значениях относительно больных изолированной бронхиальной астмой, имеющих наивысший уровень, и пациентов с изолированной гипертонической болезнью, у которых были зафиксированы наименьшие значения. Исходя из этого, можно сделать вывод, что уровень метаболитов оксида азота в крови изменяется разнонаправленно, повышаясь при бронхиальной астме и снижаясь при гипертонической болезни. При этом при бронхиальной астме уровень метаболитов оксида азота в крови имеет тенденцию к повышению с увеличением степени тяжести бронхиальной астмы и увеличением объёма базисной терапии.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Верткин А.Л., Скотников А.С. Коморбидность. *Леч. врач*. 2013; (8): 78. [Vertkin A.L., Skotnikov A.S. Comorbidity. *Lechashchiy vrach*. 2013; (8): 78. (In Russ.)]

2. Chen W., Lynd L.D., FitzGerald J.M. et al. Excess medical costs in patients with asthma and the role of comorbidity. *Eur. Respir. J.* 2016; 48 (6): 1584–1592. DOI: 10.1183/13993003.01141-2016.

3. Ghosh S., Erzurum S. Modulation of asthma pathogenesis by nitric oxide pathways and therapeutic opportunities. *Drug Discov. Today Dis. Mech*. 2012; 9 (3–4): e89–94. DOI: 10.1016/j.ddmec.2012.10.004.

4. Prado C., Martins M., Tibério I. Nitric oxide in asthma physiopathology. *ISRN Allergy*. 2011; 2011: 832560. DOI: 10.5402/2011/832560.

5. Aytekin M., Aulak K., Haserodt S. et al. Abnormal platelet aggregation in idiopathic pulmonary arterial hypertension: role of nitric oxide. *AJP Lung Cell Mol. Physiol*. 2012; 302 (6): L512–520. DOI: 10.1152/ajplung.00289.2011.

6. Белозёров В.К., Рубанова М.П., Вебер В.Р. и др. Эндотелийзависимая вазодилатация и состояние стенки сонной артерии. *Кардиоваск. терап. и профил*. 2014; 13 (S2): 16. [Belozerov V.K., Rubanova M.P., Veber V.R. et al. Endothelium-dependent vasodilation and the state of the carotid artery wall. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2014; 13 (S2): 16. (In Russ.)]

7. Kumar R., Kohli S., Mishra A. et al. Interactions between the genes of vasodilatation pathways influence blood pressure and nitric oxide level in hypertension. *Am. J. Hypertens*. 2015; 28 (2): 239–247. DOI: 10.1093/ajh/hpu130.

8. Hernansanz-Agustín P., Izquierdo-Álvarez A., García-Ortiz A. et al. Nitrosothiols in the immune system: signaling and protection. *Antioxid. Redox Signal*. 2013; 18 (3): 288–308. DOI: 10.1089/ars.2012.4765.

9. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. *Клин. лаб. диагностика*. 2005; (6): 15. [Metel'skaya V.A., Gumanova N.G. Screening as a method for determining the serum level of nitric oxide metabolites. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2005; (6): 15. (In Russ.)]

10. Абатуров А.Е. Роль монооксида азота в системе неспецифической защиты респираторного тракта. *Здоровье ребёнка*. 2009; (1): 130–137. [Abaturov A.E. Role of nitric monoxide in non-specific protective system of respiratory tract. *Zdorov'e rebenka*. 2009; (1): 130–137. (In Russ.)]

11. Козина О.В. Метаболизм нитрозотиолов при аллергическом воспалении. *Бюлл. СО РАМН*. 2010; 30 (1): 109–116. [Kozina O.V. Metabolism of nitrosothiols at an allergic inflammation. *Byulleten' SO RAMN*. 2010; 30 (1): 109–116. (In Russ.)]

УДК 575.174.015.3: 576.367: 616.33-006.6: 611.345-006.6: 612.112.92

© 2017 Дмитриева А.И. и соавторы

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЖЕЛУДКА И ТОЛСТОЙ КИШКИ С ТКАНЕВОЙ ЭОЗИНОФИЛИЕЙ

Алла Ивановна Дмитриева[1,2], Кристина Игоревна Янкович[1,2], Юлия Владимировна Колобовникова[1], Ольга Ивановна Уразова[1], Игорь Леонидович Пурлик[1,2], Лев Александрович Кудяков[2], Вячеслав Викторович Новицкий[1]*

[1]Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия;
[2]Томский областной онкологический диспансер, г. Томск, Россия

Поступила 05.04.2017; принята в печать 02.05.2017.

Реферат **DOI: 10.17750/KMJ2017-496**

Цель. Изучить молекулярно-генетические и морфологические особенности новообразований при раке желудка и толстой кишки, сопровождающемся тканевой эозинофилией.

Методы. Материалом исследования служили образцы тканей злокачественных новообразований желудка и толстой кишки, полученные при оперативном вмешательстве. Группы исследования были сформированы в зависимости от наличия или отсутствия эозинофильной инфильтрации ткани опухоли, а также от локализации новообразования. Были проанализированы истории болезни и амбулаторные карты пациентов, оценивали наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах и степень дифференцировки опухолевых клеток. В опухолевой ткани оценивали экспрессию белков p53 и p21 иммуногистохимическим методом. Для исследования распределения полиморфных вариантов генов *p53 (G215C)* и *p21 (A1026G)* проводили выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты из образцов тканей, фиксированных в формалине и залитых в парафин, полученных с границы резекции. Генотипирование образцов дезоксирибонуклеиновой кислоты по полиморфизмам генов осуществляли путём анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов продуктов амплификации

Адрес для переписки: yankovich-kristina@mail.ru

с помощью полимеразной цепной реакции специфических участков генома с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете.

Результаты. Показано, что у пациентов с раком толстой кишки, сопровождающимся тканевой эозинофилией, клетки опухоли имели более высокую степень дифференцировки, чем у пациентов без эозинофилии. При раке желудка, сопровождающемся эозинофильной инфильтрацией, реже регистрировали регионарные метастазы. В ткани новообразований желудка и толстой кишки с эозинофильной инфильтрацией значительно чаще отмечали низкую экспрессию мутантной формы белка p53 в отличие от опухолей без эозинофилии. Также у пациентов с раком желудка и толстой кишки установлена ассоциация тканевой эозинофилии с носительством аллеля *G* полиморфизма гена *p53 (G215C)*.

Вывод. Тканевая эозинофилия при раке желудка и толстой кишки ассоциирована с благоприятными морфологическими характеристиками опухоли, низкой экспрессией мутантного белка p53 и носительством аллеля *G* полиморфизма *p53 (G215C)*.

Ключевые слова: эозинофилия, белки-регуляторы клеточного цикла, полиморфизм генов, рак желудка, рак толстой кишки.

MOLECULAR GENETIC AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF MALIGNANT NEOPLASMS OF THE STOMACH AND COLON WITH TISSUE EOSINOPHILIA

A.I. Dmitrieva[1,2], K.I. Yankovich[1,2], Yu.V. Kolobovnikova[1], O.I. Urazova[1], I.L. Purlik[1,2], L.A. Kudyakov[2], V.V. Novitskiy[1]

[1]Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

[2]Tomsk Regional Oncology Center, Tomsk, Russia

Aim. To study molecular genetic and morphological features of neoplasms in stomach and colon cancer associated with tissue eosinophilia.

Methods. Study material was the tissue samples of malignant neoplasms of the stomach and colon obtained from the surgical procedures. Study groups were identified depending on the presence or absence of eosinophilic infiltration of the tumour tissue as well as on neoplasm localization. Medical records and outpatient patient cards were analyzed, presence of matastases in regional lymph nodes and grade of differentiation of malignant cells were evaluated. In tumour tissue expression of p53 and p21 proteins was evaluated by means of immunohistochemical technique. To study the distribution of polymorphic variants of *p53 (G215C)* and *p21 (A1026G)* genes, deoxyribonucleic acid extraction was performed from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples obtained from the resection margins. Polymorphism genotyping of deoxyribonucleic acid samples was performed by restriction fragment length polymorphism analysis of amplification products with the use of polymerase chain reaction of specific genome regions with further visualization with ultraviolet light.

Results. In patients with colon cancer associated with tissue eosinophilia tumour cells were shown to have higher grade of differentiation than in patients without eosinophilia. In stomach cancer associated with eosinophilic infiltration low expression of mutant p53 protein was revealed significantly more frequently as opposed to cancer without eosinophilia. Also in patients with stomach and colon cancer, association of tissue eosinophilia with carriage of *G* allele of *p53 (G215C)* gene polymorphism was found.

Conclusion. Tissue eosinophilia in stomach and colon cancer is associated with favourable morphological cancer characteristics, low expression of mutant p53 protein and carriage of *G* allele of *p53 (G215C)* polymorphism.

Keywords: eosinophilia, cell cycle protein regulators, gene polymorphism, stomach cancer, colon cancer.

Эозинофильные гранулоциты могут инфильтрировать опухолевую ткань и участвовать в защите организма человека от опухолевой трансформации клеток [1–3]. Некоторые авторы отмечают наличие связи тканевой эозинофилии с благоприятным прогнозом заболевания и увеличением 5-летней выживаемости пациентов с опухолевой патологией [2, 3]. Вместе с тем, в литературе есть сведения о способности эозинофилов обеспечивать процесс ремоделирования тканей и, напротив, содействовать развитию и прогрессированию опухоли [4, 5].

Морфологические характеристики опухоли, позволяющие судить о злокачественном потенциале новообразования, — степень дифференцировки клеток и наличие метастазов [6].

Рост и развитие новообразований регулируются балансом между процессом деления клеток и их программированной гибелью. Ключевым регулятором пролиферации и апоптоза клеток служит белок-регулятор клеточного цикла p53, изменяющий транскрипцию гена другого белка p21 [6]. Последний вызывает остановку клеточного цикла и индуцирует p53-зависимый апоптоз клеток.

При опухолевых заболеваниях весьма часто выявляют мутации гена *p53*, обусловливающие изменение конформации молекулы белка p53 и накопление в опухолевых клетках его мутантной формы. Одновременно с этим может снижаться экспрессия белка p21 вплоть до полного его отсутствия [6]. По данным литературы, повышенная экспрессия мутантной формы белка p53 и низкий уровень экспрессии белка p21 в клетках различных опухолей ассоциированы с негативным течением опухолевого процесса [6, 7]. Активность и уровень экспрессии белков-регуляторов клеточного цикла определяются также полиморфизмом их генов, связанным с заменой единичных нуклеотидов [8].

Цель настоящей работы — изучить молекулярно-генетические и морфологичес-

© 33. «Казанский мед. ж.», №4

кие особенности новообразований при раке желудка и толстой кишки, сопровождающемся тканевой эозинофилией.

Исследование выполнено на базе ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (ОГАУЗ «ТООД»). В исследование были включены пациенты с раком желудка и толстой кишки, находившиеся на лечении и состоящие на диспансерном учёте в ОГАУЗ «ТООД». Все пациенты были прооперированы до начала проведения специфической лучевой и цитостатической терапии.

На первом этапе было проведено гистологическое исследование образцов тканей злокачественных новообразований, полученных при оперативном вмешательстве и заключённых в парафин. По результатам гистологического исследования опухоли (локализация новообразования и наличие/отсутствие эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани) были сформированы группы пациентов.

Эозинофильную инфильтрацию ткани оценивали полуколичественным методом путём прямого подсчёта тканевых эозинофилов в «горячих точках» вблизи опухолевого поражения, просматривали не менее 20 полей зрения (×400) с помощью светового микроскопа Leica DM2000 (Leica Microsystems, Германия). Присутствие 10 эозинофилов и более в поле зрения расценивали как тканевую эозинофилию [9]. При отсутствии или наличии единичных эозинофилов в поле зрения делали вывод об отсутствии опухолеассоциированной тканевой эозинофилии.

Для изучения экспрессии белков p53 и p21 в группу пациентов со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта, сопровождающимися тканевой эозинофилией, были включены 25 пациентов с раком желудка (средний возраст 65,3±4,7 года) и 23 пациента с раком толстой кишки (средний возраст 63,0±7,3 года). Среди обследованных пациентов, в опухолевой ткани которых не регистрировалась эозинофильная инфильтрация, 27 пациентов имели рак желудка (средний возраст 62,9±5,2 года), 32 пациента — рак толстой кишки (средний возраст 61,3±6,0 лет).

Для изучения молекулярно-генетических показателей группы исследования были увеличены путём включения в первоначальные группы других пациентов. Число пациентов с раком желудка и толстой кишки, сопровождающимся тканевой эозинофилией, составило 204 человека, из них 100 пациентов с раком желудка (средний возраст 64,2±7,2 года) и 104 человека с раком толстой кишки (средний возраст 61,5±9,0 лет). В группу пациентов без тканевой эозинофилии были включены 113 человек с раком желудка (средний возраст 63,8±6,2 года) и 110 человек с раком толстой кишки (средний возраст 62,9±6,0 лет).

Были проанализированы истории болезни и амбулаторные карты пациентов, оценивали наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах и степень дифференцировки опухолевых клеток.

Критериями исключения пациентов из исследования было наличие в анамнезе хронических воспалительных процессов, психических, аутоиммунных и/или наследственных заболеваний, аллергии и гельминтозов, а также опухолей других локализаций.

Исследование экспрессии белков p53 и p21 в опухолевой ткани проводили методом иммуногистохимии на парафиновых срезах, докрашивали гематоксилином с использованием автоматического иммуногистостейнера Bond-maX (Leica Biosystems, Германия). В исследовании применяли моноклональные антитела фирмы «Leica Biosystems» (Германия) к p53 (клон DO-7, RTU, мышиные) и p21 (клон 4D10, рабочее разведение 1:40, мышиные). Оценку экспрессии исследуемых белков в опухолевой ткани осуществляли полуколичественным способом в участках максимальной экспрессии маркёра (в «горячих точках»), что более воспроизводимо, чем в случайных полях зрения.

При анализе экспрессии мутантного белка p53 оценивали долю клеток с позитивно окрашенными ядрами. Экспрессию мутантного белка p53 считали низкой, если количество окрашенных клеток было менее 25% либо ядерная реакция в ткани отсутствовала. Позитивное умеренное (26–75%) и сильное (более 75%) окрашивание расценивали как высокий уровень экспрессии мутантного белка p53 [10].

При анализе экспрессии белка p21 оценивали долю опухолевых клеток с позитивно окрашенными ядрами. Экспрессию белка p21 считали низкой, если количество окрашенных клеток было менее 10% либо ядерная реакция в ткани отсутствовала. Позитивное умеренное (10–50%) и сильное (более 50%) окрашивание расценивали как высокий уровень экспрессии маркёра [7].

Заключительным этапом исследования

Таблица 1

Степень дифференцировки клеток опухоли у больных раком желудка и толстой кишки

Степень дифференцировки клеток	Локализация опухоли, абс. (%)			
	Рак желудка (n=213)		Рак толстой кишки (n=214)	
	С тканевой эозинофилией (n=100)	Без тканевой эозинофилии (n=113)	С тканевой эозинофилией (n=104)	Без тканевой эозинофилии (n=110)
Низкая	34 (34)	49 (43,4)	11 (10,6)	38 (34,5)
Высокая и умеренная	66 (66)	64 (56,6)	93 (89,4)	72 (65,5)
	χ^2=1,955; p >0,05		χ^2=17,396; p<0,05; φ=0,285	

Примечание: p — уровень статистической значимости различий между группами больных; χ^2 — критерий Пирсона; φ — критерий для оценки силы взаимосвязи между номинальными переменными.

было генотипирование пациентов по полиморфизмам генов *p53* и *p21*. Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) проводили из образцов тканей, фиксированных в формалине и залитых в парафин, которые были получены с границы резекции (нормальная ткань), с использованием коммерческого набора «FFPET DNA — Extraction Kit» (Биолинк, Новосибирск).

Генотипирование образцов ДНК по полиморфизмам генов *p53 (G215C)* и *p21 (A1026G)* осуществляли путём анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов продуктов амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) специфических участков генома с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете. Для ПЦР были использованы специфичные пары праймеров: *p53 (G215C)* F: 5'-TTG-CCG-TCC-CAA-GCA-ATG-GAT-GA-3', R: 5'-TCT-GGG-AAG-GGA-CAG-AAG-ATG-AC-3' (температура отжига 62,5 °C); *p21 (A1026G)* F: 5'-CAT-TTC-TTT-GCT-GCA-TGA-TCT-GAG-TT-3', R: 5'-CCC-TAC-ACT-CAC-CTG-AAC-AGA-AGG-3' (температура отжига 61 °C) [8].

Реакционная смесь для ПЦР содержала 10 мкл образца ДНК, буфер для амплификации в финальной концентрации ×1, по 5 пмоль праймеров (Медиген, Новосибирск), 2 ед.акт. SuperHotTaq-ДНК-полимеразы, 1,5 ммоль/л $MgCl_2$, 0,8 ммоль/л смеси dNTP (Bioron GmbH, Германия) и дистиллированную воду до конечного объема 50 мкл.

Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 94 °C (5 мин), 30 циклов отжига при специфической для каждой пары праймеров температуре в течение 45 с, элонгации при 72 °C (45 с) и денатурации при 94 °C (45 с). Программу завершала элонгация при 72 °C в течение 3 мин [8].

ПЦР-продукт гена *p53 (G215C)* подвергали гидролизу рестриктазой *BstFNI* (Сибэнзим, Новосибирск) в течение 4 ч при 60 °C. При наличии дикого *G*-аллеля амплифицированный в ходе ПЦР участок гена *p53*, размером 199 п.н. гидролизуется рестриктазой BstFNI на 2 фрагмента — 113 и 86 п.н. Вариант *C* приводит к исчезновению сайта рестрикции для BstFNI, и ПЦР-продукт в 199 п.н. не гидролизуется [8]. Амплификат гена *p21 (A1026G)* инкубировали с эндонуклеазой рестрикции *HinfI* (Сибэнзим, Новосибирск) при 65 °C в течение 12 ч. После электрофоретической идентификации в 4% агарозном геле визуализировали бэнд 186 п.н. (*G*-аллель) и бэнды 166 и 20 п.н. (*A*-аллель) [8]. Для всех изученных полиморфных вариантов генов распределение генотипов соответствовало ожидаемому при соблюдении условий равновесия Харди–Вайнберга.

Для расчёта достоверности различий между группами сравнения проводили анализ таблиц сопряжённости с использованием критерия χ^2 Пирсона. Для определения меры связи между переменными вычисляли коэффициент φ. Отношение шансов (OR — от англ. oddis ratio) указывали с доверительным интервалом (ДИ) 95%.

При гистологическом исследовании образцов опухолевой ткани у 89,4% больных раком толстой кишки с эозинофильной инфильтрацией обнаружена высокая и умеренная степень дифференцировки клеток опухоли, в то время как у пациентов с раком толстой кишки без эозинофилии высокодифференцированные опухоли зарегистрированы в 65,5% случаев (p <0,05). Анализ степени дифференцировки клеток опухолей при раке желудка не позволил установить статистически значимых различий (табл. 1).

При оценке состояния регионарных лимфатических узлов у 17% пациентов с раком желудка, сопровождающимся эозинофильной инфильтрацией опухоли, диагностированы лимфогенные метастазы (табл. 2). При раке желудка без эозинофилии

Таблица 2

Частота метастазов в регионарных лимфатических узлах у больных раком желудка и толстой кишки

Статус регионарных лимфатических узлов	Локализация опухоли, абс. (%)			
	Рак желудка (n=213)		Рак толстой кишки (n=214)	
	С тканевой эозинофилией (n=100)	Без тканевой эозинофилии (n=113)	С тканевой эозинофилией (n=104)	Без тканевой эозинофилии (n=110)
N0	83 (83,0)	76 (67,3)	88 (84,6)	87 (79,1)
N+	17 (17,0)	37 (32,7)	16 (15,4)	23 (20,9)
	χ^2=6,948; p <0,05; φ=0,181		χ^2=1,095; p>0,05	

Примечание: p — уровень статистической значимости различий между группами больных; χ^2 — критерий Пирсона; φ — критерий для оценки силы взаимосвязи между номинальными переменными.

Таблица 3

Экспрессия белка p53 в опухолевой ткани у больных раком желудка и толстой кишки

Экспрессия белка p53	Локализация опухоли, абс. (%)			
	Рак желудка (n=52)		Рак толстой кишки (n=55)	
	С тканевой эозинофилией (n=25)	Без тканевой эозинофилии (n=27)	С тканевой эозинофилией (n=23)	Без тканевой эозинофилии (n=32)
Низкая	20 (80)	11 (41)	17 (73,9)	12 (37,5)
Высокая	5 (20)	16 (59)	6 (26,1)	20 (62,5)
	χ^2= 8,310; p <0,05; φ=0,400		χ^2=7,118; p <0,05; φ=0,360	

Примечание: p — уровень статистической значимости различий между группами больных; χ^2 — критерий Пирсона; φ — критерий для оценки силы взаимосвязи между номинальными переменными.

поражения регионарных лимфатических узлов выявлены в 32,7% случаев (p <0,05). У пациентов с раком желудка установлена слабая взаимосвязь опухолеассоциированной тканевой эозинофилии с отсутствием метастазов в регионарных лимфатических узлах (φ=0,181). По частоте регионарных метастазов между группами пациентов с раком толстой кишки, сопровождающимся эозинофилией и без таковой, статистически значимых различий не выявлено.

У пациентов с раком желудка и толстой кишки также была проанализирована взаимосвязь между тканевой эозинофилией и уровнем экспрессии белков p53 и p21 опухолевыми клетками. По результатам иммуногистохимического исследования установлено, что в опухолях желудка и толстой кишки, сопровождающихся эозинофилией, достоверно чаще регистрировали низкую экспрессию белка p53 в отличие от аналогичного параметра у пациентов с раком желудка и толстой кишки без эозинофилии (табл. 3).

Выявлена средняя сила связи между экспрессией белка p53 в опухолевой ткани и опухолеассоциированной тканевой эозинофилией как при раке желудка, так и при раке толстой кишки (φ=0,400 и φ=0,360 соответственно). Высокий уровень экспрессии белка p21 в опухолевых клетках регистрировали чаще у пациентов с раком желудка и толстой кишки с тканевой эозинофилией (84 и 87% соответственно), чем при злокачественных новообразованиях желудка и толстой кишки без эозинофилии (в 55,6 и 75% соответственно; p >0,05).

В ходе проведённого нами молекулярно-генетического исследования при раке желудка и толстой кишки установлены достоверные различия в распределении полиморфных вариантов гена *p53 (G215C)* (табл. 4). У всех пациентов выявлена положительная ассоциация тканевой эозинофилии с носительством гомозиготного генотипа *GG* (OR=2,19; 95% ДИ=1,24–3,88 при раке желудка и OR=2,09; 95% ДИ=1,20–3,66 при раке толстой кишки), а также аллеля *G* (OR=1,91; 95% ДИ=1,19–3,07 и OR=1,96; 95% ДИ=1,24–3,08 соответственно).

У пациентов с раком желудка и толстой кишки независимо от наличия эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани установлено преобладание аллеля *A* и гомозиготного генотипа *AA* полиморфизма *A1026G* гена *p21.* Однако полученные результаты не достигали статистически значимого уровня различий (см. табл. 4).

Важная характеристика опухолевого процесса — состояние стромы опухоли. Опухолевое микроокружение включает различные типы клеток, в том числе лимфоциты, макрофаги и эозинофильные гранулоциты, способные взаимодействовать

Таблица 4

Распределение полиморфных вариантов генов *p53 (G215C)* и *p21 (A1026G)* у больных раком желудка и толстой кишки, абс (%)

Группы сравнения	*p53 (G215C)*							*p21 (A1026G)*						
	Генотипы			p_1	Аллели		p_2	Генотипы			p_1	Аллели		p_2
	GG	GC	CC		G	C		AA	AG	GG		A	G	
Больные раком желудка с эозинофилией (n=100)	72 (72,0)	23 (23,0)	5 (5,0)	<0,05 χ^2=7,36	167 (83,5)	33 (16,5)	<0,05 χ^2=7,32	62 (62,0)	31 (31,0)	7 (7,0)	>0,05 χ^2=3,07	155 (77,5)	45 (22,5)	>0,05 χ^2=3,49
Больные раком желудка без эозинофилии (n=113)	61 (54,0)	42 (37,2)	10 (8,8)		164 (72,6)	62 (27,4)		58 (51,3)	41 (36,3)	14 (12,4)		157 (69,5)	69 (30,5)	
Больные раком толстой кишки с эозинофилией (n=104)	72 (69,2)	26 (25,0)	6 (5,8)	<0,05 χ^2=7,38	170 (81,7)	38 (18,3)	<0,05 χ^2=8,57	65 (62,5)	34 (32,7)	5 (4,8)	>0,05 χ^2=2,28	164 (78,8)	44 (21,2)	>0,05 χ^2=1,88
Больные раком толстой кишки без эозинофилии (n=110)	57 (51,8)	39 (35,5)	14 (12,7)		153 (69,5)	67 (30,5)		62 (56,4)	37 (33,6)	11 (10,0)		161 (73,2)	59 (26,8)	

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

с трансформированными клетками. Особый интерес вызывает инфильтрация ткани опухоли эозинофилами, обладающими широким арсеналом цитотоксических белков, цитокинов, хемокинов, ферментов и факторов роста [1, 11]. Состав опухолевого микроокружения может служить фактором прогноза течения онкологических заболеваний [5].

В нашем исследовании эозинофильная инфильтрация выявлена преимущественно в опухолях, состоящих из высокодифференцированных клеток, без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов, то есть ассоциирована с благоприятными морфологическими характеристиками новообразования. Ввиду того, что клетки опухолей более высокой степени дифференцировки сохраняют органоспецифические свойства и не в полной мере утрачивают антигены, обладающие иммуногенностью [6], ответная реакция организма на такие новообразования более выражена и, по всей видимости, сопровождается вовлечением эозинофильных гранулоцитов в её развитие.

Противоопухолевые функции эозинофилов связывают со способностью секретировать многие цитотоксические факторы [1, 2, 11]. По данным литературы, совместное культивирование эозинофилов с клеточной линией рака толстой кишки приводило к высвобождению эозинофильного катионного белка, эозинофильного нейротоксина, фактора некроза опухоли α и гранзима А и, как следствие, гибели опухолевых клеток *in vitro* [11].

Другим показателем, характеризующим активность опухолевого процесса, служит экспрессия белков-регуляторов клеточного цикла в клетках новообразования [6, 7, 10]. Высокая ядерная экспрессия белка p53 при онкологической патологии обусловлена накоплением его мутантной формы, не обладающей антионкогенными свойствами. Гиперэкспрессия мутантного p53 ассоциирована с поздними стадиями болезни, метастазированием опухоли и плохим прогнозом заболевания [6, 7]. Выявленная в настоящем исследовании ассоциация тканевой эозинофилии с низкой экспрессией мутантной формы белка p53 в опухолевой ткани указывает на возможное положительное значение этой клеточной реакции.

Следует отметить, что в опухолевых клетках весьма часто обнаруживают мутации гена *p53*, сопровождающиеся изменением конформации молекулы белка, вместе с тем, возможно наличие связи с аллельным полиморфизмом этого гена [1, 8]. Экзонный *G215C*-полиморфизм, определяющий замену аминокислоты Arg на Pro в положении 72 структуры белка p53, связывают с предрасположенностью к развитию опухолей и неблагоприятным фенотипом злокачественных новообразований [8]. В результате проведённого нами исследования полиморфизма *G215C* гена *p53* установлена ассоциация тканевой эозинофилии с носительством «благоприятного» аллеля *G*.

Таким образом, злокачественные новообразования желудка и толстой кишки в сочетании с эозинофильной инфильтрацией характеризуются более благоприятным течением.

Дальнейшие исследования позволят рассматривать тканевую эозинофилию в качестве прогностического фактора, который легко выявить при рутинном гистологическом исследовании препаратов тканей опухолей [5].

ВЫВОД

Тканевая эозинофилия при раке желудка и толстой кишки ассоциирована с благоприятными морфологическими характеристиками опухоли, низкой экспрессией мутантного белка p53 и носительством аллеля *G* полиморфизма *p53 (G215C)*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ для государственной поддержки молодых российских учёных (соглашение №14. W01.17.842-МД) и ведущих научных школ РФ (соглашение №14.W02.16.7906-НШ).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Новицкий В.В. *Эозинофил в норме и при патологии.* Томск: Печатная мануфактура. 2014; 124 с. [Kolobovnikova Yu.V., Urazova O.I., Novitskiy V.V. *Eozinofil v norme i pri patologii.* (The eosinophil in norm and pathology.) Tomsk: Pechatnaya manufaktura. 2014; 124 p. (In Russ.)]

2. Янкович К.И., Дмитриева А.И., Уразова О.И. и др. Опухолеассоциированная эозинофилия. *Вопр. онкол.* 2016; 62 (4): 394–400. [Yankovich K.I., Dmitrieva A.I., Urazova O.I. et al. Tumor-associated eosinophilia. *Voprosy onkologii.* 2016; 62 (4): 394–400. (In Russ.)]

3. Harbaun L., Pollheimer M.J., Kornprat P. et al. Peritumoral eosinophils predict recurrence in colorectal cancer. *Mod. Pathol*. 2015; 28 (3): 403–413. DOI: 10.1038/modpathol.2014.104.

4. Alrawi S.J., Tan D., Stoler D.L. et al. Tissue eosinophilic infiltration: a useful marker for assessing stromal invasion, survival and locoregional recurrence in head and neck squamous neoplasia. *Cancer J.* 2005; 11 (3): 217–225. DOI: 10.1097/00130404-200505000-00008.

5. Jain M., Kasetty S., Sudheendra U.S. et al. Assessment of tissue eosinophilia as a prognosticator in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma — an image analysis study. *Patholog. Res. Int.* 2014; 2014: 507512. DOI: 10.1155/2014/507512.

6. Заридзе Д.Г. *Канцерогенез.* М.: Медицина. 2004; 576 с. [Zaridze D.G. *Kantserogenez.* (Carcinogenesis.) Moscow: Meditsina. 2004; 576 p. (In Russ.)]

7. Prall F., Ostwald C., Nizze H., Barten M. Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21, p27, and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2004; 12 (2): 111–121. DOI: 10.1097/00129039-200406000-00003.

8. Кузнецова И.А., Дмитриева А.И., Ракитин С.С., Новицкий В.В. Полиморфизм генов-регуляторов клеточного цикла *p53* и *p21*$^{WAF1/CIP1}$ при раке лёгкого. *Сибирский мед. ж. (Иркутск).* 2012; 110 (3): 47–50. [Kuznetsova I.A., Dmitrieva A.I., Rakitin S.S., Novitskiy V.V. Polymorphism of genes of cell cycle regulators *p53* and *p21* in lung cancer. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk).* 2012; 110 (3): 47–50. (In Russ.)]

9. Pehlivanoglu B., Doganavsargil B., Sezak M. et al. Gastrointestinal parasitosis: histopathological insights to rare but intriguing lesions of the gastrointestinal tract. *Turk. Patoloji Derg.* 2016; 32 (2): 82–90. DOI: 10.5146/tjpath.2015.01350.

10. Колесник А.П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака лёгкого. *Онкология.* 2013; 15 (1): 20–23. [Kolesnik A.P. Prognostic value of p53 expression in patients with early-stage non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013; 15 (1): 20–23. (In Russ.)]

11. Legrand F., Driss V., Delbeke M. et al. Human eosinophils exert TNF-α and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells. *J. Immunol.* 2010; 185 (12): 7443–7451. DOI: 10.4049/jimmunol.1000446.

УДК 618.11-006.6-076.5: 575.111

ДНК-ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЯИЧНИКОВ

Галина Андреевна Неродо[1], Инна Арнольдовна Новикова[1], Анна Юрьевна Арджа[1], Вера Петровна Никитина[1], Ирина Александровна Косенко[2], Оксана Евгеньевна Кравцова[1], Елена Сергеевна Бондаренко[1]*

[1]Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону, Россия;
[2]Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Республика Беларусь

Поступила 15.03.2017; принята в печать 05.04.2017.

Реферат **DOI: 10.17750/KMJ2017-503**

Цель. Изучить показатели ДНК-проточной цитометрии у больных раком яичников III–IV стадии, подвергнутых различным вариантам лечения.

Методы. Исследован операционный материал 93 пациенток с верифицированным раком яичников III–IV стадии. Больные были разделены на четыре группы в зависимости от варианта проведённого лечения: без неоадъювантной химиотерапии, с неоадъювантной химиотерапией, с неоадъювантной химиоиммунотерапией с различными методами введения интерферона гамма человеческого рекомбинантного (ингарона) — внутримышечным и внутрибрюшинным. Проанализировано содержание клеток, проведены определение плоидности и анализ клеточного цикла в свежем операционном материале.

Результаты. Выявлены различия при распределении клеток в зависимости от способа лечения. Продемонстрировано повышение темпов пролиферации, индекса пролиферации, преобладание анеуплоидных опухолей в группе без лекарственного воздействия на опухоль. Наибольшее количество диплоидных опухолей зарегистрировано в группе с неоадъювантной химиоиммунотерапией с внутрибрюшинным введением иммуномодулятора (83,4%), что свидетельствует о лучшем прогнозе течения заболевания. При воздействии неоадъювантной полихимиотерапии количество анеуплоидных клеток снижается до 38,4%, с применением химиоиммунотерапии с внутримышечным и внутрибрюшинным введением интерферона гамма человеческого рекомбинантного (ингарона) отмечается ещё большее снижение — до 27,2 и 16,6% соответственно.

Вывод. Включение в схему лечения интерферона гамма способствует снижению количества анеуплоидных опухолей, уменьшению доли анеуплоидных клеток в опухоли, снижению темпов пролиферации и индекса пролиферации, характеризующих агрессивность течения опухолевого процесса.

Ключевые слова: рак яичников, ДНК-цитометрия, плоидность, химиоиммунотерапия, интерферон гамма.

DNA-CYTOMETRIC PARAMETERS IN PATIENTS WITH OVARIAN CANCER

G.A. Nerodo[1], I.A. Novikova[1], A.Yu. Ardzha[1], V.P. Nikitina[1], I.A. Kosenko[2], O.E. Kravtsova[1], E.S. Bondarenko[1]
[1]Rostov Scientific Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia;
[2]N.N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Aim. To study DNA flow cytometry parameters in patients with stage III–IV ovarian cancer receiving different treatments.

Адрес для переписки: mordan-anna@yandex.ru