

*На правах рукописи*



**Четверяков Андрей Валерьевич**

**МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛЕВОЙ  
ИММУНОСУПРЕССИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ТОЛСТОЙ  
КИШКИ**

3.3.3. Патологическая физиология  
(медицинские науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Цепелев Виктор Львович**

**Официальные оппоненты:**

**Бойчук Сергей Васильевич** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Академии наук Республики Татарстан. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой общей патологии, г. Казань

**Шолохов Леонид Федорович** – доктор медицинских наук, профессор. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», заведующий лабораторией физиологии и патологии эндокринной системы, г. Иркутск

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск

Защита диссертации состоится «19» февраля 2024 г. в \_\_00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.077.01 при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, <https://chitgma.ru>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 202\_ г.

Учёный секретарь

диссертационного совета 21.2.077.01

д.м.н., доцент



Мироманова Наталья Анатольевна

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы исследования.** По данным Global Cancer Observatory (2020), колоректальный рак (КРР) занимает третье место в структуре заболеваемости онкологических больных. Прогноз для пациентов с КРР неблагоприятный, общая выживаемость составляет 25-30 месяцев (Siegel R.L., 2020). Для улучшения показателей выживаемости пациентов ведется изучение новых видов лечения, особенно иммунотерапии (Ghorbaninezhad F., 2022). Основным направлением в этой области исследований является блокирование иммунных контрольных точек (Al-Mterin M.A., 2022).

Иммунные контрольные точки (ИКТ) являются регуляторами иммунного ответа, предотвращающими развитие гиперреактивности иммунной системы и повреждение собственных тканевых структур (Cao W., 2021). Злокачественные клетки используют ИКТ для «ускользания» от иммунного надзора, что способствует росту и развитию опухоли (Guo X.J., 2021). Основными ко-ингибирующими ИКТ, посредством которых опухоль блокирует иммунный ответ, являются белки TIM-3, CTLA-4, LAG-3, PD-1. Роль ИКТ в канцерогенезе изучена при раке легкого, щитовидной железы, желудка, молочной железы и меланоме (Wu J. 2021; Li J. 2022). При раке толстой кишки данных о вкладе иммунных контрольных точек недостаточно, некоторые из них противоречивы. Следовательно, изучение вклада ИКТ в патогенез рака толстой кишки позволит разработать новые направления таргетной терапии, что улучшит прогноз для больных с КРР (Yin J., 2022).

**Степень разработанности темы исследования.** В 1987 году на поверхности Т-лимфоцитов Д. Эллисоном был обнаружен белок CTLA-4. Позже в 1992 году японский иммунолог Т. Хондзэ выявил еще один интегральный белок – PD-1. Обе молекулы угнетают активность Т-лимфоцитов и предотвращают развитие аутоиммунных процессов (Lopez S.H., 2022). В 1996 году Эллисон опубликовал фундаментальную работу об ИКТ при аутоиммунных заболеваниях, в которой описал функции и особенности этих молекул (Allison J.P., 1996). Установлено, что ИКТ (CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3), отвечающие за ко-ингибирование иммунного ответа, используются опухолевыми клетками для подавления Т-лимфоцитов, способствуя росту и развитию опухоли (Thornton A.M., 2019). В последние годы изучается роль ИКТ в канцерогенезе при различных локализациях опухолей. Разработаны моноклональные антитела, способные блокировать взаимодействие ИКТ со своим лигандом. Некоторые

моноклональные антитела, блокирующие CTLA-4 и PD-1, используют в таргетной терапии (Klapholz M., 2022). Получены положительные результаты применения моноклональных антител у пациентов с меланомой, раком лёгкого, раком молочной железы (Baleeiro R.B., 2022; Klapholz M., 2022; He Y., 2022). В тоже время, при раке толстой кишки данных о роли ИКТ в канцерогенезе недостаточно, часть из них противоречива (Chen F., 2022). Для предотвращения прогрессирования рака ведется активное изучение «искусственной» стимуляции адаптивного иммунного ответа при помощи ко-стимулирующих иммунных контрольных точек, таких как 4-1BB (Liao X., 2022). Кроме того, исследования последних лет указывают на роль TGF- $\beta$ 1 и CD25 в прогрессировании злокачественного новообразования, особенно в инвазии окружающих тканей и метастазировании (Liu D., 2022; Jou E., 2022). Таким образом, к настоящему времени роль иммунных контрольных точек в патогенезе рака толстой кишки изучена недостаточно и исследования в этом направлении являются перспективными.

**Цель исследования:** установить патогенетическое значение иммунных контрольных точек, растворимой формы CD25 и трансформирующего фактора роста- $\beta$ 1 в формировании опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки.

**Задачи исследования:**

1. Определить концентрацию ко-ингибирующих молекул (CTLA-4, TIM-3, PD-1, LAG-3) и их лигандов (B7-2, Galectin-9, PD-L1), ко-стимулирующей молекулы 4-1BB в ткани опухоли, а также установить наиболее патогенетически значимые молекулы в формировании опухолевой иммуносупрессии у больных со злокачественными новообразованиями толстой кишки.
2. Оценить уровень иммунных контрольных точек и их лигандов в сыворотке крови у пациентов с опухолями толстой кишки.
3. Определить уровень растворимой формы CD25 (sCD25) и трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) в ткани опухоли и сыворотке крови у пациентов с новообразованиями толстой кишки.
4. Выявить изменения количественного состава популяций Т-лимфоцитов в крови у больных раком толстой кишки и установить их зависимость от уровня иммунных контрольных точек, sCD25 и TGF- $\beta$ 1.
5. Исследовать количественный состав субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у больных с колоректальным раком и определить их взаимосвязь с уровнем иммунных контрольных точек, sCD25 и TGF- $\beta$ 1.

**Научная новизна.** В результате исследования выявлены новые механизмы опухолевой иммуносупрессии, в основе которых лежит увеличение концентрации белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9 в ткани опухоли и сыворотке крови у больных раком толстой кишки. Установлено, что высокий уровень белка LAG-3 в ткани опухоли и сыворотке крови является дополнительным фактором развития опухолевой иммуносупрессии у пациентов с колоректальным раком.

Установлено, что увеличение концентрации иммунных контрольных точек TIM-3 и LAG-3 в опухолевой ткани и сыворотке крови у больных раком толстой кишки сопровождается угнетением адаптивного иммунитета, что выражается в уменьшении количества Т-клеток (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) в крови.

Впервые показано, что основным патогенетическим механизмом действия молекул TIM-3 и LAG-3 при колоректальном раке является снижение количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов со следующими фенотипами: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Научная значимость полученных данных заключается в выявлении новых аспектов патогенеза опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки. Установлено, что высокая концентрация белков TIM-3 и LAG-3 в ткани опухоли и сыворотке крови сопровождается снижением адаптивного иммунитета.

Практическая значимость работы состоит в определении пороговых значений для белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9, а также молекулы sCD25 в сыворотке крови для ранней диагностики онкологической патологии толстой кишки. Установлены параметры для уровня белка CTLA-4 и его лиганда B7-2 в сыворотке крови, которые имеют значимость в скрининге онкологической патологии толстой кишки. На основании полученных данных разработана компьютерная программа для использования в клинической практике (Свидетельство о государственной регистрации программы ЭВМ №2022613721).

**Методология и методы исследования.** Дизайн работы представлен в виде одномоментного контролируемого открытого исследования пациентов с колоректальным раком, доброкачественной опухолью толстой кишки и контрольной группы. Методы настоящего исследования: метод опроса, методы инструментального обследования, биопсия опухолевого образования, гистологический метод определения типа опухоли, определение

уровня исследуемых молекул в сыворотке крови и ткани опухоли, изучение количественного состава Т-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии. Объект исследования – пациент с опухолью толстой кишки. Предмет исследования – оценка уровня иммунных контрольных точек в ткани опухоли и сыворотке крови у пациентов с новообразованиями толстой кишки; определение количественного состава Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций в крови; выявление корреляционных взаимосвязей между количеством Т-лимфоцитов и уровнем иммунных контрольных точек.

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

1. Центральным патогенетическим звеном формирования опухолевой иммуносупрессии при колоректальном раке является белок TIM-3 и его лиганд Galectin-9, а также ко-ингибирующая молекула LAG-3.
2. Увеличение концентрации иммунных контрольных точек (TIM-3 и LAG-3) в опухолевой ткани и сыворотке крови у больных раком толстой кишки сопровождается угнетением адаптивного иммунитета.
3. Основным патогенетическим механизмом действия молекул TIM-3 и LAG-3 при колоректальном раке является снижение количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов со следующими фенотипами:  $CD3^+CD8^+CD57^+$  и  $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD45R0^+CD62L^+CCR7^+$ .

**Степень достоверности и апробация диссертации.** Достоверность полученных результатов определяется достаточной выборкой исследуемых, количеством проведенных исследований и применением соответствующих методов статистической обработки и анализа.

Результаты исследования представлены на Форуме онкологов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 10-11 июня 2022 г.); V Юбилейном международном форуме онкологии и радиотерапии (Москва, 19-23 сентября 2022 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы патофизиологии» (Чита, 11 ноября 2022 г.); VII Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 21-23 декабря 2022 г.).

### **Внедрение результатов в практику**

Результаты работы внедрены в практическую работу поликлиники ГУЗ «Забайкальский краевой онкологический диспансер» (г. Чита).

Материалы диссертационной работы используются при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре патологической физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 10 представлены в научных изданиях, входящих в список, определенный ВАК Минобрнауки России, одна публикация входит в международную научную базу цитирования (Scopus Q4).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, главы обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 167 источников (18 отечественных и 149 иностранных), списка условных сокращений. Текст работы иллюстрирован 19 таблицами и 7 рисунками.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В исследование включены 94 человека, из которых 69 пациентов с новообразованиями толстой кишки, проходивших лечение в ГУЗ «Забайкальский краевой онкологический диспансер» и 25 больных контрольной группы, находившихся на лечении в ГУЗ «Краевая клиническая больница» г. Читы в период с 2019 по 2022 гг.

Основная группа включала 44 больных с колоректальным раком, в которой у 8 пациентов диагностирована I стадия процесса, у 22 – II, у 7 – III и у 7 – IV стадия рака. При гистологическом исследовании микропрепаратов в 39 случаях (88,6%) ткань опухоли была представлена умеренно дифференцированной аденокарциномой (G2), в 3 случаях (6,8%) – высокодифференцированной аденокарциномой (G1), в 2 случаях (4,6%) – низкодифференцированной аденокарциномой (G3).

Группа клинического сравнения сформирована из 25 пациентов с доброкачественными новообразованиями толстой кишки. При гистологическом исследовании микропрепаратов в 15 случаях ткань опухоли была представлена тубуловорсинчатой аденомой и в 10 случаях – гиперпластическим полипом.

Группу контроля составили 25 больных, поступивших в хирургическое отделение ГУЗ «Краевая клиническая больница» для оперативного вмешательства (пластика колостомы, сформированной ранее по поводу травмы толстой кишки; экстренное оперативное пособие по поводу травмы толстой кишки).

Исследование выполнено согласно требованиям комиссии по этике ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации

Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.). Исследование одобрено локальным этическим комитетом при ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России (протокол № 98 от 27.11.2019 г.).

Критерии включения в исследование: согласие пациента, наличие опухоли толстого кишечника, первичный статус заболевания.

Критерии исключения из исследования: больные, проходившие курс химиотерапевтического или лучевого лечения перед оперативным пособием; пациенты с положительным ВИЧ-статусом; аутоиммунными заболеваниями; вирусными и бактериальными инфекциями; хроническими воспалительными заболеваниями кишечника.

**Уровень ко-ингибирующих молекул и их лигандов (CTLA-4, B7-2, PD-1, PD-L1, TIM-3, Galectin-9, LAG-3), ко-стимулирующей молекулы (4-1BB), дифференцировочного антигена sCD25 и белка TGF- $\beta$ 1** определяли в сыворотке крови и супернатанте гомогената ткани опухоли с помощью метода проточной цитофлуориметрии на анализаторе CytoFlex LX (Beckman Coulter, США), используя набор для мультиплексного анализа LEGENDplex™ HU (Immune Checkpoint, США). Забор крови выполняли утром, за два часа до оперативного пособия. Биоптаты гомогенизировали при помощи гомогенизатора Ultra-Turrah T 10 basic (ИКА, Германия) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), далее центрифугировали при 5000 обр./мин в течение 10 минут и отбирали супернатант.

**Количественный состав T-лимфоцитов** определяли в крови методом проточной цитофлуориметрии на анализаторе CytoFlex LX с помощью панели антител Dura Clone IM T-Cell (CD45RA-FITC, CD197-PE, CD28-ECD, CD279-PC5.5, CD27-PC7, CD4-APC, CD8-Alexa-Fluor 700, CD3-APC-Alexa-Fluor 750, CD57-Pacific Blue, CD45-Krome Orange, Beckman Coulter, India).

**Статистическую обработку результатов** исследования осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (International Business Machines Corporation, США). Сравнение номинальных данных исследования проводили при помощи критерия  $\chi^2$  Пирсона. При минимальном значении ожидаемого явления менее 10,0 использовали  $\chi^2$  Йейтса на непрерывность. Нормальность распределения количественных признаков при численности исследуемых групп менее 50 человек оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Учитывая распределение признаков, отличное от нормального во всех исследуемых группах, полученные данные представляли в виде медианы первого и третьего квартилей: Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]. Ранговый анализ вариаций по

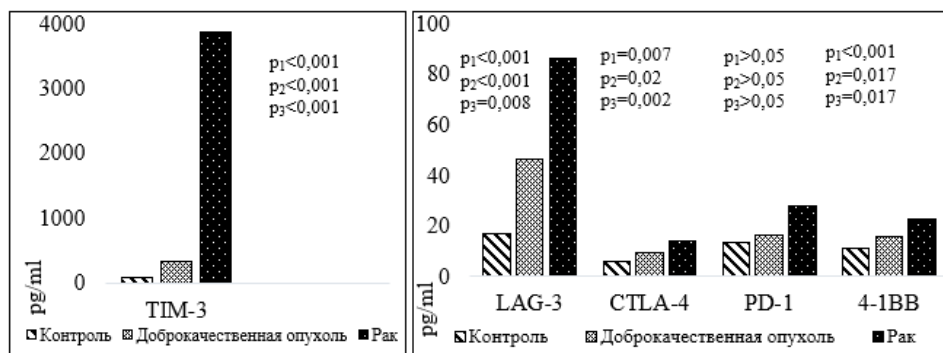


Краскелу-Уоллису (H) выполняли для сравнения трех независимых групп по одному количественному признаку. При наличии статистически значимых различий проводили попарное сравнение с помощью критерия Манна-Уитни с учетом поправки Бонферрони (U). Для определения корреляционных связей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент Спирмена. Значимыми считали отличия при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Уровень иммунных контрольных точек в ткани опухоли толстой кишки

Установлено, что у больных раком толстой кишки в ткани опухоли уровень ко-ингибирующих иммунных контрольных точек (TIM-3, CTLA-4, LAG-3) повышался относительно значений контрольной группы. Так, уровень белка TIM-3 увеличивался в 43,6 раза ( $p < 0,001$ ), CTLA-4 – в 2,3 раза ( $p = 0,007$ ), LAG-3 – в 5,1 раза ( $p < 0,001$ ), 4-1BB – в 2,06 раза ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 1).



Примечание:  $p_1$  – уровень значимости различий показателей больных раком и группы контроля;  $p_2$  – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группы контроля;  $p_3$  – уровень значимости различий показателей больных раком и доброкачественной опухолью.

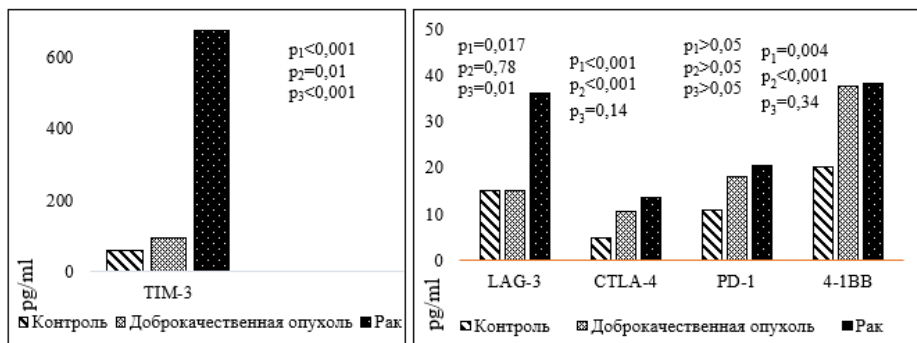
**Рисунок 1.** Концентрация иммунных контрольных точек в ткани опухоли толстой кишки

Кроме того, концентрация белка TIM-3 у пациентов с колоректальным раком превышала аналогичный показатель больных с доброкачественной опухолью толстой кишки в 11,4 раза ( $p < 0,001$ ), LAG-3 в 1,8 раза ( $p = 0,008$ ), белка CTLA-4 в 1,5 раза ( $p = 0,002$ ), 4-1BB в 1,43 раза ( $p = 0,017$ ). В то же

время статистически значимых различий в уровне PD-1 между группами пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями нами не выявлено ( $p > 0,05$ ).

### Уровень иммунных контрольных точек в сыворотке крови

Установлено, что у больных раком толстой кишки в крови уровень ко-ингибирующих иммунных контрольных точек превышал значения контрольной группы. Уровень белка TIM-3 увеличивался в 11,7 раза ( $p < 0,001$ ), CTLA-4 – в 2,77 раза ( $p < 0,001$ ), LAG-3 – в 2,42 раза ( $p = 0,017$ ), 4-1BB в 1,88 раза ( $p = 0,004$ ) (Рисунок 2).



Примечание:  $p_1$  – уровень значимости различий показателей больных раком и группы контроля;  $p_2$  – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группы контроля;  $p_3$  – уровень значимости различий показателей больных раком и доброкачественной опухолью.

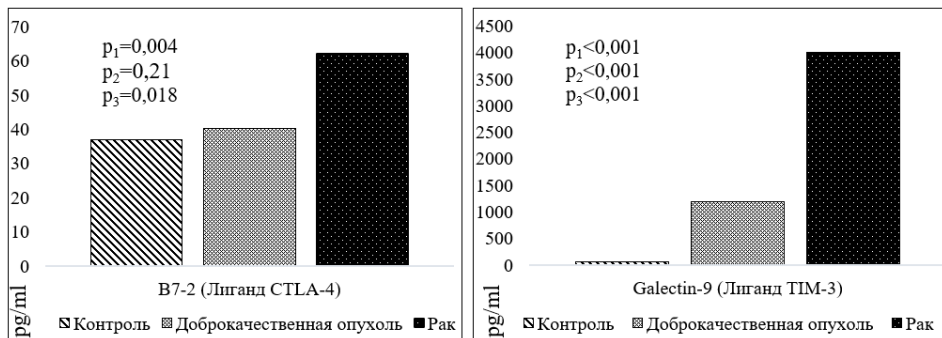
**Рисунок 2.** Концентрация иммунных контрольных точек в сыворотке крови у больных с опухолью толстой кишки

При этом концентрация TIM-3 у пациентов с колоректальным раком превышала аналогичный показатель больных при доброкачественном опухолевом процессе толстой кишки в 7,1 раза ( $p < 0,001$ ), LAG-3 в 2,42 ( $p = 0,01$ ) раза. В то же время уровни белка CTLA-4 и 4-1BB статистически не различались между данными группами, так же, как и концентрация PD-1 ( $p > 0,05$ ).

### Уровень лигандов иммунных контрольных точек в ткани опухоли толстой кишки

У больных со злокачественным новообразованием толстой кишки уровень лиганда TIM-3 (Galectin-9) превышал показатель группы контроля в 56,7 раза ( $p < 0,001$ ), а лиганда CTLA-4 (B7-2) – в 1,6 раза ( $p = 0,004$ ). Концентрация Galectin-9 у пациентов с КРП относительно группы больных

доброкачественной опухолью толстой кишки повышалась в 3,4 раза ( $p < 0,001$ ), лиганда В7-2 в 1,5 раза ( $p = 0,018$ ) (Рисунок 3). Статистически значимые различия по уровню лиганда PD-L1 в группах больных раком толстой кишки и доброкачественной опухолью не выявлены ( $p > 0,05$ ).

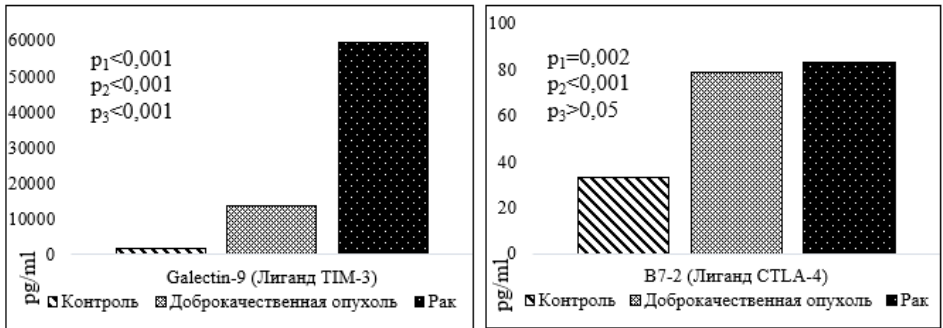


Примечание:  $p_1$  – уровень значимости различий показателей больных раком и группы контроля;  $p_2$  – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группы контроля;  $p_3$  – уровень значимости различий показателей больных раком и доброкачественной опухолью.

**Рисунок 3.** Уровень лигандов иммунных контрольных точек в ткани опухоли толстой кишки

### Концентрация лигандов иммунных контрольных точек в сыворотке крови

У больных со злокачественным новообразованием толстой кишки уровень лиганда TIM-3 (Galectin-9) превышал показатель группы контроля в 33,3 раза ( $p < 0,001$ ), а лиганда CTLA-4 (B7-2) – в 2,51 раза ( $p = 0,002$ ). Концентрация Galectin-9 у пациентов с КРР по отношению к группе больных доброкачественной опухолью толстой кишки увеличивалась в 4,4 раза ( $p < 0,001$ ), а уровень В7-2 не демонстрировал статистически значимых различий между группами (Рисунок 4). Аналогично этому уровень лиганда PD-L1 в группе больных раком толстой кишки и доброкачественной опухолью не показывал статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ).

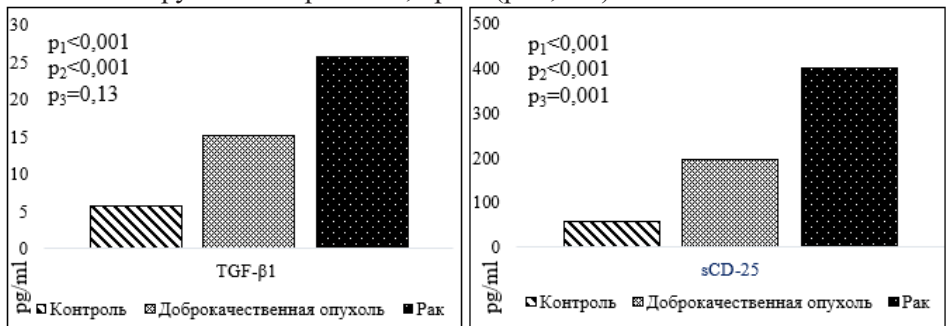


Примечание:  $p_1$  – уровень значимости различий показателей больных раком и группы контроля;  $p_2$  – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группы контроля;  $p_3$  – уровень значимости различий показателей больных раком и доброкачественной опухолью.

**Рисунок 4.** Концентрация лигандов иммунных контрольных точек в сыворотке крови у больных с опухолью толстой кишки

### Уровень растворимой формы sCD25 и трансформирующего фактора роста- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ ) в ткани опухоли толстой кишки

Концентрация sCD25 в опухолевой ткани больных колоректальным раком повышалась в 6,75 раза ( $p < 0,001$ ) относительно группы контроля и в 2,06 раза ( $p = 0,001$ ) по отношению к группе больных с доброкачественной опухолью толстого кишечника. У пациентов с доброкачественным новообразованием толстой кишки концентрация sCD25 превышала показатели группы контроля в 3,3 раза ( $p < 0,001$ ).



Примечание:  $p_1$  – уровень значимости различий показателей больных раком и группы контроля;  $p_2$  – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группы контроля;  $p_3$  – уровень значимости различий показателей больных раком и доброкачественной опухолью.

**Рисунок 5.** Уровень sCD25 и TGF-  $\beta 1$  в ткани опухоли толстой кишки

По отношению к группе контроля концентрация TGF- $\beta$ 1 в опухолевой ткани у больных раком толстой кишки увеличивалась в 5,91 раза ( $p < 0,001$ ), у пациентов с доброкачественной опухолью толстой кишки в 2,7 раза ( $p < 0,001$ ). При сравнении значений уровней TGF- $\beta$ 1 среди пациентов с КРР и доброкачественным новообразованием толстого кишечника, статистически значимых различий нами не выявлено ( $p = 0,13$ ) (Рисунок 5).

### **Уровень растворимой формы sCD25 и трансформирующего фактора роста- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) в сыворотке крови**

Установлено, что у больных раком толстой кишки в сыворотке крови уровень sCD25 увеличивался в 6,9 раза в сравнении с группой контроля ( $p < 0,001$ ). Концентрация sCD25 в сыворотке крови пациентов с КРР превышала данный показатель у больных с доброкачественными опухолями в 1,59 раза ( $p = 0,003$ ). Необходимо отметить, что уровень sCD25 у пациентов с доброкачественным новообразованием превышал значения группы контроля в 4,4 раза ( $p < 0,001$ ). Уровень TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови у пациентов раком толстой кишки снижался в 1,38 раза по сравнению с группой контроля ( $p = 0,003$ ). Концентрация TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови у больных раком толстой кишки уменьшалась по отношению к группе пациентов с доброкачественными новообразованиями толстого кишечника в 1,58 раза ( $p < 0,001$ ). Достоверных различий уровня TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови у больных с доброкачественной опухолью толстой кишки и контрольной группой не обнаружено ( $p = 0,55$ ).

### **Изменение количественного состава субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у пациентов с опухолью толстой кишки**

Установлено, что абсолютное количество Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) в крови у больных с колоректальным раком снижалось в 1,46 раза по сравнению с группой контроля и в 1,4 раза по отношению к пациентам с доброкачественной опухолью толстой кишки. Количество Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) у больных раком толстой кишки снижалось в 1,49 раза ( $p = 0,004$ ) по отношению к группе контроля. При сравнении полученных значений у больных с доброкачественной опухолью и группы контроля ( $p = 0,14$ ), а также пациентами с КРР ( $p = 0,16$ ) статистически значимых различий не установлено.

Количество цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) в крови у больных с колоректальным раком уменьшалось в 1,85 раза ( $p < 0,001$ ) по отношению к группе контроля и в 1,72 раза ( $p = 0,003$ ) в сравнении с доброкачественной опухолью. Показатели группы контроля и больных с

доброкачественной опухолью статистически значимых различий не имели ( $p=0,29$ ).

На следующем этапе нами проведён корреляционный анализ количества популяций Т-лимфоцитов в крови и изученными показателями (ИКТ, sCD25, TGF- $\beta$ 1) в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком.

В результате данного анализа удалось установить, что количество Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ) в крови у пациентов с КРР не имело корреляционных связей с уровнем ИКТ в ткани опухоли. Количество цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8^+$ ) в крови у пациентов с колоректальным раком демонстрировало сильную обратную корреляционную связь с концентрацией белка TIM-3 и LAG-3 в ткани опухоли у больных со злокачественным новообразованием толстой кишки (Таблица 1).

**Таблица 1**

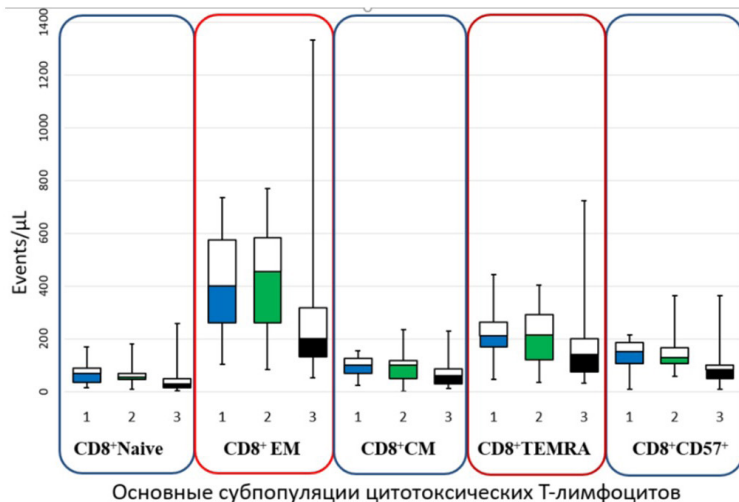
Корреляционная связь количества популяций Т-лимфоцитов в крови и уровнем иммунных контрольных точек, sCD25 и TGF- $\beta$ 1 в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком

Исследуемая молекула в ткани опухоли	Популяции Т-лимфоцитов		
	$CD3^+CD4^+$		$CD3^+CD8^+$
TIM-3	0,203 ( $p=0,18$ )		-0,842 ( $p<0,001$ )
LAG-3	0,031 ( $p=0,84$ )		-0,804 ( $p<0,001$ )
CTLA-4	0,175 ( $p=0,255$ )		-0,531 ( $p<0,001$ )
sCD25	-0,12 ( $p=0,439$ )		0,128 ( $p=0,408$ )
TGF- $\beta$ 1	-0,208 ( $p=0,175$ )		-0,258 ( $p=0,091$ )
Сила связи, $\rho$	Сильная связь	Средняя связь	Слабая связь
	от 1 до 0,7	от 0,69 до 0,3	от 0,29 до 0

Учитывая характер выявленных корреляционных связей и ведущую роль цитотоксических Т-лимфоцитов в киллинге злокачественных клеток, в дальнейшем нами изучены субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8^+$ ), а также их корреляционные связи с концентрацией ИКТ в ткани опухоли.

В результате удалось установить, что у пациентов с КРР снижалось количество основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с контролем:  $CD8^+Naive$  клеток – в 2,41 раза ( $p<0,001$ ),  $CD8^+EM$  лимфоцитов – в 2,01 раза ( $p<0,001$ ),  $CD8^+CM$  – в 1,70 раза ( $p=0,001$ ),  $CD8^+TEMRA$  лимфоцитов – в 1,52 раза ( $p=0,003$ ),  $CD8^+CD57^+$  клеток – в 1,82 раза ( $p<0,001$ ). Кроме того, отмечалось уменьшение

количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов с колоректальным раком по сравнению с больными доброкачественной опухолью: CD8<sup>+</sup>Naïve клеток – в 1,86 раза (p<0,001), CD8<sup>+</sup>EM – в 2,27 раза (p<0,001), CD8<sup>+</sup>CM – в 1,71 раза (p=0,006), CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> лимфоцитов – в 1,54 раза (p<0,001). В отношении CD8<sup>+</sup>TEMRA статистически значимых различий между группами не выявлено (p=0,27) (Рисунок 6).



Примечание: 1 – контрольная группа; 2 – пациенты с доброкачественной опухолью; 3 – больные раком толстой кишки.

**Рисунок 6.** Основные субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у пациентов с новообразованиями толстой кишки

Количество субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) в крови у пациентов с колоректальным раком показывало сильную обратную корреляционную связь с концентрацией молекул TIM-3 и LAG-3 в ткани опухоли у больных со злокачественным новообразованием толстой кишки (Таблица 2).

Известно, что популяция Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>) продуцирует молекулы перфорины и гранзимы, которые участвуют в контактном цитолизе опухолевых клеток. Цитотоксические Т-лимфоциты центральной памяти (CD8<sup>+</sup>CM) определяют миграционную способность Т-лимфоцитов в лимфоидные органы. Учитывая характер выявленных связей, мы полагаем, что белки TIM-3 и LAG-3 вносят вклад в развитие опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки.

**Таблица 2**

Корреляционная связь количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов и уровня иммунных контрольных точек, sCD25 и TGF-β1 в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком

Исследуемая молекула в ткани	Основные субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов			
	CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (Naive)	CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup> (EM)	CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup> (CM)	CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>
TIM-3	0,186 p=0,227	0,091 p=0,561	-0,801 p<0,001	-0,781 p<0,001
LAG-3	0,536 p<0,001	0,219 p=0,153	-0,757 p<0,001	-0,776 p<0,001
sCD25	0,114 p=0,46	0,181 p=0,24	0,086 p=0,58	0,013 p=0,93
TGF-β1	-0,209 p=0,17	-0,169 p=0,27	-0,289 p=0,057	0,094 p=0,543
Сила связи, ρ	<b>Сильная связь</b>	<b>Средняя связь</b>		<b>Слабая связь</b>
	от 1 до 0,7	от 0,69 до 0,3		от 0,29 до 0

На основании результатов нашего исследования разработана интегральная схема патогенеза опухолевой иммуносупрессии при колоректальном раке (Рисунок 7).

При повреждении или изменении активности гена, ответственного за деление клеток, происходит процесс трансформации нормальной клетки эпителия толстой кишки в злокачественную, что приводит к активации врожденного и адаптивного иммунного ответа. Стимуляция иммунитета сопровождается увеличением выработки ИКТ (LAG-3, TIM-3 и его лиганда Galectin-9) (Четверяков А.В., Цепелев В.Л., 2023). Увеличение концентрации вышеуказанных иммунных контрольных точек в опухолевой ткани и сыворотке крови у больных раком толстой кишки сопровождается угнетением адаптивного иммунитета и выражается в снижении количества цитотоксических Т-лимфоцитов (Четверяков А.В., Цепелев В.Л., 2023). Основным патогенетическим механизмом действия молекул TIM-3 и LAG-3 при колоректальном раке является снижение количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов с фенотипом CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, продуцирующих гранзимы и перфорины, которые уничтожают опухолевые клетки путем контактного цитолиза. Кроме того, высокий уровень белков TIM-3 и LAG-3 в опухолевой ткани и сыворотке крови приводит к уменьшению количества



цитотоксических Т-лимфоцитов центральной памяти, экспрессирующих адгезионную молекулу CD62L и хемокиновый рецептор CCR7, которые определяют миграционную способность Т-клеток в лимфоидные органы. Вышеописанные патогенетические механизмы приводят к развитию опухолевой иммуносупрессии и прогрессированию опухоли.



**Рисунок 7.** Роль иммунных контрольных точек в развитии опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки

## ВЫВОДЫ

1. В ткани опухоли у больных раком толстой кишки увеличивается концентрация ко-ингибирующих молекул (CTLA-4, TIM-3, LAG-3) и их лигандов (B7-2, Galectin-9). Наибольший вклад в формирование опухолевой иммуносупрессии при колоректальном раке вносит белок TIM-3 и его лиганд Galectin-9. У больных колоректальным раком в сравнении с доброкачественными новообразованиями в опухолевой ткани возрастает уровень TIM-3 в 11,4 раза, Galectin-9 – в 3,4 раза, B7-2 – в 1,5 и LAG-3 – в 1,8 раза. Увеличение концентрации CTLA-4 в ткани опухоли при доброкачественных и злокачественных новообразованиях толстого кишечника носит неспецифический характер и не зависит от вида опухоли. При колоректальном раке в опухолевой ткани возрастает концентрация ко-стимулирующей молекулы 4-1BB в 2,1 раза в сравнении с контролем и в 1,4 раза – по отношению к доброкачественным опухолям.

2. Уровень растворимой формы ко-ингибирующих молекул (CTLA-4, TIM-3, LAG-3) и их лигандов (B7-2, Galectin-9), ко-стимулирующей молекулы (4-1BB) в сыворотке крови у пациентов с опухолями толстой кишки превышает значения контрольной группы, за исключением LAG-3 у пациентов с доброкачественной опухолью толстой кишки. У больных с колоректальным раком по отношению к доброкачественным новообразованиям в сыворотке крови возрастает уровень растворимых форм TIM-3 в 7,3 раза, Galectin-9 – в 4,4 и LAG-3 – в 2,4 раза. Увеличение концентрации CTLA-4 и его лиганда B7-2, а также ко-стимулирующей молекулы 4-1BB в сыворотке крови при доброкачественных и злокачественных новообразованиях толстого кишечника не зависит от характера роста опухоли. Уровень растворимой формы CTLA-4 в сыворотке крови имеет прямую среднюю корреляционную связь с концентрацией данного белка в опухолевой ткани. Концентрация TIM-3 в сыворотке крови имеет прямую сильную корреляционную связь с уровнем данной молекулы в ткани новообразования.

3. Концентрация растворимой формы субъединицы  $\alpha$ -рецептора интерлейкина-2 (CD25) в ткани опухоли у больных с колоректальным раком превышает показатели группы контроля в 6,7 раза, больных с доброкачественной опухолью толстой кишки – в 2,1 раза. Выявлена высокая концентрация трансформирующего фактора роста- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) в ткани опухоли как при злокачественных, так и при доброкачественных новообразованиях.

4. В крови у больных раком толстой кишки уменьшается количество Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) в 1,4 раза в сравнении с группой контроля, Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) – в 1,4 раза, цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) – в 1,85 раза. Выявлена сильная обратная корреляционная связь количества цитотоксических Т-лимфоцитов в крови с концентрацией TIM-3 и LAG-3 в ткани опухоли у больных с колоректальным раком.

5. У больных раком толстой кишки снижается количество субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с контролем: CD8<sup>+</sup>Naive – в 2,4 раза, CD8<sup>+</sup>EM – в 2 раза, CD8<sup>+</sup>CM – в 1,7 раза, CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> клеток – в 1,8 раза. Установлена сильная обратная корреляционная связь между высоким уровнем ко-ингибирующих иммунных контрольных точек (TIM-3 и LAG-3) в опухолевой ткани и низким количеством субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>), продуцирующих гранзимы и перфорины; а также сильная обратная связь с количеством цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>CM), экспрессирующих адгезивную молекулу CD62L и хемокиновый рецептор CCR7, которые определяют миграционную способность иммунных клеток.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Публикации в научных рецензируемых журналах, определённых ВАК Минобрнауки России**

1. Четверяков А.В. Роль мембранного белка Т-лимфоцитов CTLA-4 в регуляции иммунитета и иммунотерапии опухолей / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев // Забайкальский медицинский вестник: электронное научное издание. – 2020. – № 4. – С. 206–214. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-4-za-2020-god/rol-membrannogo-belka-t-limfocitovctla-4v-reguljacji-immuniteta-iimmunoterapii-opuholej> (дата обращения: 17.10.2023).

2. Четверяков А.В. Уровень белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9 у больных колоректальным раком / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.25557/0031-2991.2022.02.52-58 // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2022. – Т. 66, № 2. – С. 52–58.

3. Четверяков А.В. Уровень растворимой формы CD25 у пациентов с колоректальным раком / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.25557/2310-0435.2022.02.64-69 // Патогенез. – 2022. – Т. 20, № 2. – С. 64–69.

4. Четверяков А.В. Активность сигнального пути 4-1BB/4-1BBL у пациентов с опухолями толстой кишки / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.29296/24999490-2022-04-10 // Молекулярная медицина. – 2022. – Т.

20, № 4. – С. 60–63.

5. Четверяков А.В. Патогенетическое значение трансформирующего фактора роста- $\beta 1$  у больных колоректальным раком / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.23946/2500-0764-2022-7-3-17-22 // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2022. – Т. 7, № 3. – С. 17–22.

6. Четверяков А.В. Концентрация ко-ингибирующих иммунных контрольных точек и их лигандов в крови у пациентов с опухолью толстой кишки / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.25557/0031-2991.2023.01.56-62 // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2023. – Т. 67, № 1. – С. 56–62.

7. Четверяков А.В. Уровень коингибирующих иммунных контрольных точек в ткани опухоли у пациентов с новообразованиями толстой кишки / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.29296/24999490-2023-01-08 // Молекулярная медицина. – 2023. – Т. 21, № 1. – С. 56–60.

8. Четверяков А.В. Патогенетическая роль LAG-3 у пациентов с колоректальным раком / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.56871/RBR.2023.82.53.002 // Российские биомедицинские исследования. – 2023. – Т. 8, № 2. – С. 12–17.

9. Количественный состав субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов с опухолью толстой кишки / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев, П.П. Терешков, В.В. Крюкова. – DOI 10.17513/spno.32682 // Современные проблемы науки и образования: сетевое издание. – 2023. – № 3. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32682> (дата обращения: 17.10.2023).

10. Четверяков А.В. Прогностическое значение уровня белка CTLA-4 и его лиганда В7.2 у больных раком толстого кишечника / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.20538/1682-0363-2023-2-104-110 // Бюллетень сибирской медицины. – 2023. – Т. 22, № 2. – С. 104–110 (**Scopus Q4**).

#### **Публикации в прочих изданиях:**

11. Четверяков А.В. Уровень белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9 у больных колоректальным раком / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев // Ради жизни: V Юбилейный международный форум онкологии и радиотерапии: сборник тезисов, г. Москва, 19-23 сентября 2022 г. – Москва, 2022. – С. 66.

12. Четверяков А.В. Патогенетическое значение белка CTLA-4 и его лиганда В7-2 у больных с опухолями толстого кишечника / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев // Актуальные проблемы патофизиологии: международная научно-практическая конференция: сборник научных статей, г. Чита, 11 ноября 2022 г. / под редакцией Н.В. Ларевой. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2022. – С.

170–173. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана. – ISBN 978-5-904934-49-1.

13. Четверяков А.В. Значение белка LAG-3 в патогенезе колоректального рака / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев // Актуальные проблемы патофизиологии: международная научно-практическая конференция: сборник научных статей, г. Чита, 11 ноября 2022 г. / под редакцией Н.В. Ларевой. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2022. – С. 167–169. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана. – ISBN 978-5-904934-49-1.

14. Четверяков А.В. Значение ингибирующей молекулы CTLA-4 и ее лиганда В7-2 в патогенезе и диагностике колоректального рака / А.В. Четверяков // Злокачественные опухоли. – 2022. – Т. 12, № 3s1. – С. 121 (материалы XXVI Российского онкологического конгресса, г. Москва, 15-17 ноября 2022 г.).

15. Четверяков А.В. Диагностическая значимость белка CTLA-4 при колоректальном раке / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Т. 9, № 4 (приложение). – С. 80 (материалы VII Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, г. Москва, 21-23 декабря 2022 г.).

#### **Свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ:**

16. Свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2022613721 Российская Федерация. Программа для определения вероятности онкологической патологии толстого кишечника / Четверяков А.В., Цепелев В.Л., Крюкова В.В., Мудров В.А.; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2022612663; дата поступления 25 февраля 2022; дата государственной регистрации в реестре программ для ЭВМ 15.03.2022. – 1 с.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИКТ	– иммунные контрольные точки
KPP	– колоректальный рак
4-1BB	– белок суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли-9
B7-2	– лиганд CTLA-4
CD	– кластер дифференцировки
CD25	– субъединица альфа рецептора интерлейкина-2
CD8 <sup>+</sup> CM	– цитотоксические Т-лимфоциты центральной памяти
CD8 <sup>+</sup> EM	– цитотоксические Т-лимфоциты эффекторной памяти
CD8 <sup>+</sup> Naive	– наивные цитотоксические Т-лимфоциты
CD8 <sup>+</sup> TEMRA	– цитотоксические Т-лимфоциты терминально-дифференцированной памяти
CTLA-4	– цитотоксический Т-лимфоцитарно-ассоциированный белок-4
Galectin-9	– лиганд к TIM-3
LAG-3	– ген активации лимфоцитов-3
PD-1	– белок запрограммированной клеточной гибели
PD-L1	– лиганд к PD-1
TGF- $\beta$ 1	– трансформирующий фактор роста- $\beta$ 1
TIM-3	– белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина
Treg	– регуляторные Т-лимфоциты

Подписано в печать 28.11.2023. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman  
Формат 60x84 1/16. Авт. л. 1,0 Тираж 100. Заказ № 114/2023.

Отпечатано в редакционно-издательском центре ЧГМА  
672000, Чита, ул. Горького, 39а.