

УДК 575.113.5:575.117.2

# Комплексный анализ стромальных и сывороточных маркеров при раке желудка

О. В. Ковалева<sup>1\*</sup>, П. А. Подлесная<sup>1</sup>, В. Л. Чанг<sup>2</sup>, Н. А. Огнерубов<sup>2</sup>, А. Н. Грачев<sup>1</sup>,  
Н. А. Козлов<sup>1</sup>, И. С. Стилиди<sup>1</sup>, Н. Е. Кушлинский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина  
Минздрава России, 115552, Москва, Россия

<sup>2</sup>Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина Министерства образования  
и науки, 392000, Тамбов, Россия

\*E-mail: ovkovaleva@gmail.com

Поступила в редакцию 14.06.2022

Принята к печати 20.10.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11753

**РЕФЕРАТ** Комплексный анализ фенотипа клеток воспалительного инфильтрата опухолевой стромы является перспективным направлением молекулярной онкологии. Также крайне актуальным представляется изучение не только мембраносвязанных форм различных молекул, связанных с иммунной регуляцией, но и их растворимых форм. Проведен комплексный анализ тканевых и циркулирующих форм белков PD-1 и PD-L1, а также макрофагов и В-клеток стромы злокачественных опухолей желудка для оценки их клинической и прогностической значимости. Проведен иммуноферментный и иммуногистохимический анализ 63 образцов опухолей и плазмы крови от больных раком желудка. Показано, что злокачественные опухоли желудка сильно инфильтрированы В-клетками, количество которых сравнимо с содержанием макрофагов. Обнаружена ассоциация экспрессии PU.1 с размером опухоли, а именно, опухоли большего размера содержат меньше PU.1+ инфильтрирующих клеток ( $p = 0.005$ ). Не выявлено клинической значимости CD20+ и CD163+ клеток, однако их количество в строме было больше на более ранних стадиях заболевания и при отсутствии метастазов. Показано также, что содержание PD-L1 в опухолевых клетках не ассоциировано с клиническими и морфологическими характеристиками рака желудка, в то время как экспрессия PD-L1 в стромальных клетках опухоли ассоциирована с наличием отдаленных метастазов. Анализ прогностической значимости исследованных маркеров показал, что CD163 статистически значимо ассоциирован с неблагоприятным прогнозом данного заболевания ( $p = 0.019$ ). Отмечена также тенденция к благоприятному прогнозу в случае экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках ( $p = 0.122$ ). Полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности изучения растворимых и тканевых маркеров опухолевой стромы для прогнозирования течения рака желудка. Актуальным представляется поиск комбинаций маркеров, комплексный анализ которых поможет персонализировать современную противоопухолевую терапию.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** рак желудка, PD-1, PD-L1, строма, прогноз.

## ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) – одно из наиболее распространенных видов онкологических заболеваний во всем мире и одна из основных причин смертности от онкологических заболеваний. Заболеваемость РЖ у мужчин выше, чем у женщин [1]. К возникновению РЖ приводит большое количество различных факторов, включая инфекцию *Helicobacter pylori* [2], курение [3], особенности питания [2], генетические нарушения [4] и другие факторы.

Несмотря на известность большинства этиологических факторов возникновения РЖ, раннюю диагностику этого заболевания затрудняет его бессимптомное развитие, что часто приводит к выявлению данной патологии уже на поздних стадиях. При распространенном РЖ применяют стандартные комбинированные схемы терапии, включающие фторпиримидин и препараты платины (а также трастузумаб в случае HER2-положительных опухолей), в качестве препаратов первой линии и паклитаксел

с рамудирумабом или без него в качестве второй линии. Однако медиана выживаемости при распространенном РЖ все еще составляет примерно 12–15 месяцев, поэтому, безусловно, требуется внедрение новых методов лечения [5–7]. В последнее время новым стандартным методом лечения нескольких злокачественных опухолей, включая распространенный РЖ, стали ингибиторы иммунных контрольных точек (ИКИ). Однако успехи иммунотерапии РЖ не очень велики. Проводится большое количество клинических исследований, в которых для достижения максимального эффекта используют различные комбинации иммуно- и химиотерапевтических препаратов. Спорным остается вопрос, влияет ли количество PD-L1+ опухолевых клеток на эффективность терапии и нужно ли учитывать их количество при назначении соответствующего лечения. Кроме того, на успех терапии может повлиять качественный и количественный состав микроокружения опухоли. Например, повышенное количество Th1-клеток способствует воспалению и развитию РЖ [8], а содержание В-клеток, экспрессирующих IL-10, влияет на продукцию цитокинов CD4+ и CD8+ Т-клетками [9].

К основным типам клеток иммунного инфильтрата опухоли относятся макрофаги и Т-клетки, а также В-клетки. Известно, что количество и состав клеток опухолевого микроокружения могут быть как прогностическим фактором течения заболевания, так и маркером ответа на проводимую терапию. Транскрипционный фактор PU.1, играющий важную роль в гемопоэзе, экспрессируется на высоком уровне в макрофагах. Ранее мы показали, что PU.1 можно использовать в качестве маркера макрофагов в строме различных типов солидных опухолей [10]. CD3 является поверхностным маркером зрелых Т-клеток и используется для оценки их содержания в различных типах тканей. Трансмембранный белок CD20 экспрессируется на поверхности В-клеток-предшественников и зрелых В-клеток, что позволяет использовать его в различных клинических исследованиях в качестве общего В-клеточного маркера.

В нашей работе проведен комплексный анализ экспрессии PD-L1 в опухолевых и стромальных клетках РЖ, а также определено содержание растворимой формы PD-L1 в плазме крови пациентов. Проанализировано также содержание макрофагов и ассоциированных с опухолью В-клеток в строме опухолей РЖ.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование включены 63 первичных больных РЖ с различными стадиями опухолевого

процесса, прошедших обследование и лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина, а также 60 здоровых доноров. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием больных и здоровых доноров, соответствуют стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам. От каждого из включенных в исследование участника получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз «рак желудка» у всех пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей пищеварительной системы (ВОЗ, 2019). Описание выборки представлено в *табл. 1*.

Концентрацию белков sPD-L1 и sPD-1 определяли в плазме крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, с помощью наборов реактивов для иммунофер-

**Таблица 1.** Клинико-морфологические характеристики больных раком желудка

Характеристика	Число случаев, %
Возраст	
≤61	32 (51)
>61	31 (49)
Пол	
Мужской	35 (56)
Женский	28 (44)
Гистология	
Аденокарцинома	52 (82.5)
Перстневидноклеточный рак	10 (16)
Недифференцированный рак	1 (1.5)
Стадия	
I–II	25 (40)
III–IV	38 (60)
Локализация	
Дистальный отдел	14 (22)
КЭР (кардиоэзофагеальный рак)	3 (5)
Проксимальный отдел	16 (25)
Тело желудка	26 (42)
Тотальное поражение	4 (6)
Размер опухоли (T)	
T1–T2	13 (21)
T3–T4	50 (79)
Наличие регионарных метастазов (N)	
N0	24 (38)
N+	39 (62)
Наличие отдаленных метастазов (M)	
M0	54 (86)
M+	9 (14)
Степень дифференцировки (G)	
G1–G2	19 (30)
G3	44 (70)

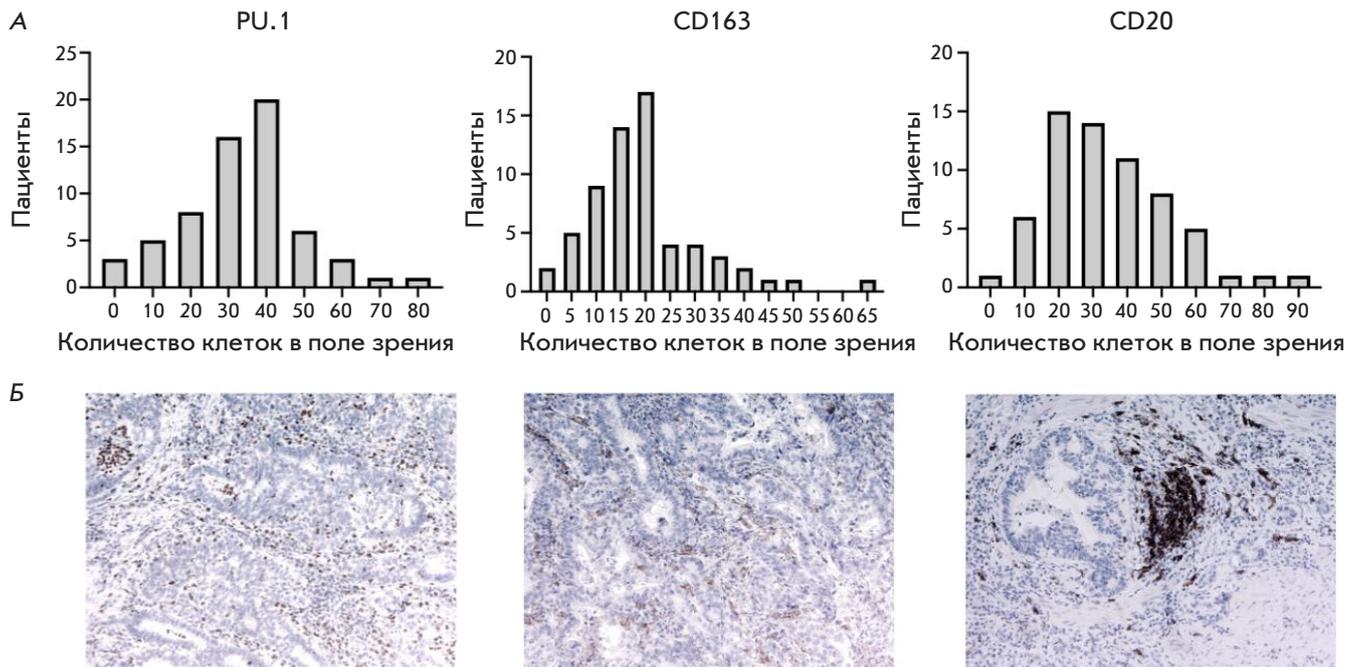


Рис. 1. Распределение PU.1+, CD163+ и CD20+ клеток в строме опухолей больных РЖ (А) и пример иммуногистохимического окрашивания опухолей желудка с использованием антител к PU.1, CD163 и CD20 ( $\times 100$ ) (Б)

ментного анализа: Human PD-L1 Platinum ELISA, Human PD-1 ELISA kit (Affimetrix, eBioscience, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг) на 1 мл плазмы крови.

Имуногистохимическое (ИГХ) исследование CD163, PU.1 и CD20 выполнено по стандартной методике на срезах опухолевой ткани. Для демаскировки антигена использовали Трис-EDTA-буфер pH 9.0 («ПраймБиоМед», Россия). Первичные антитела к PU.1 (4G6; «ПраймБиоМед», разведение 1 : 200), CD163 (10D6; BIOCARE, США, разведение 1 : 100) и CD20 (клон PBM-12F1; «ПраймБиоМед», разведение 1 : 100) инкубировали в течение 30 мин. Использовали систему детекции PrimeVision Ms/Rb HRP/DAВ (78-310004, «ПраймБиоМед») согласно инструкциям производителя.

Полученные препараты анализировали с помощью микроскопа OLYMPUS BX53, камеры Lumenera INFINITY2-2С и программного обеспечения Infinity analyze. Оценивали экспрессию CD163, PU.1 и CD20 в строме опухоли. В каждом случае количество CD163, PU.1 и CD20 положительных клеток подсчитывали при увеличении  $\times 200$  в пяти независимых полях зрения. Образец считали положительным при наличии хотя бы одной специфически

окрашенной клетки. Содержание CD163, PU.1 и CD20 в строме опухоли выражали как среднее значение количества клеток в поле зрения.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prizm 9.0. Для сравнения показателей и анализа их взаимосвязей использовали непараметрический критерий Манна–Уитни и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для анализа общей выживаемости больных разделили на две группы сравнения в зависимости от медианы содержания исследуемых белков. Общую выживаемость анализировали путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера. Статистическую значимость различий оценивали с использованием логарифмического рангового критерия. Потенциальное влияние различных факторов риска на выживаемость оценивали с помощью многофакторного анализа с использованием непараметрической модели пропорциональных рисков Кокса. Различия и корреляции считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессию PU.1, CD163 и CD20 выявили в 100% исследованных образцов РЖ. Распределение клеток, содержащих PU.1, CD163 и CD20, в образцах РЖ представлено на рис. 1.

Анализ результатов исследования показал, что медиана содержания PU.1+ клеток в образ-

Таблица 2. Ассоциация PU.1+, CD163+ и CD20+ клеток в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

Характеристика	PU.1 (число клеток)		CD163 (число клеток)		CD20 (число клеток)	
	Медиана (25–75%)	<i>p</i>	Медиана (25–75%)	<i>p</i>	Медиана (25–75%)	<i>p</i>
Возраст						
≤61	35.8 (23.4–42.7)	0.488	17.2 (9.05–22.3)	0.297	28.2 (19.4–45.4)	0.418
>61	34.2 (20.2–42.0)		18.2 (13.2–25.2)		34.4 (20.8–45.2)	
Пол						
Мужской	33.6 (20.2–37.6)	0.150	16.2 (10.4–24.4)	0.713	29.4 (18.8–45.2)	0.403
Женский	37.3 (26.9–44.2)		18.0 (12.9–21.1)		33.9 (22.9–44.9)	
Гистология						
Аденокарцинома	35.0 (20.8–41.9)	0.216	17.6 (11.8–24.1)	0.459	33.3 (19.9–44.8)	0.574
Перстневидноклеточный рак	29.7 (23.3–37.7)		17.5 (10.8–19.7)		30.5 (22.1–47.8)	
Недифференцированный рак	63.4 (63.4–63.4)		28.2 (28.2–28.2)		19.6 (19.6–19.6)	
Стадия						
I–II	35.8 (27.5–44.8)	0.249	17.8 (13.7–20.7)	0.623	34.4 (21.6–46.3)	0.424
III–IV	33.8 (18.0–39.5)		16.7 (10.1–24.6)		29.4 (19.5–43.9)	
Локализация						
Дистальный отдел КЭР	34.8 (28.9–44.1)	0.226	17.5 (12.4–23.4)	0.824	33.8 (24.7–43.1)	0.316
Проксимальный отдел	35.8 (0.4–41.8)		19.4 (14.8–25.2)		23.4 (6.0–24.6)	
Тело желудка	33.6 (12.5–41.2)		17.3 (11.8–24.1)		28.8 (13.3–52.4)	
Тотальное поражение	33.4 (24.4–39.8)		18.1 (11.6–23.6)		37.7 (22.3–47.3)	
Размер опухоли (T)						
T1–T2	41.8 (35.5–54.4)	0.005*	17.8 (14.5–23.0)	0.504	36.0 (26.1–48.1)	0.277
T3–T4	32.9 (19.1–38.7)		17.6 (10.1–23.4)		29.4 (19.5–43.9)	
Наличие регионарных метастазов (N)						
N0	35.5 (25.3–42.8)	0.733	17.3 (12.9–20.0)	0.437	33.3 (19.9–44.4)	0.947
N+	34.8 (20.2–41.4)		17.8 (11.4–28.2)		29.4 (20.6–45.2)	
Наличие отдаленных метастазов (M)						
M0	34.8 (25.6–41.9)	0.889	17.6 (11.2–23.4)	0.598	33.3 (21.1–45.3)	0.214
M+	35.4 (13.6–48.6)		18.4 (12.8–25.4)		29.4 (10.6–40.2)	
Степень дифференцировки (G)						
G1–G2	37.6 (25.0–49.8)	0.131	19.0 (13.2–25.8)	0.448	33.2 (22.0–43.6)	0.796
G3–G4	34.2 (18.7–38.9)		16.2 (10.9–21.5)		33.4 (18.6–45.4)	

\*Статистически значимо.

це составила 34.8 (0.4–77.8) клеток в поле зрения, CD163+ клеток – 17.6 (0.8–66.4), CD20+ клеток – 32.2 (3.2–91.2). Следует отметить, что в опухолях желудка В-клетки представлены в таком же количестве, как и PU.1+ макрофаги.

### Связь количества PU.1+, CD163+ и CD20+ клеток с клинико-морфологическими характеристиками РЖ

На следующем этапе работы сопоставили содержание PU.1+, CD20+ и CD163+ клеток в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания (табл. 2).

Проведенный анализ показал, что содержание PU.1 значительно ассоциировано с размером опухоли, и именно опухоли большего размера содержат меньше PU.1+ инфильтрирующих клеток. Также следует отметить различия в содержании PU.1+ и CD163+ клеток в зависимости от локализации опухоли. Так, наибольшее количество PU.1+ клеток

и наименьшее количество CD163+ клеток выявлено при тотальном поражении желудка, однако эти наблюдения не достигали статистической значимости.

### Содержание PD-1 и PD-L1 в образцах опухоли больных РЖ

Помимо анализа экспрессии стромальных маркеров, оценили тканевое содержание PD-L1 в образцах РЖ. Примеры иммуногистохимического окрашивания на PD-L1 представлены на рис. 2.

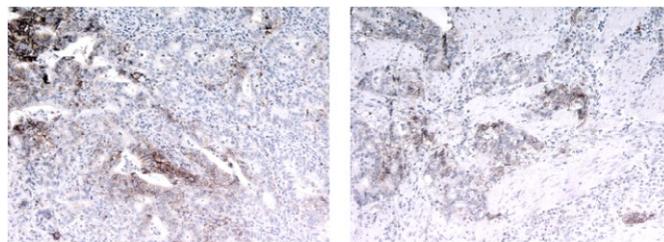


Рис. 2. Экспрессия PD-L1 в образцах РЖ (×100)

Таблица 3. Ассоциация содержания PD-L1 в опухолевых клетках и в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

Характеристика	PD-L1, опухоль (n)			PD-L1, строма (n)		
	+	-	p	+	-	p
Возраст						
≤61	8	24	0.117	18	14	0.609
>61	14	17		20	11	
Пол						
Мужской	12	23	>0.999	18	17	0.127
Женский	10	18		20	8	
Гистология						
Аденокарцинома	19	33	0.704	32	20	0.567
Перстневидноклеточный рак	3	7		5	5	
Недифференцированный рак	0	1		1	0	
Стадия						
I-II	8	17	0.790	16	9	0.793
III-IV	14	24		22	15	
Локализация						
Дистальный отдел	3	11	0.396	8	6	0.987
КЭР	0	3		2	1	
Проксимальный отдел	7	9		10	6	
Тело желудка	11	15		16	10	
Тотальное поражение	1	3		2	2	
Размер опухоли (T)						
T1-T2	3	10	0.515	11	2	0.058
T3-T4	19	31		27	23	
Наличие регионарных метастазов (N)						
N0	7	17	0.588	13	11	0.597
N+	15	24		25	14	
Наличие отдаленных метастазов (M)						
M0	21	33	0.144	36	18	0.023*
M+	1	8		2	7	
Дифференцировка (G)						
G1-G2	7	12	>0.999	14	5	0.239
G3	12	21		18	15	

\*Статистически значимо.

Экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках отмечена в 35% (22 из 63) образцов. Экспрессию PD-L1 в стромальных клетках выявили в 60% (38 из 63) образцов. Далее проанализировали ассоциацию между содержанием PD-L1 и клинико-морфологическими характеристиками заболевания (табл. 3).

Проведенное исследование показало, что содержание PD-L1 в опухолевых клетках не ассоциировано с клиническими и морфологическими характеристиками РЖ. Экспрессия PD-L1 в стромальных клетках опухоли ассоциирована с отдаленными метастазами, именно при их наличии реже наблюдали экспрессию PD-L1 в строме первичной опухоли.

### Растворимые формы PD-1 и PD-L1

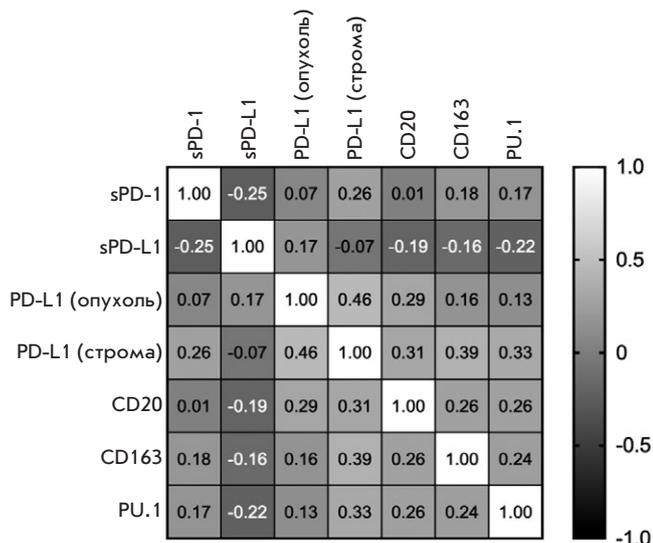
Дополнительно проведен анализ содержания растворимых форм (sPD-1, sPD-L1) контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных РЖ для выявления корреляций между их содержа-

нием в плазме крови, тканевой экспрессией и прогностической значимостью.

На первом этапе работы мы оценили диагностический потенциал исследованных белков. Медиана содержания sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови здоровых доноров составила 29.25 (14.9–45.5) и 36.23 (9.83–73.1) пг/мл соответственно, в группе больных РЖ – 12.57 (7.7–19.7) и 21.83 (10.1–74.3) пг/мл. Проведение статистического анализа показало, что содержание растворимой формы рецептора sPD-1 у больных РЖ значимо ниже, чем у здоровых доноров. Уровни sPD-L1 в группах здоровых доноров и больных РЖ не различались.

### Корреляционный анализ растворимых и тканевых форм исследованных белков

Корреляцию уровней исследуемых белков анализировали с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены на рис. 3.



**Рис. 3.** Корреляционный анализ тканевых и сывороточных уровней PD-1, PD-L1, PU.1, CD163 и CD20 у больных раком желудка

Показано, что содержание в плазме крови растворимой формы рецептора sPD-1 обратно коррелирует с содержанием в плазме крови sPD-L1 и прямо коррелирует с тканевой экспрессией PD-L1 в стромальных клетках ( $r = -0.251$ ;  $p = 0.047$  и  $r = 0.255$ ;  $p = 0.044$  соответственно). Также экспрессия PD-L1 в стромальных клетках опухолей желудка прямо коррелировала с экспрессией PD-L1 в опухолевых клетках и содержанием всех исследованных стромальных маркеров. Аналогичную картину наблюдали и для В-клеток. А именно, содержание CD20+ В-клеток в строме опухолей положительно статистически значимо коррелирует как с содержанием макрофагов, так и с экспрессией PD-L1 и в строме, и в опухолевых клетках.

### Прогностическая значимость PD-L1/PD-1 у больных РЖ

Нами проведен анализ прогностической значимости исследованных маркеров и их комбинаций у больных РЖ. Для анализа показателей выживаемости пациентов распределили на две группы: с высоким и низким содержанием растворимых форм-маркеров относительно медианы. В случае тканевой экспрессии PD-L1 пациентов распределяли на две группы по наличию/отсутствию этого белка отдельно в опухолевых и стромальных клетках. Дополнительно проанализировали выживаемость в зависимости от комплексного содержания как растворимой sPD-L1, так и тканевой формы PD-L1. Графики выживаемости больных представлены на рис. 4.

В данном исследовании не была установлена связь между уровнем sPD-1 и sPD-L1 при РЖ и прогнозом выживаемости. Аналогичную картину наблюдали в случае тканевой формы PD-L1, однако следует отметить тенденцию к прогностической значимости PD-L1, а именно, высокий уровень этого белка в опухолевых клетках РЖ является более благоприятным прогностическим фактором, в отличие от низкой экспрессии маркера ( $p = 0.122$ ). Проведение комплексного анализа показало, что высокое содержание одновременно тканевой и растворимой форм PD-L1 также не является прогностическим маркером выживаемости при РЖ.

Далее проанализировали прогностическую значимость PU.1, CD20 и CD163 при РЖ. Результаты представлены на рис. 5.

Как следует из представленных на рис. 5 данных, стромальные маркеры (PU.1, CD163, CD20) не имеют прогностической значимости при РЖ.

Результаты многофакторного статистического анализа прогностической значимости всех исследованных маркеров представлены в табл. 4.

С использованием регрессионного анализа Кокса показано, что высокое содержание CD163 при РЖ можно рассматривать как независимый прогностический фактор, ассоциированный со снижением показателей общей выживаемости.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническая и прогностическая значимость микроокружения опухолей желудка активно изучается в настоящее время. Нами проведен анализ содержания PU.1+, CD163+ и CD20+ в строме опухолей желудка и оценена их клиническая и прогностическая значимость. В контексте солидных опухолей изучена клиническая значимость экспрессии PU.1 у больных раком молочной железы и глиомами [11, 12], причем показана ассоциация его экспрессии с прогрессией и неблагоприятным прогнозом при обеих нозологиях. Экспрессия PU.1 изучена также при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) [13], раке толстой кишки [14] и пищевода [10]. Изучению экспрессии PU.1 при РЖ посвящено одно исследование, в котором показано, что экспрессия PU.1 значительно повышена в опухолевой ткани желудка по сравнению с относительной нормой и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и прогрессированием заболевания. Более того, высокая экспрессия PU.1 положительно коррелирует с количеством активированных CD4 Т-клеток памяти, покоящихся НК-клеток, макрофагов M2, покоящихся дендритных клеток и нейтрофилов в строме опухоли [15]. Проведенное нами исследование не выявило прогностической значимости этого белка, однако мы на-

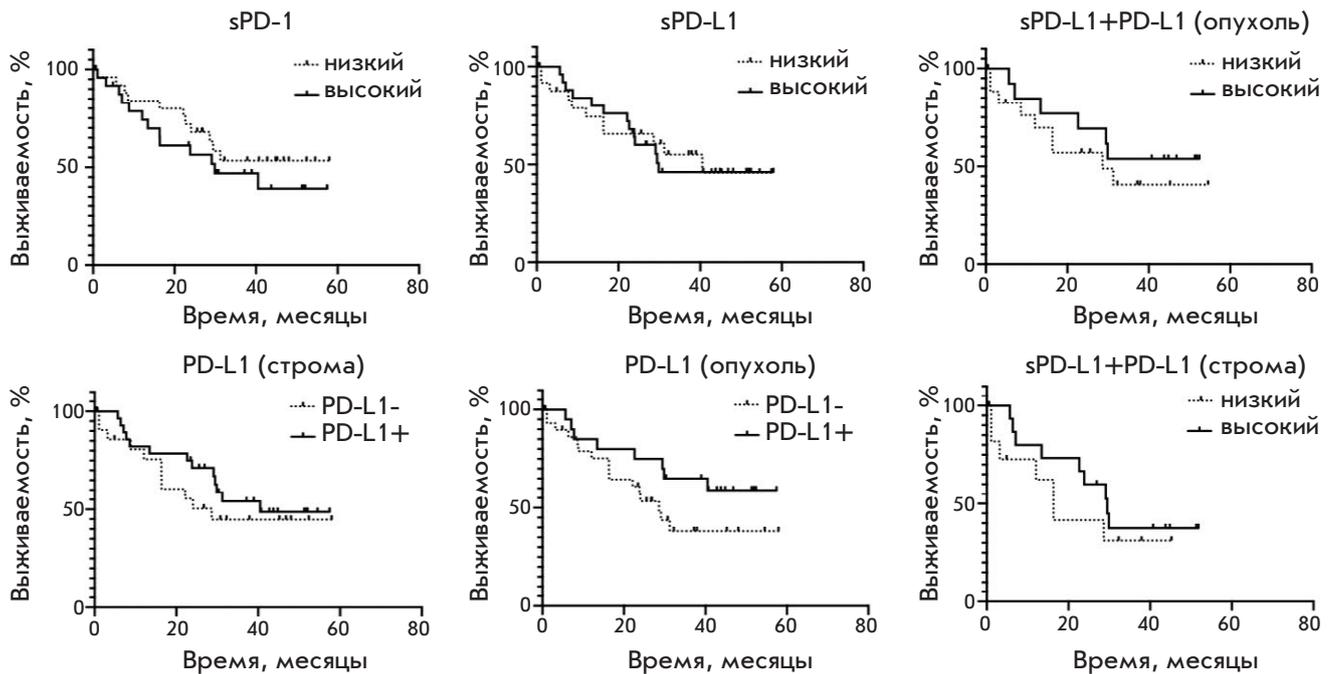


Рис. 4. Анализ общей выживаемости больных РЖ в зависимости от содержания растворимых (sPD-L1, sPD-1) и тканевых (PD-L1, PD-1) форм основных компонентов контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1

Таблица 4. Статистический анализ прогностической значимости sPD-1, sPD-L1, PD-L1, CD20, CD163 и PU.1 при раке желудка

Показатель	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
sPD-1 (высокий/низкий)	1.443	(0.646–3.226)	0.366	0.971	(0.915–1.013)	0.234
sPD-L1 (высокий/низкий)	1.038	(0.466–2.315)	0.927	0.999	(0.988–1.008)	0.780
PD-L1 (опухоль) (высокий/низкий)	0.524	(0.235–1.167)	0.122	0.480	(0.150–1.406)	0.193
PD-L1 (строма) (высокий/низкий)	0.721	(0.316–1.644)	0.419	0.954	(0.332–2.564)	0.927
CD20 (высокий/низкий)	0.876	(0.393–1.953)	0.745	0.992	(0.965–1.016)	0.526
CD163 (высокий/низкий)	1.509	(0.677–3.361)	0.316	1.053	(1.007–1.098)	0.019*
PU.1 (высокий/низкий)	0.654	(0.292–1.466)	0.319	0.991	(0.963–1.018)	0.497

\* Статистически значимо.

блюдали положительную корреляцию между содержанием PU.1+ клеток, макрофагов и В-клеток, а также PD-L1+ клеток в опухолевой строме, что согласуется с опубликованными данными.

Оценке содержания CD163+ макрофагов в опухолях желудка посвящено большое количество исследований, однако их результаты достаточно противоречивы. Экспрессия CD163 часто ассоциируется с неблагоприятным прогнозом при различных солидных опухолях [16]. Однако CD163 может быть маркером хорошего прогноза при опухолях желудочно-кишечного тракта, в частности при раке пищевода [17] и раке толстой кишки [18]. Согласно данным однофакторного анализа, повышенная

плотность CD163+ макрофагов в строме опухоли при РЖ ассоциирована с активацией иммунного ответа и улучшением выживаемости пациентов [19]. Опубликованы и противоположные результаты. По данным исследования 148 образцов опухолевой ткани высокая инфильтрация CD68+/CD163+ может быть маркером неблагоприятного прогноза [20]. Показано также, что повышенное содержание CD163+ клеток ассоциировано с большим размером и низкой дифференцировкой опухоли, метастазами в регионарных лимфоузлах. Более того, плотность CD163 повышалась с увеличением глубины инвазии, стадии заболевания и повышением экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток. Установлено

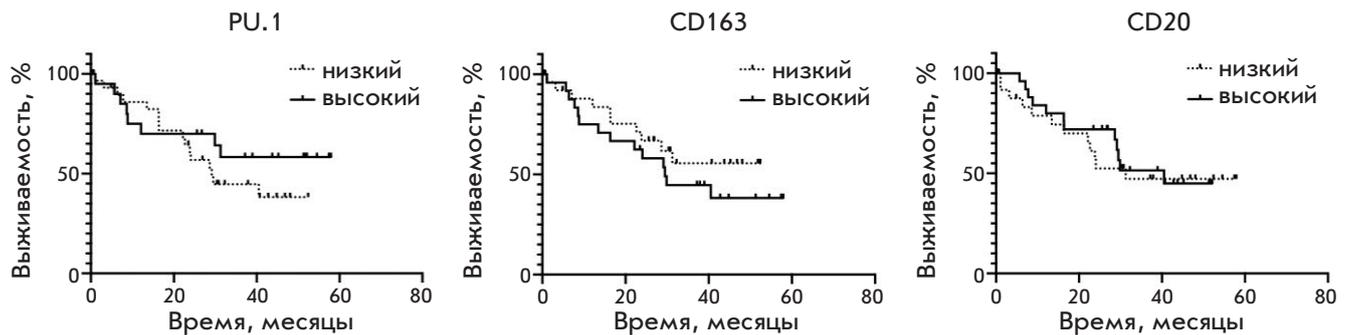


Рис. 5. Анализ общей выживаемости больных РЖ в зависимости от содержания PU.1, CD163 и CD20 в строме опухолей

также, что повышенная экспрессия CD163 ассоциирована с рецидивированием заболевания [21, 22]. Полученные нами данные согласуются с результатами, согласно которым именно высокое содержание CD163+ клеток в опухолях является независимым маркером неблагоприятного прогноза при РЖ. Опубликованы также данные, согласно которым повышенная экспрессия CD163 характерна для PD-L1-положительного РЖ в сравнении с PD-L1-отрицательным [23]. Нами показано, что содержание CD163+ клеток в опухолевой строме положительно коррелирует с экспрессией PD-L1 в стромальных, но не в опухолевых клетках при РЖ.

На следующем этапе мы проанализировали содержание CD20+ клеток в строме опухолей больных РЖ. На неоднозначность влияния CD20+ В-лимфоцитов, присутствующих в опухолях разного типа, на прогноз выживаемости и стадию опухоли указывают результаты разных исследований [24]. Так, например, общее число CD20+ В-лимфоцитов ассоциировано с прогрессией рака молочной железы [25], при этом обратная корреляция показана при раке яичников, печени и толстой кишки [26–28]. Показано, что повышенное содержание CD20+ В-лимфоцитов в строме РЖ ассоциировано с лучшим прогнозом, однако не выявлено ассоциации между количеством В-лимфоцитов и клинкоморфологическими характеристиками опухоли [29]. Схожие результаты продемонстрировали и другие исследователи, показавшие, что более высокая плотность CD20+ В-клеток в строме ассоциирована с лучшим прогнозом. По результатам данного исследования показано также, что экспрессия CD20 ассоциирована с CD68 в опухолевой строме. Интересно, что некоторые иммунные клетки стромы экспрессировали Ki-67, причем в основном это были CD20+ клетки. Более того, использование комбинации Ki-67+ и CD20+ показало лучший прогностический потенциал для РЖ [30]. Установленное нами отсутствие прогностической значимости CD20 при РЖ

свидетельствует о необходимости использования комбинаций маркеров для повышения эффективности прогнозирования клинического течения заболевания.

Прогностической значимости тканевой экспрессии PD-L1 в настоящее время посвящено около двух десятков исследований. Большинство работ свидетельствует о неблагоприятной прогностической значимости экспрессии данного белка в опухолевых клетках РЖ [31]. Однако некоторые результаты указывают на высокую экспрессию PD-L1 в опухолевых клетках как на маркер хорошего прогноза [32, 33]. Проведенное нами исследование продемонстрировало, что экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках ассоциирована с более высокой общей выживаемостью пациентов, в то время как анализ экспрессии PD-L1 в стромальных клетках или его растворимой формы такой закономерности не выявил.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что маркеры стромальных клеток при злокачественных опухолях желудка потенциально могут использоваться для определения стратегии лечения и прогноза заболевания. Однако существующие методы, а именно одноцветная иммуногистохимия, не позволяют получить достаточно информативный ответ. Для того, чтобы эффективно использовать стромальные маркеры в случае РЖ, необходимо проведение комплексного анализа, включающего определение нескольких сывороточных маркеров и мультиплексный анализ нескольких маркеров опухолевой стромы. ●

*Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-015-00479).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. // *CA Cancer J. Clin.* 2018. V. 68. № 6. P. 394–424.
2. Gonzalez C.A., Sala N., Rokkas T. // *Helicobacter.* 2013. V. 18 Suppl 1. P. 34–38.
3. Nomura A., Grove J.S., Stemmermann G.N., Severson R.K. // *Cancer Res.* 1990. V. 50. № 21. P. 7084.
4. Brooks-Wilson A.R., Kaurah P., Suriano G., Leach S., Senz J., Grehan N., Butterfield Y.S., Jeyes J., Schinas J., Bacani J., et al. // *J. Med. Genet.* 2004. V. 41. № 7. P. 508–517.
5. Cunningham D., Starling N., Rao S., Iveson T., Nicolson M., Coxon F., Middleton G., Daniel F., Oates J., Norman A.R., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 358. № 1. P. 36–46.
6. Bang Y.J., van Cutsem E., Feyereislova A., Chung H.C., Shen L., Sawaki A., Lordick F., Ohtsu A., Omuro Y., Satoh T., et al. // *Lancet.* 2010. V. 376. № 9742. P. 687–697.
7. Wilke H., Muro K., van Cutsem E., Oh S.C., Bodoky G., Shimada Y., Hironaka S., Sugimoto N., Lipatov O., Kim T.Y., et al. // *Lancet Oncol.* 2014. V. 15. № 11. P. 1224–1235.
8. Zhang H., Yue R., Zhao P., Yu X., Li J., Ma G., Tang J., Zhang L., Feng L., Sun L., et al. // *Tumour Biol.* 2017. V. 39. № 6. P. 1010428317705747. doi: 10.1177/1010428317705747
9. Hu H.T., Ai X., Lu M., Song Z., Li H. // *Exp. Cell. Res.* 2019. V. 384. № 2. P. 111652.
10. Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoiloa D.V., Podlesnaya P.A., Mochalnikova V.V., Gratchev A. // *Anal. Cell. Pathol. (Amst.)*. 2020. V. 2020. P. 5424780.
11. Xu Y., Gu S., Bi Y., Qi X., Yan Y., Lou M. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 15. № 3. P. 3753–3759.
12. Lin J., Liu W., Luan T., Yuan L., Jiang W., Cai H., Yuan W., Wang Y., Zhang Q., Wang L. // *Oncol. Lett.* 2017. V. 14. № 6. P. 8220–8226.
13. Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoiloa D.V., Podlesnaya P.A., Mochalnikova V.V., Gratchev A.N. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021. V. 170. № 4. P. 489–492.
14. Ковалева О.В., Грачев А.Н., Подлесная П.А., Рашидова М.А., Самойлова Д.В., Соколов Н.Ю., Мамедли З.З., Кудлай Д.А., Кушлинский Н.Е. // *Клин. эксп. морфол.* 2021. Т. 10. № 2. С. 32–39.
15. Huang J., Chen W., Jie Z., Jiang M. // *Front. Oncol.* 2022. V. 12. P. 820568.
16. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. // *Trends Immunol.* 2002. V. 23. № 11. P. 549–555.
17. Kovaleva O., Podlesnaya P., Rashidova M., Samoiloa D., Petrenko A., Mochalnikova V., Kataev V., Khlopko Y., Plotnikov A., Gratchev A. // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 7. P. 743.
18. Koelzer V.H., Canonica K., Dawson H., Sokol L., Karamitopoulou-Diamantis E., Lugli A., Zlobec I. // *Oncoimmunology.* 2016. V. 5. № 4. P. e1106677.
19. Huang Y.K., Wang M., Sun Y., Di Costanzo N., Mitchell C., Achuthan A., Hamilton J.A., Busuttill R.A., Boussioutas A. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3928.
20. Svensson M.C., Svensson M., Nodin B., Borg D., Hedner C., Hjalmarsson C., Leandersson K., Jirstrom K. // *J. Innate Immun.* 2022. № 3. P. 1–14.
21. Zhu Q., Wu X., Tang M., Wu L. // *Medicine (Baltimore).* 2020. V. 99. № 17. P. e19839.
22. Zhang W.J., Zhou Z.H., Guo M., Yang L.Q., Xu Y.Y., Pang T.H., Gao S.T., Xu X.Y., Sun Q., Feng M., et al. // *J. Cancer.* 2017. V. 8. № 3. P. 363–370.
23. Harada K., Dong X., Estrella J.S., Correa A.M., Xu Y., Hofstetter W.L., Sudo K., Onodera H., Suzuki K., Suzuki A., et al. // *Gastric Cancer.* 2018. V. 21. № 1. P. 31–40.
24. Sjoberg E., Frodin M., Lovrot J., Mezheyeuski A., Johansson M., Harmenberg U., Egevad L., Sandstrom P., Ostman A. // *Br. J. Cancer.* 2018. V. 119. № 7. P. 840–846.
25. Mahmoud S.M., Lee A.H., Paish E.C., Macmillan R.D., Ellis I.O., Green A.R. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. V. 132. № 2. P. 545–553.
26. Shi J.Y., Gao Q., Wang Z.C., Zhou J., Wang X.Y., Min Z.H., Shi Y.H., Shi G.M., Ding Z.B., Ke A.W., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. № 21. P. 5994–6005.
27. Lundgren S., Berntsson J., Nodin B., Micke P., Jirstrom K. // *J. Ovarian Res.* 2016. V. 9. P. 21.
28. Berntsson J., Nodin B., Eberhard J., Micke P., Jirstrom K. // *Int. J. Cancer.* 2016. V. 139. № 5. P. 1129–1139.
29. Dong J., Li J., Liu S.M., Feng X.Y., Chen S., Chen Y.B., Zhang X.S. // *Med. Oncol.* 2013. V. 30. № 1. P. 442.
30. Meier A., Nekolla K., Hewitt L.C., Earle S., Yoshikawa T., Oshima T., Miyagi Y., Huss R., Schmidt G., Grabsch H.I. // *J. Pathol. Clin. Res.* 2020. V. 6. № 4. P. 273–282.
31. Gu L., Chen M., Guo D., Zhu H., Zhang W., Pan J., Zhong X., Li X., Qian H., Wang X. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 8. P. e0182692.
32. Kim J.W., Nam K.H., Ahn S.H., Park D.J., Kim H.H., Kim S.H., Chang H., Lee J.O., Kim Y.J., Lee H.S., et al. // *Gastric Cancer.* 2016. V. 19. № 1. P. 42–52.
33. Boger C., Behrens H.M., Mathiak M., Kruger S., Kalthoff H., Rocken C. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 17. P. 24269–24283.