часть из них способна сформировать подходящее для своего выживания микроокружение [15, 33]. В ткани также создается определенное микроокружение опухоли, способствующее или препятствующее ее росту и распространению [19]. Оно может включать как вырабатываемые опухолевыми клетками вещества (факторы роста, стимуляторы неоангиогенеза и пр.), так и привлекаемые опухолью ресурсы организма, в частности, компоненты иммунной системы (лимфоциты, макрофаги), в ряде ситуаций с их перепрограммированием [4], а также цитокины – молекулы межклеточных взаимодействий, участвующие в регуляции процессов пролиферации и апоптоза, баланс которых в большой мере определяет рост или регрессию опухоли [2, 3].

Представляет несомненный интерес изучение взаимоотношения ОСК с системными и локальными факторами иммунитета, а также оценка возможности использования этих данных для прогнозирования течения злокачественных опухолей с дальнейшей разработкой персонализированных подходов к лечению больных.

Целью работы явилось выявление наиболее значимых иммунологических факторов для прогноза течения КРР на основе изучения показателей локального и системного иммунитета и некоторых характеристик опухолевых клеток больных с различной распространенностью и динамикой заболевания.

Материалы и методы

Характеристика больных

Дизайн исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии». Обязательным условием включения в исследование являлось наличие подписанного добровольного информированного согласия всех больных. В исследование включены 299 больных раком ободочной кишки и ректосигмоидного отдела, T1-4N0-2M0-1, II-IV стадий, в возрасте от 42 до 86 лет (средний возраст $64,2 \pm 1,7$ лет), находив-

шиеся на лечении в ФГБУ НМИЦ онкологии с 2012 по 2016 гг. На долю мужчин приходилось 51,8% (155 человек), женщин – 48,2% (144 человека). Распределение больных по стадиям заболевания проводили в соответствии с Международной классификацией злокачественных опухолей по системе TNM (AJCC/ UICC 8 th ed., 2017). Большинство больных находилось во II стадии заболевания – 36,8% (110 человек), на долю больных в III и IV стадиях заболевания приходилось 29,4% (88 человек) и 33,8% (101 человек) соответственно. Распределение больных внутри стадий заболевания по полу и возрасту являлось сопоставимым.

Наиболее часто (у 110 больных) опухоль определялась в сигмовидной кишке (36,8%), в то время как у 47 больных (15,7%) в восходящем отделе, у 36 (12%) в поперечно-ободочной кишке, по 29 больных (9,7%) отмечалось расположение опухоли в печеночном изгибе и нисходящем отделе ободочной кишки. В селезеночном изгибе и слепой кишке опухоль встречалась у 28 (9,4%) и 20 (6,7%) больных соответственно. Гистологическое строение преобладающего числа опухолей соответствовало аденокарциноме – 242 больных (81%), муцинозная аденокарцинома выявлена у 45 больных (15%), у наименьшего количества больных – 12 (4%), выявлен перстневидно-клеточный рак. В исследовании преобладали опухоли G2 степени дифференцировки – 55,2% (165 больных), на долю опухолей G1 и G3 степени дифференцировки приходилось соответственно 15,4% (46 больных) и 29,4% (88 больных).

Всем больным первым этапом выполнялось хирургическое лечение. Все больные II-III стадий после проведения оперативного вмешательства получали адьювантную химиотерапию по схеме FOLFOX. Больным IV стадии с резектабельными метастазами в печень, одновременно с удалением первичной опухоли выполнялась операция на печени, в последующем курсы адьювантной химиотерапии по схеме FOLFOX. Больных наблюдали в течение 5 лет после операции. При развитии прогрессирования заболевания проводили лечение по общепринятым стандартам.

Проведено сопоставление результатов определения показателей системного и локального иммунитета, а также опухолевых стволовых клеток у больных КРП с различной распространенностью и динамикой опухолевого процесса.

Исходно до операции выделяли подгруппы пациентов без метастазирования (n = 108), а также с метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов (n = 191). У 153 пациентов наряду с метастазами в регионарные лимфатические узлы были выявлены и отдаленные метастазы. В ходе наблюдения за пациентами в течение

90 месяцев (7,5 лет) после операции у 138 пациентов развился летальный исход, у 51 пациента наблюдались метастазы, включая метастазы в регионарные лимфатические узлы (n = 12) и отдаленные метастазы (n = 39).

Иммунологические методы

В сыворотках больных определяли уровни цитокинов (TNF, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN α , IFN γ) методом ИФА с тест-системами «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), результаты выражали в пг/мл.

В крови методом проточной цитометрии на цитометре FACSCantoII (BD) определяли популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов: Т (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), В (CD19⁺), NK (CD16/56⁺, включая субпопуляции CD16^{bright}56^{dim} и CD16^{dim}56^{bright}), а также содержащие перфорин и гранзим В), NKT (CD3⁺CD16/56⁺), Tregs (CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}), Th0 (CD45RA⁺CD62L⁺CD4⁺, CD45RA⁺CD62L⁺CD8⁺), Tm (CD45RO⁺CD62L⁺CD4⁺, CD45RA⁺CD62L⁺CD8⁺), количественные характеристики и активность гранулоцитов и моноцитов в тестах Phagotest и Phagoburst.

Факторы локального иммунитета и тканевое содержание ОСК исследовали методами проточной цитометрии на анализаторе FACS CantoII и ИГХ.

Для исследования факторов локального иммунитета фрагменты удаленной опухолевой ткани дезинтегрировали с помощью дезагрегирующего устройства BD Medimachine. В гомогенатах тканей определяли общее количество лейкоцитов (CD45⁺), процент опухолевых клеток EpCam⁺ (CD326⁺), экспрессирующих стволовые маркеры (CD133⁺, CD44⁺), а также молекулы главного комплекса гистосовместимости (HLA-ABC, HLA-E) и лиганд рецептора программируемой клеточной гибели PD-L1 (CD274⁺). Кроме того, среди клеток иммунологического микроокружения опухоли оценивали уровни лейкоцитов, находящихся в лимфоцитарном гейте и экспрессирующих тот же лиганд и его рецептор: CD45⁺CD274⁺ (PD-L1) и CD45⁺CD279⁺ (PD-1), а также Т-В-НК-NKT лимфоцитов.

Иммуногистохимические методы

В срезах с парафиновых блоков, предназначенных для стандартного морфологического исследования опухоли, методом ИГХ определяли опухолевые клетки с маркерами стволовости (CD133⁺, CD44⁺, ALDH1) в процентах от общего количества опухолевых клеток.

Депарафинизацию и дегидратацию парафиновых срезов проводили по стандартной методике. «Демаскировку» антигенов проводили в PT-LinkThermo. Срезы предварительно нагревали до 65 °С, далее происходило восстановление анти-

ТАБЛИЦА 1. ПАНЕЛЬ АНТИТЕЛ ДЛЯ ИГХ-ИССЛЕДОВАНИЯ ОПУХОЛЕЙ

TABLE 1. PANEL OF ANTIBODIES FOR IHC-TESTING OF TUMORS

Специфичность Specificity	Клон Clone	Фирма Manufacturer	Разведение Dilution	Буфер для «демаскировки антигенов» Antigen Retrieval Buffer
CD44	156-3C11	Thermo Scientific	1:2500	Antigen Retrieval Buffer (100× Citrate pH 6,0)
CD133	polyclonal	Cloud-Clone Corp	1:700	10 мМTris, 1 мМEDTA (pH 9,0)
ALDH1A1	B-5	Santa Cruz Biotechnology	1:1800	10 мМTris, 1 мМEDTA (pH 8,0)

гена в течение 20 минут при температуре 97 °С и охлаждение до 65 °С. Затем стекла промывали в течение 1-3 минут TBSIHC Wash Buffer +Tween 20 (Cell Marque) и окрашивали в автостейнере Thermo Scientific 480S в автоматическом режиме. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовалась система детекции Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, для заключения использовали бальзам Bio-Mount. Оценку результатов ИГХ-реакции проводили с применением светового микроскопа Leica (Германия) под увеличением 10, 20, 40. Используемые первичные моноклональные и поликлональные антитела представлены в таблице 1.

Методы статистического анализа

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием программы STATISTICA 12.0 (StatSoft, США). Количественные показатели представляли в виде среднего (M) и стандартного отклонения (SD). Проверку на нормальность распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для выявления статистической значимости различия средних использовали критерий Манна–Уитни. Различия долей оценивали с помощью критерия Хи квадрат Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность.

Результаты

Больных разделяли по отсутствию или наличию на момент исследования таких клинических характеристик, как распространенность опухолевого процесса: метастазирование в регионарные лимфатические узлы (табл. 2), отдаленное метастазирование (табл. 3), а также клиническая динамика: метастазирование, развившееся в ходе наблюдения (табл. 4), и летальный исход (табл. 5). В таблицах 2-5 приведены только статистически значимые различия между исследованными показателями больных.

Показатели системного и локального иммунитета у больных КРР с метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов

Как видно из представленных в таблице 2 данных, метастазирование КРР в регионарные лимфоузлы сопровождается снижением содержания CD45⁺ клеток в ткани и повышением в ней уровня CD44⁺ опухолевых клеток, а также снижением CD3⁺ и CD4⁺ лимфоцитов в крови, наряду с повышением в ней процента NK-клеток по сравнению с больными без метастазирования. Регионарное метастазирование КРР характеризуется накоплением в ткани опухолевых клеток с иммунофенотипическими признаками стволовости при снижении присутствия в ней лейкоцитов, а также уменьшением количества клеток, ответственных за адаптивный иммунитет, при, по видимому, компенсаторном повышении уровня клеток врожденного иммунитета в крови. В крови этих же больных отмечено повышение уровня IL-6, которое, наряду с более высокой экспрессией маркеров ОСК в ткани опухоли, является общим для больных с регионарным и отдаленным метастазированием. Статистически значимых различий уровней остальных исследованных цитокинов не выявлено, хотя среднее содержание IL-10 было в 2 раза, а IL-8 – 3,4 раза выше по сравнению с больными без метастатического поражения лимфоузлов (M 12,0 и 5,2 пг/мл для IL-10; M 94,4 и 28,8 пг/мл, для IL-8) (рис. 1А).

Показатели системного и локального иммунитета у больных КРР с отдаленным метастазированием

При наличии отдаленных метастазов выявлено существенно больше статистически значимых отличий (табл. 3).

В крови отмечено повышение уровней IL-6 и гранулоцитарного кислородного взрыва, стимулированного fMLF. Более глубокие изменения отмечены в ткани опухоли как среди опухолевых клеток, так и среди клеток ее лимфоцитарного микроокружения. Так, выявлено повышение тканевого уровня NKT-клеток и снижение процента

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМНОГО, ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ИМЕЮЩИХ СТАТИСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ БОЛЬНЫМИ С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ В РЕГИОНАРНЫЕ ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ И БЕЗ НЕГО, M±SD

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF SYSTEM, LOCAL IMMUNOLOGIC FACTORS AND TUMOR CELLS STATISTICALLY SIGNIFICANTLY DIFFERENT BETWEEN PATIENTS WITH AND WITHOUT METASTASES IN REGIONAL LYMPH NODES, M±SD

Показатели Parameters	Метастазы в регионарные лимфоузлы Metastases in regional lymph nodes		p
	Нет No	Есть Yes	
Кровь Blood			
CD3⁺, % от лимфоцитов CD3 ⁺ , % from lymphocytes	77,54±8,63	67,12±12,33	0,002
CD4⁺, % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺ , % from T lymphocytes	40,79±12,40	34,15±11,00	0,045
CD16/56⁺, % от лимфоцитов CD16/56 ⁺ , % from lymphocytes	11,63±7,90	19,29±11,44	0,012
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	14,86±4,56	42,99±7,48	0,010
Ткань опухоли, ПЦМ Tumor tissue, FCM			
CD326⁺CD44⁺, % от CD45⁻ CD326 ⁺ CD44 ⁺ , % from CD45 ⁻	7,76±2,72	11,35±3,33	0,001
Ткань опухоли, ИГХ Tumor tissue, IHC			
CD45⁺, %	0,88±0,13	0,500±0,001	0,001
CD44⁺, %	8,22±4,86	12,41±8,79	0,010

Примечание. В таблицах 2-5 доверительная вероятность p рассчитана по критерию Манна–Уитни; ПЦМ – проточная цитометрия; ИГХ – иммуногистохимическое исследование.

Note. In the tables 2-5 confidence probability was calculated by the Mann–Whitney test; FCM, flow cytometry; IHC, immunohistochemical testing.

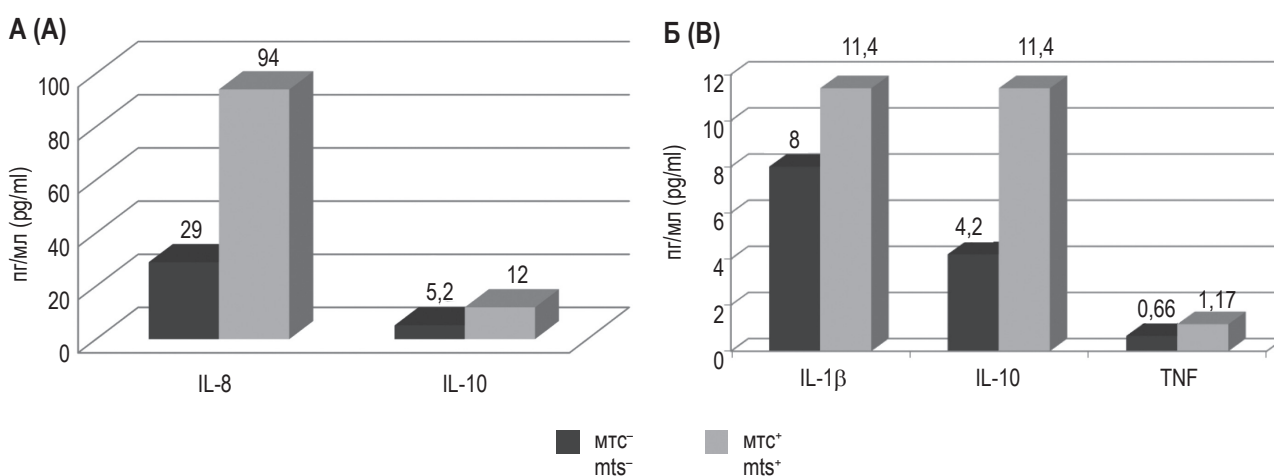


Рисунок 1. Содержание некоторых цитокинов в крови больных КРП (пг/мл)

Примечание. А – с отсутствием и наличием метастазов в лимфоузлы. Б – с отсутствием и наличием отдаленных метастазов.

Figure 1. Levels of some cytokines in CRC patients' blood (pg/ml)

Note. A, with and without metastases in lymph nodes. B, with and without distant metastases.

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМНОГО, ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ИМЕЮЩИХ СТАТИСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ БОЛЬНЫМИ С ИСХОДНЫМ ОТДАЛЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ И БЕЗ НЕГО, M±SD

TABLE 3. CHARACTERISTICS OF SYSTEM, LOCAL IMMUNOLOGIC FACTORS AND TUMOR CELLS STATISTICALLY SIGNIFICANTLY DIFFERENT BETWEEN PATIENTS WITH AND WITHOUT DISTANT METASTASES, M±SD

Показатели Parameters	Отдаленные метастазы Distant metastases		p
	Нет No	Есть Yes	
Кровь Blood			
Кисл. взрыв гран. (fMLF), % Oxydative burst gran. (fMLF), %	2,67±1,81	6,45±4,11	0,012
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	15,41±9,82	39,82±15,48	0,031
Ткань опухоли, ПЦМ Tumor tissue, FCM			
НКТ (CD3 ⁺ CD16/56 ⁺), % от лимфоцитов NKT (CD3 ⁺ CD16/56 ⁺), % from lymphocytes	3,78±3,18	5,99±4,19	0,009
CD45 ⁺ CD274 ⁺ (PD-L1), % от лимфоцитов CD45 ⁺ CD274 ⁺ (PD-L1), % from lymphocytes	40,60±21,93	30,88±14,90	0,013
CD45 ⁺ CD279 ⁺ (PD-1), % от лимфоцитов CD45 ⁺ CD279 ⁺ (PD-1), % from lymphocytes	43,14±22,30	31,29±19,86	0,008
CD326 ⁺ CD274 ⁺ (EрCamPD-L1), % от CD45 ⁻ CD326 ⁺ CD274 ⁺ (EрCamPD-L1), % from CD45 ⁻	12,15±9,66	8,01±3,73	0,006
CD326 ⁺ CD44 ⁺ , % от CD45 ⁻ CD326 ⁺ CD44 ⁺ , % from CD45 ⁻	7,96±3,19	12,72±5,87	0,023
CD326 ⁺ CD44 ⁺ CD133 ⁺ , % от CD45 ⁻ CD326 ⁺ CD44 ⁺ CD133 ⁺ , % from CD45 ⁻	0,60±0,33	0,90±0,39	0,002
CD326 ⁺ HLA ABC, % от CD45 ⁻ CD326 ⁺ HLA ABC, % from CD45 ⁻	69,20±24,79	56,85±27,78	0,028
CD326 ⁺ HLA E, % от CD45 ⁻ CD326 ⁺ HLA E, % from CD45 ⁻	27,83±12,48	18,23±5,10	0,000
Ткань опухоли, ИГХ Tumor tissue, IHC			
CD133 ⁺ , %	7,27±2,49	8,59±3,23	0,002
ALDH1, %	6,73±4,64	10,24±8,31	0,010

ТАБЛИЦА 4. ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМНОГО, ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ИМЕЮЩИХ СТАТИСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ БОЛЬНЫМИ С РАЗВИВШИМСЯ ОТДАЛЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ И БЕЗ НЕГО, М±SD

TABLE 4. CHARACTERISTICS OF SYSTEM, LOCAL IMMUNOLOGIC FACTORS AND TUMOR CELLS STATISTICALLY SIGNIFICANTLY DIFFERENT BETWEEN PATIENTS WITH AND WITHOUT DISTANT METASTASES WHICH DEVELOPED DURING THE OBSERVATION PERIOD, M±SD

Показатели Parameters	Метастазирование, развившееся в процессе наблюдения Metastases which developed during the observation period		p
	Нет No	Есть Yes	
Кровь Blood			
CD16/56⁺, % от лимфоцитов CD16/56 ⁺ , % from lymphocytes	15,60±10,75	24,34±9,60	0,046794
Perforin, % от NK Perforin, % from NK	74,03±21,81	12,85±4,03	0,001021
Кисл. взрыв гран. (fMLF), % Oxidative burst gran. (fMLF), %	3,621±1,530	12,55±0,07	0,000105
Кисл. взрыв мон. (fMLF), % Oxidative burst mon. (fMLF), %	5,83±3,90	37,10±14,28	0,000020
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	6,24±4,67	33,27±40,06	0,000646
Ткань опухоли, ПЦМ Tumor tissue, FCM			
CD326⁺HLA ABC, % от CD45⁺ CD326 ⁺ HLA ABC, % from CD45 ⁺	64,72±25,52	48,30±32,73	0,041665
CD326⁺CD133⁺, % от CD45⁺ CD326 ⁺ CD133 ⁺ , % from CD45 ⁺	8,24±4,58	20,13±7,31	0,006395
Ткань опухоли, ИГХ Tumor tissue, IHC			
CD133⁺, %	4,38±2,00	8,45±2,18	0,004843

лимфоцитов, экспрессирующих PD-1 и PD-L1. При этом увеличивается содержание опухолевых клеток, коэкспрессирующих маркеры стволовых клеток (CD44⁺, CD133⁺, ALDH1), происходит снижение на них экспрессии PD-L1 и молекул главного комплекса гистосовместимости I типа. Повышение экспрессии маркеров стволовости характеризует метастазирующие опухоли, однако, если при регионарных метастазах отмечена статистическая значимость только для маркера CD44, то при отдаленных выявлены различия и по CD133.

Хотя уровни цитокинов в крови, кроме отмеченного выше IL-6, и не показали статистически значимых различий вследствие широкой индивидуальной вариабельности между больными с отдаленными метастазами и без них, в группе с

метастазами наблюдались более высокие значения: IL-10 – в 2,4 раза (M 11,4 и 4,2 пг/мл), TNF (M 1,17 и 0,66 пг/мл,) и IL-1β (M 13,1 и 8,14 пг/мл) соответственно (рис. 1Б).

Показатели системного и локального иммунитета у больных КРР с отдаленным метастазированием, наступившем в ходе наблюдения

Отдельную группу составляли больные, у которых отдаленное метастазирование развилось в процессе наблюдения, у части из них произошел летальный исход. При развитии метастазов у больных выявлено снижение процента функционально активных Perforin-содержащих НК-клеток, несмотря на повышение их общего количества, по-видимому, компенсаторное, а также возрастание процента гранулоцитов и моноцитов, отвечающих на fMLF, количества опу-

ТАБЛИЦА 5. ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМНОГО, ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ИМЕЮЩИХ СТАТИСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ РАЗЛИЧИЯ, МЕЖДУ БОЛЬНЫМИ С ЛЕТАЛЬНЫМ ИСХОДОМ И БЕЗ НЕГО, М±SD

TABLE 5. CHARACTERISTICS OF SYSTEM, LOCAL IMMUNOLOGIC FACTORS AND TUMOR CELLS STATISTICALLY SIGNIFICANTLY DIFFERENT BETWEEN PATIENTS WITH AND WITHOUT FATAL OUTCOME, M±SD

Показатели Parameters	Летальный исход Fatal outcome		p
	Нет No	Есть Yes	
Кровь Blood			
CD16^{dim}CD56^{bright}, % от NK CD16 ^{dim} CD56 ^{bright} , % from NK	16,95±1,91	4,12±1,72	0,017659
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	16,51±1,89	41,61±3,69	0,023566
Ткань опухоли, ПЦМ Tumor tissue, FCM			
CD326⁺CD133⁺, % от CD45⁻ CD326 ⁺ CD133 ⁺ , % from CD45 ⁻	14,24±4,23	22,61±7,54	0,006018
CD326⁺CD44⁺CD133⁺, % от CD45⁻ CD326 ⁺ CD44 ⁺ CD133 ⁺ , % from CD45 ⁻	0,59±0,25	0,87±0,73	0,019078
НКТ, % от лимфоцитов NKT, % from lymphocytes	4,20±0,38	5,89±0,39	0,045412
CD326⁺HLA ABC, % от CD45⁻ CD326 ⁺ HLA ABC, % from CD45 ⁻	70,30±24,09	54,38±27,78	0,003989
CD326⁺HLA E, % от CD45⁻ CD326 ⁺ HLA E, % from CD45 ⁻	24,66±10,89	20,42±9,34	0,046882
Ткань опухоли, ИГХ Tumor tissue, IHC			
CD133⁺, %	6,54±0,55	9,07±0,36	0,009134
CD44⁺, %	9,83±0,85	12,26±0,69	0,012255

холевых клеток, экспрессирующих маркер ОСК CD133, и уровня IL-10 (табл. 4).

У больных данной группы, кроме статистически достоверно различающихся показателей, оказалось довольно много параметров, не имеющих статистически значимых различий, но которые, тем не менее, обращают на себя внимание: при развивающемся метастазировании в крови больных наблюдалось повышение уровня IL-6 (M 51,9 против 27,6 пг/мл), содержания как «наивных» Т-лимфоцитов (CD8⁺/CD45RA⁺/CD62L⁺) (M 13,1 против 9,1%), так и Т-клеток памяти (CD8⁺/CD45RA⁻/CD45RO⁺) (M 48,8 против 33,5%) и активированных лимфоцитов (CD8⁺/CD38⁺) (M 32,5 против 24,6%), касающихся только субпопуляции CD8⁺. У этих же больных в крови наблюдалось 2,8-кратное повышение процента CD16^{dim}CD56^{bright} клеток, а в ткани – CD45⁺CD279⁺ при снижении присутствия в ней Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺).

Показатели системного и локального иммунитета у больных КРР с летальным исходом

У больных, у которых в дальнейшем наступил летальный исход, в крови отмечено снижение функционально активных натуральных киллеров, а именно субпопуляции NK (CD16^{dim}CD56^{bright}), а в ткани выявлено повышение уровня НКТ клеток (табл. 5).

У таких больных также отмечен более высокий уровень ОСК, экспрессирующих CD44 и CD133, выявленных как ИГХ, так и проточной цитометрией.

Кроме того, ряд показателей имел тенденцию к изменениям, хотя и не проявившуюся в статистической значимости: например, в крови отмечено повышение не только уровня IL-6, но и IL-10 (в 2,9 раза) (M 12,4 против 4,2 пг/мл), IL-8 (M 74,6 против 58,8 пг/мл) и TNF (M 1,28 против 0,6 пг/мл), а также усиление кислородного взрыва моноцитов и гранулоцитов под действием

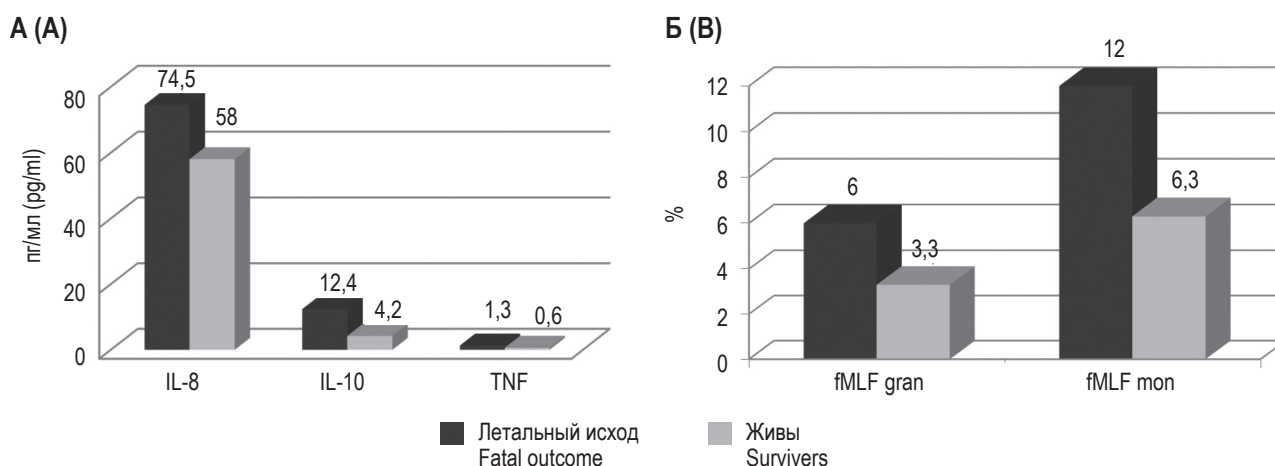


Рисунок 2. Содержание некоторых клеточных и цитокиновых факторов в крови больных КРП с летальным исходом и без него

Примечание. А – уровни цитокинов (пг/мл). Б – содержание гранулоцитов и моноцитов, отвечающих на fMLF (%).

Figure 2. Levels of some cellular and cytokine factors in CRC patients' blood with and without fatal outcome

Note. A, levels of some cytokines (pg/ml). B, levels of granulocytes and monocytes responding to fMLF (%).

ТАБЛИЦА 6. ИЗМЕНЕНИЯ ФАКТОРОВ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗВИТИИ РЕГИОНАРНЫХ И ОТДАЛЕННЫХ МЕТАСТАЗОВ

TABLE 6. CHANGES IN LOCAL AND SYSTEM IMMUNOLOGIC FACTORS AND IN TUMOR CELLS' PHENOTYPE DURING THE DEVELOPMENT OF REGIONAL AND DISTANT METASTASES

	Кровь Blood	Ткань опухоли, ПЦМ Tumor, FCM	Ткань опухоли, ИГХ Tumor, IHC
Метастазы в лимфатические узлы Metastases in regional lymph nodes			
↓	CD3 ⁺ , CD4 ⁺	CD45 ⁺	CD45 ⁺
↑	NK, IL-6	CD326 ⁺ CD44 ⁺	CD44 ⁺
Отдаленные метастазы Distant metastases			
↓	0	CD45 ⁺ CD279 ⁺ , CD45 ⁺ CD274 ⁺ , HLA-ABC, HLA-E CD326 ⁺ CD274 ⁺	0
↑	Кисл. взрыв гран. (fMLF) Oxydative burst gran. (fMLF), IL-6	CD326 ⁺ CD44 ⁺ CD326 ⁺ CD44 ⁺ CD133 ⁺	CD133 ⁺ , ALDH1
Отдаленные метастазы в процессе наблюдения Metastases which developed during the observation period			
↓	NKPerforin ⁺	CD326 ⁺ HLA-ABC	0
↑	NK, IL-10 Кисл. взрыв гран. и мон. (fMLF) Oxydative burst gran. and mon. (fMLF)	CD326 ⁺ CD133 ⁺	CD133 ⁺
Летальность в процессе наблюдения Fatal outcome during the observation period			
↓	NK (CD16 ^{dim} CD56 ^{br})	CD326 ⁺ HLA-ABC, CD326 ⁺ HLA-E	0
↑	IL-6	NKT, CD326 ⁺ CD133 ⁺ CD326 ⁺ CD44 ⁺ CD133	CD133 ⁺ CD44 ⁺

Примечание. ↑ – при метастазах (летальном исходе) выше, чем без них; ↓ – при метастазах (летальном исходе) ниже, чем без них.

Note. ↑, in cases of metastases (fatal outcome) higher than without them; ↓, in cases of metastases (fatal outcome) lower than without them.

fMLF (М 12 против 6,3%, и М 6,0 против 3,3%, соответственно) (рис. 2А, Б).

В таблице 6 обобщены статистически значимые различия между показателями больных в зависимости от распространенности, динамики и исхода заболевания.

Итак, при нарастании распространенности КРР обнаружено увеличение количества измененных показателей локального и системного иммунитета, включая клеточные и цитокиновые, а также увеличение содержания опухолевых клеток с маркерами стволовых и гипоекспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости и системы PD-1/PDL-1.

Обсуждение

Прогнозирование течения КРР является важной медицинской проблемой. Проведенное нами исследование системного и локального иммунитета у больных с различной распространенностью и динамикой заболевания показало, что важным условием для генерализации КРР и, следовательно, для неблагоприятного прогноза представляется отмеченное снижение экспрессии на опухолевых клетках молекул главного комплекса гистосовместимости, а также PDL-1. Уменьшение экспрессии последнего наряду с PD-1 на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах характеризует генерализованный процесс, хотя ингибиторы системы PD-1/PDL-1 применяются именно в таких случаях.

В литературе не сложилось единого мнения о прогностической значимости экспрессии PD-1/PDL-1, хотя данный вопрос весьма актуален для персонализированного выбора иммунотерапии ингибиторами контрольных точек. Так, по данным метаанализа, опубликованного в 2015 г., экспрессия PD-L1 и PD-1 ассоциирована с меньшей общей выживаемостью больных опухолями эпителиального происхождения, что особенно относится к PDL-1 [13]. В более поздних работах сообщается об отсутствии прогностической роли экспрессии этих маркеров при оценке общей и бессобытийной выживаемости больных раком легкого, получающих химиолучевую терапию [33], и опухолями носоглотки [16]. У больных раком желудка с помощью многофакторного анализа было показано, что для регионарного и отдаленного метастазирования независимыми факторами неблагоприятного прогноза, напротив, являются низкие уровни мРНК PD-1 и CD8, причем авторами установлена статистически значимая связь между экспрессией мРНК и соответствующего белка [17]. Описанные нами локальные характеристики опухолевых и иммунокомпетентных клеток свидетельствуют о том, что опухоль становится менее «узнаваемой» для кле-

ток иммунной системы и, возможно, менее чувствительной к ингибиторам контрольных точек.

Снижение экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости МНС I класса (HLA-ABC), отмеченное при нарастании распространенности КРР и ухудшении исхода, расценивается в качестве фактора негативного прогноза, что подтверждает данные литературы [18] и отражает возможность угнетения адаптивного иммунитета, в частности, его антиген-презентирующего и распознающего звеньев у таких больных. Прогностическое значение экспрессии HLA-E описывается в литературе как различное в зависимости от состава опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток. Являясь лигандом для NK-клеточного ингибирующего рецептора NKG2A [10], HLA-E также вовлечен во взаимодействие и с другими рецепторами цитотоксических лимфоцитов и натуральных киллеров, что позволяет ему проявлять разнонаправленные влияния на иммунное микроокружение и опухолевый рост. У исследованных нами больных его экспрессия снижалась при нарастании распространенности КРР и при ухудшении исхода параллельно с экспрессией классических молекул главного комплекса гистосовместимости и при повышении в опухолевой ткани уровней ОСК и НКТ.

Повышение количества опухолевых клеток с маркерами стволовых у больных с метастатическим КРР и неблагоприятным исходом лечения подтверждает многочисленные данные литературы, согласно которым ОСК обеспечивают сохранность пула злокачественных клеток для рецидивирования и метастазирования, а также обуславливают химиорезистентность и агрессивность опухоли [34] и расцениваются как независимый фактор негативного прогноза по показателям общей и бессобытийной выживаемости [36].

Повышение уровня натуральных киллеров наблюдалось нами только в крови больных, причем при метастазировании в регионарные лимфатические узлы показатели их функциональных тестов не меняются, а при развитии отдаленного метастазирования их активность подавлена, судя по снижению содержания в них перфорина. В отличие от них, увеличение процента НКТ при генерализации КРР выявлялось в ткани опухоли, что предположительно связано с преобладанием среди них TH2- и Treg-подобных субпопуляций, способствующих опухолевой прогрессии [20].

В крови больных КРР частой находкой при метастазировании и последующем летальном исходе было повышение ответа гранулоцитов и моноцитов в тесте Phagoburst при добавлении fMLF, обозначенного в тест-системе как слабый стимулятор кислородного взрыва. Тем не менее *in vivo*

это вещество из группы N-формилпептидов известно, как продукт метаболизма, протекающего в митохондриях, и как мощный хемоаттрактант нейтрофилов, стимулятор их миграции в очаг воспаления, продукции цитокинов, генерации активных форм кислорода и других видов активности [14]. Описано его значение в развитии воспалительных заболеваний кишечника, но, поскольку он как агонист формил-пептидных рецепторов (FPR), участвует в распознавании PAMP и DAMP, то через последние может играть роль и при опухолях. Такая роль отмечена у одного из агонистов FPR2 (антимикробного белка LL-37), сходного с fMLF по происхождению и спектру биологической активности [9]. Ростостимулирующая активность fMLF может быть опосредована стимуляцией миграции нейтрофилов, образующих внеклеточные ловушки, моделированием внеклеточного матрикса, угнетением функций Т-эффекторов, стимуляцией неоангиогенеза [13, 25]. Другим механизмом такого действия fMLF, реализуемым в организме, может быть гиперпродукция провоспалительных цитокинов и хемокинов, проонкогенные свойства которых хорошо известны. Наблюдаемое нами повышение в крови уровня IL-6 при регионарном и отдаленном метастазировании и ухудшении прогноза КРР еще раз подчеркивает его роль в распространении опухоли, а прогностическая значимость IL-10, также считающегося проонкогенным, проявилась только в группе больных с развивающимся метастазированием.

Таким образом, на основании проведенного исследования выявлен круг иммунологических факторов и характеристик опухолевых клеток, которые могут рассматриваться в качестве прогностических при КРР.

Заключение

В данной работе у 299 больных КРР с различной распространенностью на этапе хирургического лечения проведено исследование показателей системного и локального иммунитета, а также ряда иммунофенотипических характеристик опухолевых клеток для выявления наиболее прогностически значимых из них, что определяли, наблюдая клиническую динамику больных в течение 7,5 лет. Получены различия в зависимости от исходного наличия или отсутствия регионарных и отдаленных метастазов, а также неблагоприятного исхода (метастазирования, летального исхода), развившегося в ходе наблюдения. Установлены прогностические факторы неблагоприятного течения КРР: высокие уровни IL-6 и IL-10, моноцитов и гранулоцитов, отвечающих на fMLF в крови, повышение уровня НКТ клеток и ОСК при снижении МНС-экспрессирующих опухолевых клеток в ткани. Дальнейшего исследования заслуживает значение выявленного снижения экспрессии PD-1/PDL-1 в клетках опухоли и лимфоцитах ее микроокружения при генерализованном КРР, т.к. рецептор и лиганд клеточной гибели являются мишенями для иммунотерапии препаратами ингибиторами контрольных точек.

Благодарности

Авторы выражают благодарность доценту кафедры медицинской и биологической физики ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кандидату медицинских наук А.А. Демидовой за проведение статистической обработки данных.

Список литературы / References

1. Кит О.И., Новикова И.А., Бахтин А.В., Никипелова Е.А., Шатова Ю.С., Габараева В.М., Нистратова О.В. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови // Международный журнал экспериментального образования, 2013. №. 11-2. С. 37-39. [Kit O.I., Novikova I.A., Bakhtin A.V., Nikipelova E.A., Shatova Yu.S., Gabareva V.M., Nistratova O.V. The first experience of detection circulating tumor cells in peripheral blood. *Mezhdunarodnyy zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2013, no. 11-2, pp. 37-39. (In Russ.)]
2. Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Никипелова Е.А., Новикова И.А. Местный клеточный иммунитет при аденокарциноме и полипах толстой кишки // Сибирское медицинское обозрение, 2012. Т. 76, №. 4. С. 11-16. [Kit O.I., Shaposhnikov A.V., Zlatnik E.Yu., Nikipelova E.A., Novikova I.A. Local cellular immunity in adenocarcinoma and large intestine polyps. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2012, Vol. 76, no. 4, pp. 11-16. (In Russ.)]
3. Кжышковская Ю.Г., Стахеева М.Н., Литвяков Н.В., Савельева О.Е., Митрофанова И.В., Степанов И.В., Грачев А.Н., Герашченко Т.С., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В. Иммунная система и эффективность противоопухолевого лечения. Томск: Издательство Томского университета, 2015. 164 с. [Kzhyshkovska Yu.G., Stakheeva M.N., Litviakov N.V., Savelyeva O.E., Mitrofanova I.V., Stepanov I.V., Gratchev A.N., Gerashchenko T.S., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V. Immune system and the efficacy of cancer treatment]. Tomsk: Tomsk University Publishing House, 2015. 164 p.
4. Перельмутер В.М., Таширева Л.А., Манских В.Н., Денисов Е.В., Савельева О.Е., Кайгородова Е.В., Завьялова М.В. Иммуновоспалительные реакции в микроокружении гетерогенны, пластичны, определяют

- противоопухолевый эффект или агрессивное поведение опухоли // Журнал общей биологии. Томск, 2017. Т. 78, № 5. С. 15-36. [Perelmuter V.M., Tashireva L.A., Manskikh V.N., Denisov E.V., Savelieva O.E., Kaygorodova E.V., Zavyalova M.V. Heterogeneity and plasticity of immune-inflammatory responses in tumor microenvironment: A role in antitumor effect and tumor aggressiveness. *Zhurnal obshchey biologii. Tomsk = Journal of General Biology, Tomsk, 2017, Vol. 78, no. 5, pp. 15-36.* (In Russ.)]
5. Arnold C.R., Mangesius J., Skvortsova I.I., Ganswindt U. The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Front. Oncol.*, 2020, Vol. 10, 164. doi: 10.3389/fonc.2020.00164.
 6. Athauda A., Segelov E., Ali Z., Chau I. Integrative molecular analysis of colorectal cancer and gastric cancer: What have we learnt? *Cancer Treat. Rev.*, 2019, Vol. 73, pp. 31-40.
 7. Ayob A.Z., Ramasamy T.S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J. Biomed.Sci.*, 2018, Vol. 25, no. 1, pp. 1-18.
 8. Capp J.P. Cancer stem cells: From historical roots to a new perspective. *J. Oncol.*, 2019, Vol. 2019, 5189232. doi: 10.1155/2019/5189232.
 9. Coffelt S.B., Marini F.C., Watson K., Zwezdaryk K.J., Dembinski J.L. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2009, Vol. 106, no. 10, pp. 3806-3811.
 10. Cooley S., Miller J.S. Clinical trials of NK cells for cancer. In: Natural Killer Cells, 2010, pp. 555-570.
 11. Desai A., Yan Y., Gerson S.L. Concise Reviews: Cancer Stem Cell Targeted Therapies: Toward Clinical Success. *Stem Cells Transl. Med.*, 2019, Vol. 8, no. 1, pp. 75-81.
 12. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 329-360.
 13. Guo B., Oliver T.G. Partners in Crime: Neutrophil-CTC Collusion in Metastasis. *Trends Immunol.*, 2019, Vol. 40, no. 7, pp. 556-559.
 14. He H.Q., Ye R.D. The formyl peptide receptors: diversity of ligands and mechanism for recognition. *Molecules*, 2017, Vol. 22, no. 3, 455. doi: 10.3390/molecules22030455.
 15. Heeke S., Mograbi B., Alix-Panabières C., Hofman P. Never travel alone: the crosstalk of circulating tumor cells and the blood microenvironment. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 7, 714. doi: 10.3390/cells8070714.
 16. Huang, Z.L., Liu S., Wang G.N., Zheng S.H., Ding S.R., Tao Y.L., Chen C., Liu S.R., Yang X., Chang H., Wang X.H., Xia Y.F. The prognostic significance of PD-L1 and PD-1 expression in patients with nasopharyngeal carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cell Int.*, 2019, Vol. 19, 141. doi: 10.1186/s12935-019-0863-5.
 17. Ito S., Masuda T., Noda M., Hu Q., Shimizu D., Kuroda Y., Eguchi H., Tobo T., Utsunomiya T., Mimori K. Prognostic Significance of PD-1, PD-L1 and CD8 Gene Expression Levels in Gastric Cancer. *Oncology*, 2020, Vol. 98, no. 7, pp. 501-511.
 18. Iwayama Y., Tsuruma T., Mizuguchi T., Furuhashi T., Toyota N., Matsumura M., Torigoe T., Sato N., Hirata K. Prognostic value of HLA class I expression in patients with colorectal cancer. *World J. Surg. Oncol.*, 2015, Vol. 13, no. 1, pp. 1-7.
 19. Kim R., Cancer immunoediting: from immune surveillance to immune escape. *Cancer Immunother.*, 2007, pp. 9-27.
 20. Krijgsman D., Hokland M., Kuppen P.J.K. The role of natural killer T cells in cancer—a phenotypical and functional approach. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 367. doi: 10.3389/fimmu.2018.00367.
 21. Kuşoğlu A., Avcı Ç. B. Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene*, 2019, Vol. 681, pp. 80-85.
 22. Leblanc R., Peyruchaud O. Metastasis: new functional implications of platelets and megakaryocytes. *Blood*, 2016, Vol. 128, no. 1, pp. 24-31.
 23. Leone K., Poggiana C., Zamarchi R. The interplay between circulating tumor cells and the immune system: from immune escape to cancer immunotherapy. *Diagnostics*, 2018, Vol. 8, no. 3, 59. doi: 10.3390/diagnostics8030059.
 24. Lin A., Yan W.H. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cancers: roles in immune evasion, metastasis and target for therapy. *Mol. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 1, pp. 782-791.
 25. Mollinedo F. Neutrophil degranulation, plasticity, and cancer metastasis. *Trends Immunol.*, 2019, Vol. 40, no. 3, pp. 228-242.
 26. Pan Q., Li Q., Liu S., Ning N., Zhang X., Xu Y. Concise review: targeting cancer stem cells using immunologic approaches. *Stem Cells*, 2015, Vol. 33, no. 7, pp. 2085-2092.
 27. Pang R., Law W.L., Chu A.C.Y., Poon J.T., Lam C.S.C., Chow A.K.M., Ng L., Cheung L.W.H., Lan X.R., Lan H.Y., Tan V.P.Y., Yau T.C., Poon R.T., Wong B.C.Y. A subpopulation of CD26⁺ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell*, 2010, Vol. 6, no. 6, pp. 603-615.
 28. Phi L.T.H., Sari I.N., Yang Y.G., Lee S.H., Jun N., Kim K.S., Lee Y.K., Kwon Y.H. Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. *Stem Cells Int.*, 2018, Vol. 2018, 5416923. doi: 10.1155/2018/5416923.
 29. Saunders M., Iveson T. Management of advanced colorectal cancer: state of the art. *Br. J. Cancer*, 2006, Vol. 95, no. 2, pp. 131-138.
 30. Shibata M., Hoque M.O. Targeting Cancer Stem Cells: A Strategy for Effective Eradication of Cancer. *Cancers*, 2019, Vol. 11, no. 5, 732. doi: 10.3390/cancers11050732.
 31. Spillane J.B., Henderson M.A. Cancer stem cells: a review. *ANZ J. Surg.*, 2007, Vol. 77, no. 6, pp. 464-468.

32. Steinert G., Schölch S., Niemiets T., Iwata N., García S.A., Behrens B., Voigt A., Kloor M., Benner A., Bork U., Rahbari N.N., Büchler M.W., Stoecklein N.H., Weitz J., Koch M. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res.*, 2014, Vol. 74, no. 6, pp. 1694-1704.
33. Vrankar M., Kern I., Stanic K. Prognostic value of PD-L1 expression in patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer treated with chemoradiotherapy. *Radiation Oncol.*, 2020, Vol. 15, no. 1, pp. 1-12.
34. Walcher L., Kistenmacher A.K., Suo H., Kitte R. Cancer Stem Cells – Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1280. doi: 10.3389/fimmu.2020.01280.
35. Wang X., Sun Q., Liu Q., Wang C., Yao R., Wang Y. CTC immune escape mediated by PD-L1. *Med. Hypotheses*, 2016, Vol. 93, pp. 138-139.
36. Zahran A.M., Rayan A., Fakhry H., Attia A.M., Ashmawy A.M., Soliman A., Elkady A., Hetta H.F. Pretreatment detection of circulating and tissue CD133⁺ CD44⁺ cancer stem cells as a prognostic factor affecting the outcomes in Egyptian patients with colorectal cancer. *Cancer Manag. Res.*, 2019, Vol. 11, pp. 1237-1248.
37. Zeuner A., Todaro M., Stassi G., De Maria R. Colorectal cancer stem cells: from the crypt to the clinic. *Cell Stem Cell*, 2014, Vol. 15, no. 6, pp. 692-705.
38. Zhang Y., Kang S., Shen J., He J., Jiang L. Prognostic significance of programmed cell death 1 (PD-1) or PD-1 ligand 1 (PD-L1) Expression in epithelial-originated cancer: a meta-analysis. *Medicine*, 2015, Vol. 94, no. 6, e515. doi:10.1097/MD.0000000000000515.
39. Zhang D., Tang D.G., Rycaj K. Cancer stem cells: regulation programs, immunological properties and immunotherapy. *Semin. Cancer Biol.*, 2018, Vol. 52, Pt 2, pp. 94-106.

Авторы:

Златник Е.Ю. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Новикова И.А. — к.м.н., заместитель генерального директора по науке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Бондаренко Е.С. — младший научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Ульянова Е.П. — научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Ситковская А.О. — научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, исполняющий обязанности заведующего лабораторией клеточных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Zlatnik E.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Tumor Immunophenotyping, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Novikova A.A., PhD (Medicine), Deputy Director for Research, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Bondarenko E.S., Junior Research Associate, Laboratory of Tumor Immunophenotyping, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Ulyanova E.P., Research Associate, Laboratory of Tumor Immunophenotyping, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Sitkovskaya A.O., Research Associate, Acting Director, Laboratory of Cell Technologies, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 30.04.2021
Принята к печати 07.11.2021

Received 30.04.2021
Accepted 07.11.2021