

На правах рукописи

Полетика Вадим Сергеевич

**РОЛЬ ГАЛЕКТИНОВ-1,3 В ДИСРЕГУЛЯЦИИ АДАПТИВНОГО
ИММУНИТЕТА ПРИ РАКЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА**

14.03.03 – патологическая физиология
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Уразова Ольга Ивановна

доктор медицинских наук

Колобовникова
Юлия Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
руководитель лаборатории клеточно-молекулярной
физиологии и патологии
НИИ медицинских проблем Севера –
обособленного подразделения
ФИЦ КНЦ СО РАН

Савченко
Андрей Анатольевич

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией биохимии опухолей
НИИ онкологии Томского НИМЦ

Кондакова
Ирина Викторовна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Защита состоится «__» _____ 2021 года в __. __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России) по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Рак толстого кишечника занимает одну из лидирующих позиций по распространенности и смертности в России и мире [Каприн А.Д. и соавт., 2018]. В патогенезе рака толстого кишечника существенную роль играет дисрегуляция иммунного ответа [Ling A. et al., 2016; Amicarella F. et al., 2017]. Известен целый ряд механизмов, которые позволяют опухолевым клеткам «программировать» свое микроокружение с целью угнетения противоопухолевого иммунитета [Thijssen V.L. et al., 2015; Rabinovich G.A. et al., 2016; Seidel J.A. et al., 2018]. Одним из таких механизмов может быть опухоль-ассоциированная продукция галектинов, реализующих широкий спектр вне- и внутриклеточных функций [Chang W. et al., 2017; Chou F. et al., 2018; Orozco C.A. et al., 2018]. Среди представителей данного семейства белков на всех этапах опухолевого процесса (злокачественная трансформация, инвазия, метастазирование, неоангиогенез, регуляция иммунного микроокружения опухоли) принимают участие галектин-1 и галектин-3 [Chou F. et al., 2018; Chetry M. et al., 2018].

Опухолевые заболевания характеризуются дисбалансом экспрессии галектинов (типов 1 и 3), ассоциированным с изменением клинкоморфологических параметров новообразований [Ebrahim A.H. et al., 2014; Thijssen V. et al., 2015]. Гиперэкспрессия галектина-1 злокачественно трансформированными клетками яичников и щитовидной железы коррелирует с появлением регионарных и отдаленных метастазов [Kim H. et al., 2012; Arkolia et al., 2017]. Повышенная экспрессия галектина-3 регистрируется в опухолевых клетках аденокарциномы желудка и ассоциирована с низкой выживаемостью пациентов [Ajani J.A. et al., 2018]. Сведения литературы, касающиеся экспрессии галектинов 1 и 3 типов в опухолевой ткани толстого кишечника, их прогностической значимости, а также роли в дисрегуляции противоопухолевого иммунитета остаются противоречивыми [Barrow H. et al., 2011; Compagno D. et al., 2020; Nakajima K. et al., 2020].

Ключевым проявлением опухоль-индуцированной дисрегуляции иммунных реакций и супрессии механизмов противоопухолевого иммунитета при злокачественных новообразованиях является нарушение баланса субпопуляций адаптивных CD4⁺ Т-лимфоцитов с регуляторной активностью [Vesely M.D. et al., 2011; Tosolini M. et al., 2011; Spurrell E.L. et al., 2014; Xia A. et al., 2019]. Известно, что центральными клетками-регуляторами иммунного ответа, вовлеченными в патогенез опухолевого процесса, являются Т-лимфоциты-хелперы (Th – T-helpers) типа 1 (Th1) и Treg – Т-регуляторные лимфоциты с иммуносупрессорной активностью. Их регуляторные эффекты опосредованы молекулами – рецепторами и цитокинами, синтез которых, в свою очередь, контролируется внутриклеточными белками, модулирующими транскрипцию специфических участков ДНК. В целом, указанные белки (транскрипционные факторы) функционируют как регуляторы экспрессии генов и дифференцировки иммунных клеток. Так, дифференцировочный транскрипционный фактор Th1-клеток – T-bet индуцирует экспрессию гена и синтез IFN (interferon – интерферон) γ . IFN γ

опосредует элиминацию злокачественных клеток путем увеличения цитотоксического потенциала лимфоцитов и стимуляции антиген-презентирующих клеток, в том числе их ферментативной и секреторной активности [Ling A. et al., 2016; En Tay R. et al., 2020]. В свою очередь, Treg-клетки за счет контактного ингибирования, а также регулируемой транскрипционным фактором Foxp3 секреции иммуносупрессорных цитокинов – IL (interleukin – интерлейкин) 10 и TGF (transforming growth factor – трансформирующий фактор роста) β , подавляют реакции врожденного и адаптивного (гуморального и клеточного) иммунитета. TGF β является фактором конверсии наивных Т-хелперов в Treg-клетки [Tosolini M. et al., 2011; Li C. et al., 2020].

Важное значение в потенцировании реакций Th1-иммунного ответа и патогенезе противоопухолевой защиты отводится Th17-лимфоцитам, дифференцировка которых регулируется фактором транскрипции RORC2, активирующим образование клетками маркерного провоспалительного цитокина IL-17A. Посредством IL-17A Т-лимфоциты-хелперы типа 17 участвуют в деструкции опухоли и элиминации опухолевых клеток, привлекая в очаг новообразования CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) и нейтрофилы [Amicarella F. et al., 2017; Chang S.H., 2019].

В исследованиях *in vitro* установлено, что галектины типов 1 и 3 способны модулировать клеточно-опосредованный иммунный ответ за счет регуляции дифференцировки и апоптоза Th1- и Th17-лимфоцитов, а также Treg с иммуносупрессорными свойствами [Cedeno-Laurent F. et al., 2012; Fermino M.L. et al., 2013; Radosavljevic G. et al., 2011]. Продукция галектинов (1 и 3 типов) трансформированными клетками и элементами опухолевого микроокружения рассматривается как одна из стратегий подавления противоопухолевого иммунитета [Kovács-Sólyom F. et al., 2010; Rabinovich G.A. et al., 2016; Nambiar D.K. et al., 2019]. Однако иммуотропные эффекты галектина-1 и галектина-3 в отношении отдельных субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов при опухолевых заболеваниях остаются неясными.

Степень разработанности темы. В научной литературе представлен значительный объем данных, касающихся роли галектинов в норме и при патологии. Детально охарактеризованы отдельные группы β -галактозид-связывающих белков, проанализированы молекулярные механизмы, опосредующие внутри- и внеклеточные функции лектинов, обосновано их участие в регуляции процессов клеточной адгезии, пролиферации, апоптоза и др. [Johannes L. et al., 2018; Brinchmann M.F. et al., 2018; Modunetti C.P. et al., 2019]. В контексте опухолевой патологии наибольшее внимание уделяется галектинам 1-го и 3-го типов ввиду вовлеченности рассматриваемых белков в развитие ключевых этапов канцерогенеза и опухолевой прогрессии [Bartolazzi A. et al., 2018; Chetry M. et al., 2018].

Участие галектинов (типов 1 и 3) в регуляции противоопухолевого иммунитета активно обсуждается в научном сообществе [Rabinovich G.A. et al., 2016; Chou F. et al., 2018; Navarro P. et al., 2020]. На *in vitro* моделях меланомы и

лимфомы Ходжкина продемонстрирована способность галектина-1, продуцируемого злокачественными клетками, избирательно подавлять Th1-зависимый иммунный ответ и, напротив, стимулировать экспансию иммуносупрессорных Treg [Rubinstein N. et al., 2004; Juszczynski P. et al., 2007]. По данным F. Cedeno-Laurent et al. (2012), в экспериментах *in vivo* инокуляция клеток меланомы с нокаутированным геном галектина-1 мышам ассоциировалась с 8-кратным снижением численности внутриопухолевых IL-10⁺ Treg, а также увеличением выживаемости животных по сравнению с контрольной группой [Cedeno-Laurent F. et al., 2012]. Введение специфического ингибитора галектина-3 *in vivo* мышам сопровождалось отторжением опухоли, ассоциированным с увеличением функциональной активности CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов [Demotte N. et al., 2008]. О.А. Васильевой и соавт. (2013, 2015) показана способность галектинов-1,3 модулировать *in vitro* выживаемость и функциональную активность основных субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов [Васильева О.А. и соавт., 2013, 2015].

Несмотря на сведения о роли галектинов (1 и 3 типов) в патогенезе опухоль-ассоциированной супрессии иммунного ответа, механизмы влияния рассматриваемых лектинов на адаптивный иммунитет при злокачественных новообразованиях толстого кишечника требуют детального изучения.

Цель исследования: установить галектин-1- и галектин-3-зависимые факторы патогенеза дисрегуляции адаптивного иммунитета во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами опухоли при раке толстого кишечника.

Задачи исследования:

1. Оценить экспрессию галектина-1 и галектина-3 в клетках опухоли и концентрацию галектинов 1 и 3 в плазме периферической крови у больных раком толстого кишечника.
2. На основе анализа нарушений субпопуляционного состава адаптивных CD4⁺ Т-лимфоцитов-хелперов крови Th1, Th17, Treg и их цитокин-секреторной активности определить патогенетические факторы иммунной дисрегуляции у пациентов с раком толстого кишечника.
3. Проанализировать связь плазменной концентрации галектинов 1 и 3 с нарушениями субпопуляционного состава и цитокин-секреторной активности регуляторных Т-лимфоцитов крови (CD4⁺T-bet⁺ Th1, CD4⁺RORC2⁺ Th17, CD4⁺Foxp3⁺ Treg) при раке толстого кишечника.
4. Дать комплексную оценку галектин-1,3-зависимой дисрегуляции иммунитета во взаимосвязи со степенью дифференцированности и распространения (инвазии) первичной опухоли, наличием метастазов у больных раком толстого кишечника.

Научная новизна. Впервые при раке толстого кишечника проведено комплексное исследование галектин-1- и галектин-3-зависимых механизмов дисрегуляции адаптивного иммунитета во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами опухолевого процесса. Установлено, что количество клеток, экспрессирующих галектин-1 и галектин-3, в опухолевой ткани у больных с аденокарциномой толстого кишечника выше, чем при

аденомах соответствующей локализации. Патогенетическими факторами иммунной дисрегуляции при раке толстого кишечника являются снижение числа и секреторной активности Th1- и Th17-клеток крови и одновременная активация Treg-лимфоцитов с иммуносупрессорными свойствами. Показано, что у больных колоректальным раком нарушения субпопуляционного состава и цитокин-секреторной функции регуляторных CD4⁺ T-лимфоцитов крови (CD4⁺T-bet⁺ Th1, CD4⁺RORC2⁺ Th17, CD4⁺Foxp3⁺ Treg) коррелируют с увеличением концентрации галектинов 1 и 3 в периферической крови.

Приоритетными являются данные, доказывающие взаимосвязь нарушений соотношения адаптивных CD4⁺ T-лимфоцитов крови (Th1 и Treg) в крови не только с повышением содержания галектин-1- и галектин-3-позитивных клеток в опухоли и галектина-1 в плазме крови, но и с галектин-зависимыми показателями злокачественности опухолевого процесса при раке толстого кишечника, а именно с низкой дифференцированностью и высокой степенью распространения первичной опухоли, появлением ее регионарных и отдаленных метастазов, что свидетельствует о негативной роли галектинов 1 и 3 в иммунопатогенезе колоректального рака.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные новые фундаментальные данные существенно расширяют современные представления о роли галектинов-1,3 в механизмах дисрегуляции адаптивного иммунитета и прогрессии новообразования при раке толстого кишечника. Показано, что при колоректальном раке количество галектин-1,3-экспрессирующих клеток в опухолевой ткани повышается одновременно с увеличением концентрации галектинов 1 и 3 в периферической крови и во взаимосвязи с нарушениями количественного соотношения и функциональной активности основных субпопуляций регуляторных T-лимфоцитов. Результаты анализа факторов патогенеза иммунной дисрегуляции у больных раком толстого кишечника указывают на повышение содержания и активацию TGFβ1-секреторной функции CD4⁺Foxp3⁺ Treg-клеток и, напротив, дефицит CD4⁺T-bet⁺ Th1-лимфоцитов и CD4⁺RORC2⁺ Th17-лимфоцитов, сочетающийся с *in vitro* гипосекретцией маркерного Th17-цитокина – IL-17A. Обнаружено, что у больных раком толстого кишечника повышение содержания галектин-1,3-позитивных клеток в опухоли и галектина-1 в плазме крови вместе с галектин-зависимыми нарушениями баланса Th1- и Treg-лимфоцитов взаимосвязаны с клинико-морфологическими показателями неблагоприятного прогноза опухолевого процесса: низкой степенью дифференцированности клеток и высокой степенью распространения (T3, T4) первичной опухоли, появлением локальных (в регионарные лимфатические узлы) и отдаленных метастазов. В целом, гиперэкспрессия галектина-1 и галектина-3 клетками новообразования и увеличение концентрации галектинов 1 и 3 в плазме периферической крови в сочетании с проявлениями дисрегуляции адаптивного иммунитета, а также высоким инвазивным и метастатическим потенциалом опухоли позволяют рассматривать повышение содержания галектина-1 и галектина-3 в опухоли и крови при раке толстого кишечника в качестве предиктора агрессивного течения заболевания.

Результаты исследования используются на кафедре патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России в учебном процессе по дисциплинам «Патофизиология, клиническая патофизиология» (для специальностей 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия при подготовке обучающихся по программам специалитета; темы «Патофизиология тканевого роста» и «Патофизиология иммунитета. Иммунодефициты») и «Патологическая физиология» (для подготовки кадров высшей квалификации по направлению 30.06.01 Фундаментальная медицина; темы «Патофизиология тканевого роста» и «Роль иммунной системы в патологии»).

Методология и методы исследования. Для реализации поставленных задач обследованы пациенты с диагнозом рака толстого кишечника (код по МКБ С18-С20). Материалом исследования служили образцы тканей толстого кишечника, полученные при операционном вмешательстве, цельная кровь и супернатанты культуральной суспензии мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови больных раком толстого кишечника. Оценку экспрессии галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани выполняли методом иммуногистохимии. Относительное содержание субпопуляций Т-лимфоцитов в цельной крови определяли методом проточной цитофлуориметрии. Концентрацию галектинов (1 и 3 типов) в плазме периферической крови и цитокинов в супернатантах суспензионных культур мононуклеарных лейкоцитов измеряли методом иммуноферментного анализа. Исследования выполнены в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии на базе кафедры патофизиологии (заведующий кафедрой – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН О.И. Уразова) и Центральной научно-исследовательской лаборатории (руководитель – д-р мед. наук, профессор Е.В. Удут) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Положения, выносимые на защиту:

1. Иммунная дисрегуляция при раке толстого кишечника развивается вследствие дефицита регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+T\text{-bet}^+$, $CD4^+RORC2^+$ и *in vitro* гипосекреции IL-17A при увеличении числа и TGFβ1-секреторной активности супрессорных $CD4^+Foxp3^+$ Treg-клеток.
2. Патогенетические факторы иммунной дисрегуляции при раке толстого кишечника связаны с увеличением концентрации галектина-1 и галектина-3 в плазме крови. Определяется прямое соотношение между концентрацией галектина-1 в крови и количеством галектин-1-позитивных клеток в ткани злокачественного новообразования.
3. Галектин-1,3-зависимые нарушения субпопуляционного состава и цитокин-секреторной функции иммунорегуляторных Т-лимфоцитов и гиперэкспрессия галектинов 1 и 3 в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника сочетаются с низкой дифференцированностью и высокой степенью инвазии первичной опухоли, наличием регионарных и отдаленных метастазов.
4. Повышение содержания галектинов 1 и 3 в крови и опухолевой ткани и проявления дисрегуляции адаптивного иммунитета наиболее выражены при высокой степени злокачественности опухоли толстого кишечника.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность

результатов, полученных в ходе исследования, подтверждается достаточным объемом клинико-лабораторного материала, применением современных методов исследования, адекватных поставленным цели и задачам.

Основные положения научной работы докладывались и обсуждались на Всероссийской научной конференции «Патофизиология и фармакология системы крови», посвященной 35-летию НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (Томск, 10-11 октября 2019 г.), VI Петербургском международном форуме «Белые ночи 2020» (Санкт-Петербург, 25-28 июня 2020 г.), III Инновационном Петербургском медицинском форуме (Санкт-Петербург, 21-23 октября 2020 г.), XXIV Российском онкологическом конгрессе (Москва, 11-14 ноября 2020 г.), Международной научно-практической конференции ТГМУ им. Абуали ибни Сины «Достижения и проблемы фундаментальной науки и клинической медицины» (Душанбе, 27 ноября 2020 г.).

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МД-842.2017.7, МД-2788.2019.7) и ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 16 рисунками и 10 таблицами. Библиографический указатель включает 189 источников, из них 8 отечественных и 181 иностранных авторов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, из которых 5 (в том числе 3 полнотекстовые статьи) – в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Автор принимал непосредственное участие в планировании исследования, разработке его дизайна и концепции, цели и задач, анализе данных литературы по теме диссертационной работы. Выполнял клинико-лабораторные методы исследования, статистическую обработку, анализ и обсуждение результатов. Лично и в соавторстве проводил подготовку научных публикаций по теме исследования. Написание всех глав и оформление иллюстративного материала диссертации выполнены автором самостоятельно.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, определены цель, основные задачи исследования, научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ современной научной литературы по теме диссертационного исследования, отражена роль галектинов в механизмах

противоопухолевого иммунитета и прогрессии злокачественных новообразований. Подробно описаны особенности строения и функций галактозид-связывающих белков (галектинов) в норме и при патологии. Охарактеризованы ключевые субпопуляции адаптивных CD4⁺ Т-лимфоцитов с регуляторной активностью (Th1, Th17, Treg) и их значение в реализации антицеллюлярных механизмов противоопухолевой резистентности. Рассмотрены особенности экспрессии галектинов (типов 1 и 3) при опухолевых заболеваниях и возможность использования отдельных представителей лектинов в качестве факторов прогноза течения онкологических заболеваний.

Во второй главе диссертации описаны объект, материал и методы исследования. В исследование был включен 81 пациент с диагнозом рака толстого кишечника (код по МКБ С18-С20) – 36 мужчин и 45 женщин (средний возраст 62,3±5,3 лет). Все пациенты находились на лечении в ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» («ТООД») (и.о. главного врача – канд. мед. наук М.Ю. Грищенко). Набор пациентов для исследования осуществлялся при участии врачей-онкологов В.Г. Круглова и Д.А. Шкатова.

Исследование выполнено с разрешения локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ (протокол №5669 от 27.11.2017 г.). У всех обследованных лиц было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Диагноз рака толстого кишечника устанавливался на основании клинико-анамнестических данных, а также результатов инструментальных методов исследования (морфологического, рентгенологического и эндоскопического). Исследование морфологии новообразования и отнесение его к определенному гистологическому типу было выполнено в патологоанатомическом отделении ОГАУЗ «ТООД» с привлечением врачей-патологоанатомов – д-ров мед. наук И.Л. Пурлика и Г.Г. Шимончук. Взятие материала для исследования у всех пациентов осуществляли до проведения лучевой и лекарственной терапии.

Для решения поставленных задач была сформирована основная группа исследования, в которую вошли пациенты с раком толстого кишечника; группу сравнения составили пациенты с аденомой толстого кишечника; контрольную группу – здоровые доноры.

В исследование не включали пациентов, которые получали лучевую терапию и химиотерапию до проведения операции, а также больных с новообразованиями других локализаций, хроническими инфекционными, аллергическими, аутоиммунными заболеваниями в стадии обострения, а также отказавшихся от участия в исследовании.

Материалом исследования служили образцы тканей толстого кишечника, полученные при операционном вмешательстве у больных со злокачественными и доброкачественными опухолями толстого кишечника. Образцы опухолевой ткани фиксировали в 12-процентном растворе рН-нейтрального формалина, после чего готовили в соответствии со стандартной методикой и помещали в парафин [Меркулов Г.А., 1996]. Из парафиновых блоков ткани толстого кишечника изготавливали серийные срезы толщиной 4-5 мкм. Приготовленные срезы окрашивали с применением раствора гематоксилина.

Гистологическая верификация и классификация новообразования, а также подготовка материала для иммуногистохимического исследования были выполнены на базе патологоанатомического отделения ОГАУЗ «ТООД» (заведующий – Л.Э. Ерендеева).

Помимо образцов тканей толстого кишечника исследовали цельную кровь и супернатанты суспензионной культуры моноклеарных лейкоцитов, выделенных из крови пациентов с раком толстого кишечника и здоровых доноров. Взятие крови проводили утром натощак из локтевой вены в количестве 8 мл, кровь стабилизировали ЭДТА.

Исследование экспрессии галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани выполняли на парафиновых срезах методом иммуногистохимии согласно стандартной методике [Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2004] с применением автоматического иммуногистостейнера «Bond-maX» («Leica Biosystems», Германия). В процессе исследования применяли антитела фирмы «GeneTex» (Канада) к галектину-1 (поликлональные, рабочее разведение 1:500, кроличьи) и фирмы «Cell Marque» (США) к галектину-3 (клон 9C4, RTU, мышиные). Экспрессию исследуемых параметров определяли по количеству положительно окрашенных опухолевых клеток (выражали в %).

Имунофенотипирование лимфоцитов крови проводили методом проточной многоцветной цитофлуориметрии. При подготовке образцов цельной крови к исследованию эритроциты предварительно удаляли с использованием лизирующего буфера «FACS Lysing solution» («BD Biosciences», США). В полученной после лизиса эритроцитов суспензии клеток определяли относительное содержание Th1 ($CD4^+T-bet^+$), Th17 ($CD4^+RORC2^+$) и Treg-лимфоцитов ($CD4^+Foxp3^+$) методом проточной цитофлуориметрии, принимая за 100 % общую популяцию лимфоцитов, определенную по уровню прямого и бокового рассеивания. Для идентификации субпопуляций лимфоцитов использовали моноклональные антитела, меченные флуоресцентными метками: к CD4 (PerCP-Cy5.5), T-bet (Alexa Fluor 488), RORC2 (APC) и Foxp3 (PE) («BD Biosciences», США; «RnD Systems», США). Для фиксации и пермеабиллизации клеток с целью внутриядерного окрашивания применяли набор буферов «Human Foxp3 Buffer Set» (фиксирующий и пермеабиллизирующий) согласно протоколу, прилагаемому фирмой-производителем «BD Biosciences» (США).

Выделение культуры моноклеарных лейкоцитов из периферической крови осуществляется методом градиентного центрифугирования [Boyum A., 1968]. Культивирование моноклеарных лейкоцитов проводили в полной питательной среде RPMI-1640 в CO_2 -инкубаторе в газовой смеси, содержащей 5 % углекислого газа при температуре 37 °C в течение 48 ч.

Для исследования содержания галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической крови, а также уровня *in vitro* секреции $IFN\gamma$, IL-17A и $TGF\beta 1$ моноклеарными лейкоцитами крови применяли метод твердофазного иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа. Процедуру иммуноферментного анализа проводили в соответствии с протоколом фирм-производителей коммерческих тест-систем: «Human Galectin-1 PicoKine ELISA Kit», «Human

Galectin-3/LGALS3 PicoKine ELISA Kit», «Human IL-17 PicoKine ELISA Kit» (BosterBio, США), «Гамма-IFN-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия) и «DRG® TGFβ1 ELISA» («DRG International, Inc.», США). Оптическую плотность содержимого ячеек планшета измеряли при длине волны 450 нм с применением фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences, США) и программы «Microsoft Excel» корпорации «Microsoft». В качестве средневыборочных характеристик использовали медиану (Me) и 25-ый и 75-ый процентиля (1-ый и 3-ий квартили: Q1 и Q3). Для оценки статистической достоверности различий количественных показателей между исследуемыми выборками использовали непараметрический критерий Манна-Уитни с введением поправки Бенджамини-Хохберга. Для выявления взаимосвязей между двумя количественными показателями применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Тесноту связи определяли по шкале Чеддока: очень высокая при $r > 0,9$; высокая при $0,7 < r < 0,9$; заметная при $0,5 < r < 0,7$; умеренная при $0,3 < r < 0,5$; слабая при $r < 0,3$. С целью прогнозирования вероятности бинарного события по значениям одного или нескольких количественных признаков использовали логистическую регрессию. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

В третьей главе диссертации представлены результаты исследования молекулярных механизмов влияния галектина-1 и галектина-3 на состояние адаптивного иммунитета у больных раком толстого кишечника. Проанализированы особенности экспрессии галектинов-1,3 в опухолевой ткани и их концентрация в периферической крови у больных колоректальным раком во взаимосвязи с клинико-морфологическими характеристиками опухолевого процесса. Охарактеризованы особенности субпопуляционного состава и цитокин-секреторной активности Т-лимфоцитов-хелперов Th1, Th17 и Т-регуляторных клеток крови в зависимости от экспрессии опухолевых и концентрации циркулирующих галектинов-1,3, и показателей злокачественности опухоли у больных раком толстого кишечника. Глава иллюстрирована таблицами и рисунками.

В четвертой главе проведен анализ и обсуждение полученных оригинальных данных с привлечением сведений по изучаемой теме, представленных в современной научной литературе.

Известно, что многие злокачественные новообразования характеризуются дисбалансом экспрессии галектинов-1,3, ассоциированным со степенью опухолевой прогрессии [Ebrahim A.H. et al., 2014; Thijssen V. et al., 2015; Labrie M. et al., 2017]. Экспрессия галектинов, характерная для «здоровых» эпителиоцитов слизистой оболочки толстого кишечника, может значительно увеличиваться при злокачественной трансформации клеток [Hittelet A. et al., 2003; Uhlén M. et al., 2005; Watanabe M. et al., 2008]. В нашем исследовании проводилась оценка экспрессии галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани методом

иммуногистохимии (% позитивных клеток) у больных колоректальным раком и пациентов с аденомами толстого кишечника. Согласно полученным результатам, относительное содержание злокачественно трансформированных опухолевых клеток, экспрессирующих галектин-1, у больных раком толстого кишечника составило 23 (11-41) %, что в среднем в 2,1 раза ($p=0,001$) превышало соответствующий параметр у пациентов с доброкачественными опухолями толстого кишечника (относительное количество галектин-1-позитивных опухолевых клеток было равным 11 (8-19) %) (Рисунок 1).

Относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих галектин-3, в злокачественных новообразованиях толстого кишечника равнялось 18 (12-24) % и превышало таковое (14 (8-17) %) в опухолевой ткани у пациентов с аденомами толстого кишечника ($p=0,034$) (Рисунок 2).

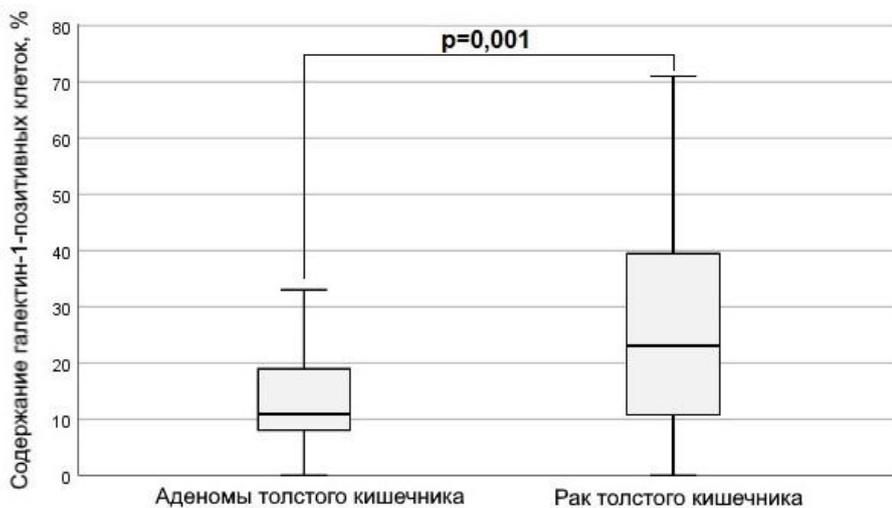


Рисунок 1 – Относительное содержание галектин-1-позитивных опухолевых клеток (%) у больных раком толстого кишечника

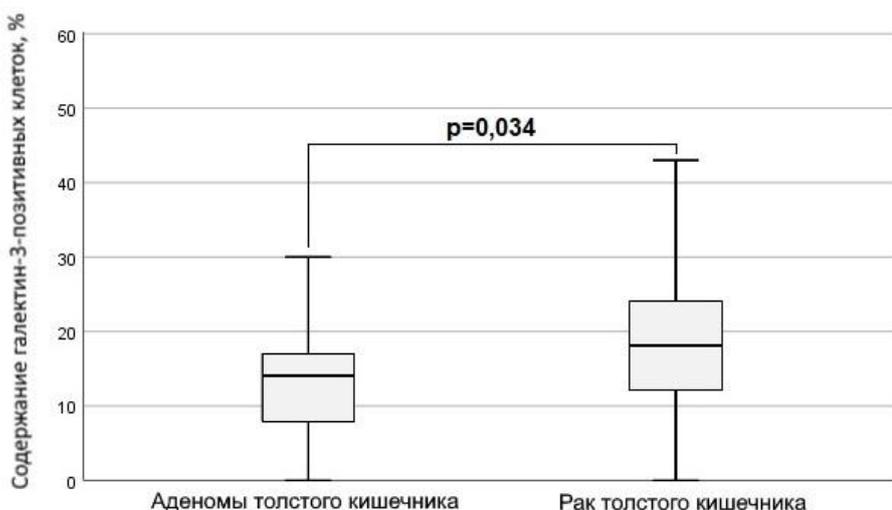


Рисунок 2 – Относительное содержание галектин-3-позитивных опухолевых клеток (%) у больных раком толстого кишечника

По-видимому, гиперэкспрессия галектинов-1,3 опухолевыми клетками может быть обусловлена стимулирующим влиянием гипоксии, развивающейся в опухолевом очаге ввиду неспособности вновь образующихся сосудов обеспечить кислородом активно делящиеся клетки опухоли [Ikemori R.Y. et al., 2014]. Вместе с тем, высокая экспрессия галектинов в опухоли может быть результатом стимулирующего влияния компонентов опухолевого микроокружения [Yamamoto-Sugitani M. et al., 2011].

Нарушение внутриопухолевой экспрессии галектинов может сопровождаться изменением содержания данных белков в периферической крови [Labrie M. et al., 2017; Martinez-Bosch N. et al., 2018; Topcu T.O. et al., 2018], в том числе и при колоректальном раке [Watanabe M. et al., 2011; Iacovazzi P.A. et al., 2010; Barrow H. et al., 2011; Shimura T. et al., 2016].

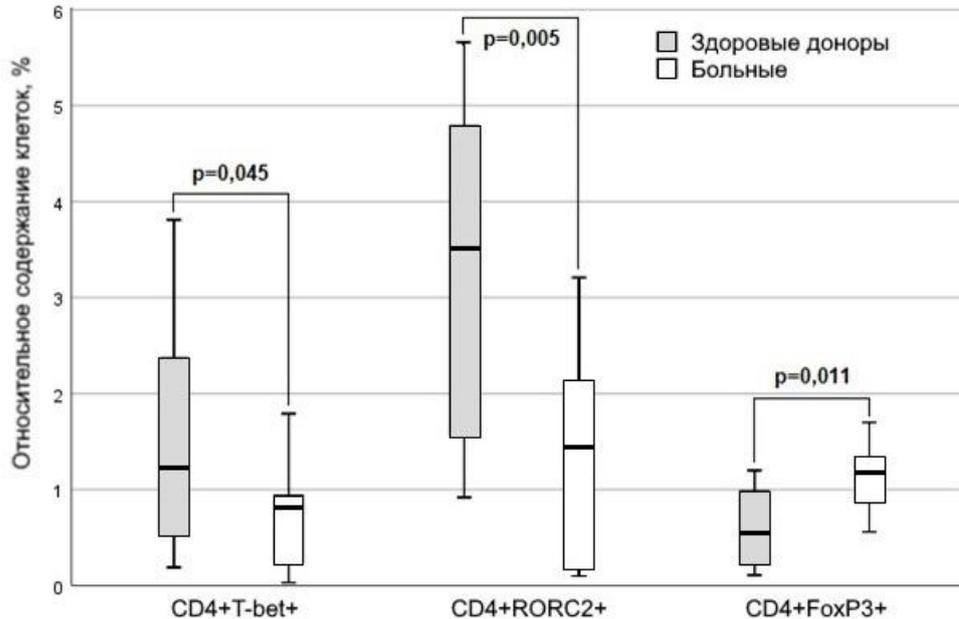
По результатам проведенного иммуноферментного анализа, у больных раком толстого кишечника обнаруживалось статистически значимое увеличение концентрации галектина-1 до 16,17 (15,31-17,10) нг/мл ($p=0,003$) в плазме крови по сравнению со значениями соответствующего показателя у здоровых доноров (13,74 (12,23-14,79) нг/мл). При этом у больных раком толстого кишечника обнаруживалась заметная связь ($r=0,59$; $p=0,002$) между повышением концентрации галектина-1 в плазме крови и относительным содержанием галектин-1-экспрессирующих клеток в опухолевой ткани. При исследовании содержания галектина-3 в периферической крови у больных колоректальным раком и здоровых доноров также были выявлены статистически значимые различия. У пациентов с раком толстого кишечника данный параметр оказался равным 3,28 (2,30-5,71) нг/мл, что в 2,1 раза ($p=0,006$) превышало величину аналогичного показателя в группе здоровых доноров (1,56 (1,19-2,17) нг/мл).

Таким образом, злокачественные новообразования толстого кишечника характеризуются гиперэкспрессией галектинов-1,3 в опухолевой ткани и увеличением концентрации данных лектинов в периферической крови.

Известно, что эффективность антицеллюлярных механизмов противоопухолевой резистентности в значительной степени зависит от баланса субпопуляций Т-лимфоцитов с регуляторной активностью [Toes R. et al., 1999; Facciabene A. et al., 2012]. Так, центральную роль в реализации механизмов противоопухолевой резистентности играют $CD4^+$ Т-лимфоциты-хелперы типа 1 (Th1) [Kennedy R. et al., 2008; Ling A. et al., 2016]. Для многих злокачественных опухолей характерно уменьшение количества Th1-лимфоцитов в ткани новообразования и периферической крови, взаимосвязанное с неблагоприятным прогнозом болезни [Ling A. et al., 2016; Yang J. et al., 2019]. По результатам проведенного исследования, у больных раком толстого кишечника выявлено статистически значимое снижение относительного содержания $CD4^+T-bet^+$ Th1-лимфоцитов (0,82 (0,24-0,94) %, $p=0,045$) по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (1,24 (0,48-2,43) %) (Рисунок 3).

В то же время, исследование содержания $IFN\gamma$ (ключевого цитокина Th1-лимфоцитов) в *in vitro* культуре мононуклеарных лейкоцитов крови показало, что у больных раком толстого кишечника и здоровых доноров значения данного

показателя были сопоставимыми (1,286 (0,100-3,571) пг/мл при колоректальном раке и 1,429 (0,100-2,857) пг/мл у здоровых лиц). Учитывая, что $IFN\gamma$ -секреторный ответ является типовой реакцией Th1-лимфоцитов, цитотоксических $CD8^+$ - и NK-клеток на антигенную стимуляцию, в том числе опухолевую [Aqbi H.F. et al., 2018], выявленный дефицит $IFN\gamma$ -опосредованных реакций (в



частности снижение числа $CD4^+T-bet^+$ Th1-клеток) у больных колоректальным раком отражает снижение противоопухолевой защиты макроорганизма.

Рисунок 3 – Относительное содержание Th1-, Th17- и Treg-лимфоцитов в периферической крови (% от общего числа лимфоцитов) у больных раком толстого кишечника

В механизмах развития и прогрессии опухоли важная роль отводится еще одной субпопуляции Т-лимфоцитов – Th17. Согласно данным литературы, относительное содержание данной субпопуляции лимфоцитов в периферической крови может варьироваться, хотя интерпретация этих изменений при злокачественных опухолях толстого кишечника пока неоднозначна [Amicarella F. et al., 2017].

По результатам работы, у пациентов с аденокарциномой толстого кишечника было установлено уменьшение процентного содержания $CD4^+RORC2^+$ Th17-лимфоцитов в периферической крови в среднем в 2,4 раза (1,44 (0,19-2,13) %, $p=0,005$) по сравнению с соответствующим параметром в группе здоровых доноров (3,51 (1,56-4,79) %) (Рисунок 3). При анализе секреции IL-17A мононуклеарными лейкоцитами периферической крови *in vitro* у пациентов с раком толстого кишечника базальный ее уровень оказался равным 0,116 (0,100-0,425) пг/мл, что было в среднем существенно ниже (в 5,7 раза, $p=0,005$), чем у здоровых доноров (0,657 (0,108-0,889) пг/мл). В целом, полученные результаты свидетельствуют о недостаточности иммунных механизмов, опосредованных Th17-лимфоцитами в иммунопатогенезе рака толстого кишечника.

Значимую роль в угнетении механизмов противоопухолевого иммунитета и развитии толерантности иммунокомпетентных клеток к опухолевым антигенам играют Т-регуляторные лимфоциты (Treg), реализующие свои функции за счет контактного (рецептор-опосредованного) ингибирования иммунокомпетентных клеток, а также секреции супрессорных цитокинов IL-10 и TGF β [Bonertz A. et al., 2009; Ohue Y. et al., 2019]. Наряду с иммуносупрессорными свойствами, TGF β способен оказывать стимулирующее влияние непосредственно на процессы пролиферации злокачественных клеток, их инвазию и метастазирование [Massague J., 2008]. По результатам проведенного исследования, у больных раком толстого кишечника относительное содержание CD4⁺Foxp3⁺ Treg-лимфоцитов в периферической крови оказалось равным 1,19 (0,8-1,48) %, что в среднем в 2,2 раза (p=0,011) превышало аналогичный показатель у здоровых доноров (0,55 (0,23-0,98) %) (Рисунок 3). Одновременно с этим, нами было зарегистрировано статистически значимое увеличение секреции TGF β 1 в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов больных раком толстого кишечника (835,8 (534,3-1949,0) пг/мл, p=0,048) по сравнению с аналогичным параметром у здоровых доноров (628,6 (471,4-777,2) пг/мл).

Выявленные изменения в сочетании с количественным и функциональным дефицитом Th1- и Th17-лимфоцитов – ключевых факторов противоопухолевого иммунного ответа, указывают на превалирование Treg-ассоциированных иммуносупрессорных реакций и подавление интенсивности протективного иммунного ответа в борьбе макроорганизма с опухолью при раке толстого кишечника.

Опухоль-ассоциированная иммуносупрессия может быть обусловлена действием различных факторов, включая влияние самой опухоли, элементов ее микроокружения, а также регуляторных молекул, к которым относятся галектин-1 и галектин-3. Для установления взаимосвязей между концентрацией галектина-1 и галектина-3, циркулирующих в периферической крови, и нарушениями субпопуляционного состава и функциональной активности CD4⁺ Т-лимфоцитов при раке толстого кишечника нами был проведен корреляционный анализ.

По результатам исследования установлена обратная заметная связь между плазменной концентрацией галектина-1 и количеством CD4⁺T-bet⁺ лимфоцитов в крови (r=-0,56; p=0,035) (Рисунок 4), что отражает супрессорное влияние секреторного галектина-1 в отношении ключевых противоопухолевых Th1-лимфоцитов.

Известно, что галектин-1 проявляет иммуносупрессорные свойства также в отношении Th17-лимфоцитов. Показана способность данного лектина индуцировать *in vitro* апоптотическую гибель Th17-лимфоцитов и подавлять их дифференцировку [Toscano M.A. et al., 2007; Васильева О.А. и соавт., 2015], а также модулировать секрецию маркерного Th17-цитокина IL-17A [Toscano M.A. et al., 2007]. По результатам нашего исследования, у больных колоректальным раком обнаружены отрицательные заметные корреляции плазменной концентрации галектина-1 с относительным содержанием CD4⁺RORC2⁺ Th17-лимфоцитов в крови (r=-0,59; p=0,033) и *in vitro* базальной секрецией IL-17A

мононуклеарными лейкоцитами крови ($r=-0,63$; $p=0,001$) (Рисунок 4).

Принимая во внимание данные литературы и полученные нами результаты, следует заключить факт участия галектина-1 в подавлении Th17-зависимых реакций адаптивного иммунитета при раке толстого кишечника.

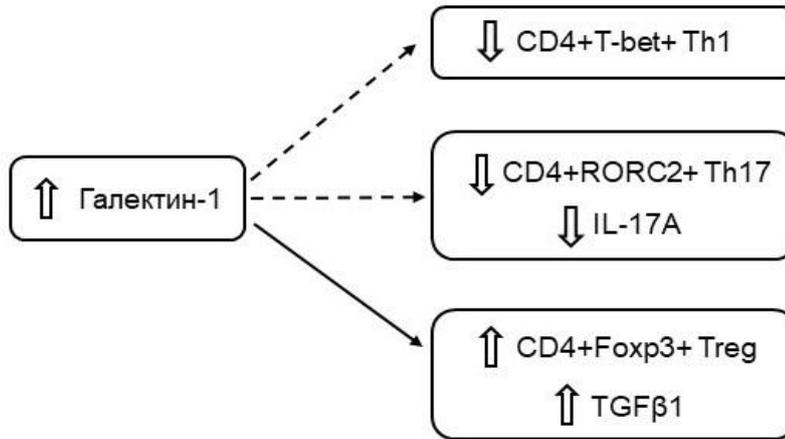


Рисунок 4 – Взаимосвязь увеличения плазменной концентрации галектина-1 с относительным содержанием CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови и *in vitro* секрецией их маркерных цитокинов у больных раком толстого кишечника

Примечание: пунктирные стрелки – отрицательные корреляции, сплошная стрелка – положительная корреляция.

Другой стороной иммуотропного действия галектина-1 является его способность угнетать противоопухолевый иммунный ответ через активацию механизмов иммуносупрессии, опосредованных Treg. По результатам проведенного исследования, у больных колоректальным раком высокая концентрация галектина-1 в плазме крови оказалась взаимосвязанной с увеличением относительного числа CD4⁺Foxp3⁺Treg клеток ($r=0,55$; $p=0,035$), а также *in vitro* гиперсекрецией TGFβ1 мононуклеарными лейкоцитами крови ($r=0,48$; $p=0,020$) (Рисунок 4). Установленная связь обусловлена, по-видимому, стимулирующим влиянием секреторного галектина-1 на Treg крови. Галектин-1 способен потенцировать *in vitro* дифференцировку Treg из наивных Т-лимфоцитов [Cedeno-Laurent F. et al., 2012], а также стимулировать пролиферацию и цитокин-секреторную активность уже дифференцированных Treg-лимфоцитов путем непосредственного взаимодействия с их мембранными рецепторами, и через активацию толерогенных дендритных клеток [Blois S.M. et al., 2007; Dalotto-Moreno T. et al., 2013].

В отличие от галектина-1, рассматриваемого в литературе в качестве универсального супрессорного фактора, информация об иммунорегуляторных эффектах, реализуемых галектином-3, не вполне однозначная. Показано, что секреторный галектин-3, аналогично галектину-1, способен индуцировать апоптоз CD4⁺ Т-лимфоцитов [Stillman B.N. et al., 2006; Wei J. et al., 2010]. По данным других авторов, галектин-3, напротив, увеличивает резистентность Т-лимфоцитов к апоптотической гибели [Yang R.Y. et al., 1996]. Не совсем ясной остается

функция галектина-3 и в отношении Т-регуляторных клеток.

Согласно результатам нашего исследования, у больных колоректальным раком увеличение концентрации галектина-3 в плазме крови имело высокую тесноту связи со снижением числа циркулирующих $CD4^+T\text{-bet}^+$ Т-лимфоцитов ($r=-0,81$; $p=0,001$) и возрастанием *in vitro* секреции TGF β 1 мононуклеарами крови ($r=0,70$; $p=0,001$). По-видимому, при раке толстого кишечника галектин-3 оказывает супрессорное влияние на клеточно-зависимые реакции адаптивного иммунитета посредством подавления Th1-лимфоцитов и активации функций иммуносупрессорных Treg.

В целом, опухоль-ассоциированная гиперсекреция галектина-1 и галектина-3 при раке толстого кишечника может выступать в качестве одного из механизмов иммуносупрессии, индуцируемой злокачественными клетками. Снижение эффективности антицеллюлярных механизмов противоопухолевой резистентности вносит значительный вклад в патогенез опухолевого процесса, способствует росту и распространению опухоли.

Для установления роли галектин-1,3-зависимой дисрегуляции адаптивного иммунитета в механизмах опухолевой прогрессии при раке толстого кишечника нами была проанализирована взаимосвязь нарушений субпопуляционного баланса и цитокин-секреторной активности $CD4^+T\text{-bet}^+$ Th1, $CD4^+RORC2^+$ Th17 и $CD4^+Foxp3^+$ Treg лимфоцитов крови с клинико-морфологическими показателями опухолевой прогрессии, а именно со степенью дифференцированности опухоли, степенью ее распространенности, а также наличием регионарных и отдаленных метастазов. Согласно полученным результатам, дефицит Th1-лимфоцитов в периферической крови (0,39 (0,18-0,87) %, $p=0,023$) и *in vitro* гипосекреция маркерного цитокина $CD4^+RORC2^+$ Th17-лимфоцитов IL-17A (0,10 (0,10-0,10) пг/мл, $p=0,013$) были наиболее выраженными у больных раком толстого кишечника со степенью инвазии первичной опухоли T3, T4, а увеличение относительного содержания Treg-клеток – у больных колоректальным раком, сопровождающимся появлением очагов гематогенного метастазирования (1,70 (1,27-2,46) %, $p=0,037$) (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Взаимосвязь нарушений субпопуляционного состава и цитокин-секреторной активности $CD4^+$ Т-лимфоцитов крови с клинико-морфологическими показателями злокачественности опухолевого процесса у больных раком толстого

кишечника

По результатам *in vivo* исследований, активация иммуносупрессорных Трег-лимфоцитов и подавление Th1-зависимых противоопухолевых реакций сопровождаются увеличением инвазивного и метастатического потенциала новообразования [Radosavljevic G. et al., 2011; Cedeno-Laurent F. et al., 2012; Dalotto-Moreno et al., 2013].

Следует отметить, что роль галектинов (типов 1 и 3) в патогенезе опухолевого роста и прогрессии не ограничивается их участием в дисрегуляции функций иммунокомпетентных клеток. Описано также непосредственное влияние галектинов на процесс злокачественной трансформации клеток, опухолевый неоангиогенез, темпы инфильтративного роста опухоли и формирование вторичных опухолевых очагов вследствие метастазирования первичной опухоли [Zhao Q. et al., 2010; Zhu X. et al., 2016; Blaževič O. et al., 2016; Lugano R. et al., 2020]. Нарушение экспрессии галектинов-1,3 при злокачественных новообразованиях различной локализации ассоциировано со стадией опухолевого процесса и выживаемостью больных [Endo K. et al., 2005; Chen J. et al., 2013; Ebrahim A.H. et al., 2014]. При этом сведения литературы, касающиеся роли галектина-1 и галектина-3 в патогенезе опухолевой прогрессии при раке толстого кишечника неоднозначны [Jurisci I. et al., 2000; Hittlet A. et al., 2003; Endo K. et al., 2005; Tsuboi K. et al., 2007; Zhao X.Y. et al., 2010; Barrow H. et al., 2011; Wu K. et al., 2015].

По результатам сравнительного анализа экспрессии галектина-1 в опухолевой ткани в зависимости от распространения первичной опухоли было установлено статистически значимое ее увеличение у больных раком толстого кишечника с более выраженной инвазией новообразования (Т3, Т4) по сравнению с аналогичным показателем у пациентов с меньшей выраженностью инвазивного роста опухоли Т1, Т2 (относительное содержание галектин-1-позитивных опухолевых клеток равнялось 27,0 (15,0-45,0) и 13,0 (9,0-19,0) % соответственно, $p=0,032$). Концентрация галектина-1 в плазме крови у больных колоректальным раком (Т3, Т4) составила 16,68 (15,72-17,88) нг/мл, превышая соответствующий параметр у пациентов с меньшей распространенностью инвазивного роста первичной опухоли (14,83 (13,10-15,84) нг/мл, $p=0,006$).

Ещё одним ключевым критерием злокачественности опухоли является метастазирование – процесс формирования вторичных новых очагов опухолевого роста, удаленных от первичного опухолевого узла. Согласно результатам настоящей работы, у больных раком толстого кишечника, сопровождающимся появлением очагов регионарного метастазирования, экспрессия галектина-1 в опухолевых клетках (38,0 (23,0-55,0) %) значимо превышала соответствующий показатель в группе пациентов с колоректальным раком без регионарных метастазов (20,0 (9,0-32,0) %, $p=0,006$). Аналогичная закономерность была выявлена в отношении внутриопухолевой экспрессии галектина-3 (процентное содержание галектин-3-экспрессирующих опухолевых клеток оказалось равным

28,0 (17,0-43,0) и 13,0 (5,0-20,0) % соответственно, $p=0,001$) и плазменной концентрации галектина-1 (16,59 (16,13-19,00) и 14,90 (13,17-16,01) нг/мл соответственно, $p=0,021$).

Сравнительный анализ экспрессии галектинов-1,3 клетками опухоли и концентрации указанных лектинов в плазме периферической крови в зависимости от наличия отдаленных метастазов позволил установить статистически значимое увеличение плазменной концентрации галектина-1 у больных колоректальным раком с отдаленными метастазами (18,10 (16,90-19,00) нг/мл) по сравнению с таковым у пациентов без метастатического поражения (15,84 (14,35-16,59) нг/мл, $p=0,023$).

Наряду с этим, у больных раком толстого кишечника с низкой степенью дифференцированности новообразования содержание галектин-3-позитивных опухолевых клеток достигало 33,5 (17,5-57,5) %, что значимо превышало значение соответствующего показателя у пациентов с более дифференцированными опухолями (15,0 (7,0-22,0) %, $p=0,038$). Аналогичная тенденция отмечалась при анализе концентрации галектина-3 в плазме крови. У пациентов с низкокодифференцированной аденокарциномой толстого кишечника плазменный уровень галектина-3 составил 7,22 (3,41-10,32) нг/мл, у больных высококодифференцированным колоректальным раком – 2,69 (1,77-4,11) нг/мл ($p=0,018$).

Анализируя возможные механизмы, лежащие в основе выявленных взаимосвязей, необходимо отметить, что в литературе описаны различные механизмы регуляторного влияния галектинов-1,3 на способность опухолевых клеток к инфильтративному росту и метастатическому распространению. По данным N. Horiguchi et al. (2003), при колоректальном раке галектин-1 модулирует *in vitro* адгезию опухолевых клеток к белкам внеклеточного матрикса фибронектину и ламинину, что связано с активацией внутриклеточных вторичных мессенджеров MAPK и PI3K. В свою очередь K. Wu et al. (2013) показали, что при индуцированной гиперэкспрессии галектина-3 в клеточной линии рака толстого кишечника, увеличение метастатической активности клеток опосредованно запуском K-Ras-Raf-Erk1/2-сигнального каскада. Установлена также способность галектина-1 стимулировать секрецию клетками опухолевого микроокружения протеолитических ферментов, расщепляющих белки внеклеточного матрикса, что облегчает инвазию злокачественных клеток, их интра- и экстравазацию [Miao J. et al., 2014; Zhu X. et al., 2016]. Кроме этого, галектины 1-го и 3-го типов реализуют проангиогенные свойства и потенцируют образование в опухолевом очаге разветвленной сосудистой сети. Последнее не только улучшает приток кислорода и питательных веществ в опухоль, но и способствует лимфатической и гематогенной диссеминации злокачественных клеток [Lugano R. et al., 2020].

В целом, у больных раком толстого кишечника установлена повышенная экспрессия галектинов-1,3 в опухолевой ткани и высокая их концентрация в периферической крови в ассоциации с низкой степенью дифференцированности опухоли, выраженным инфильтрирующим ростом первичного опухолевого узла, а также повышенным риском возникновения регионарных и отдаленных метастазов

(Рисунок 6).

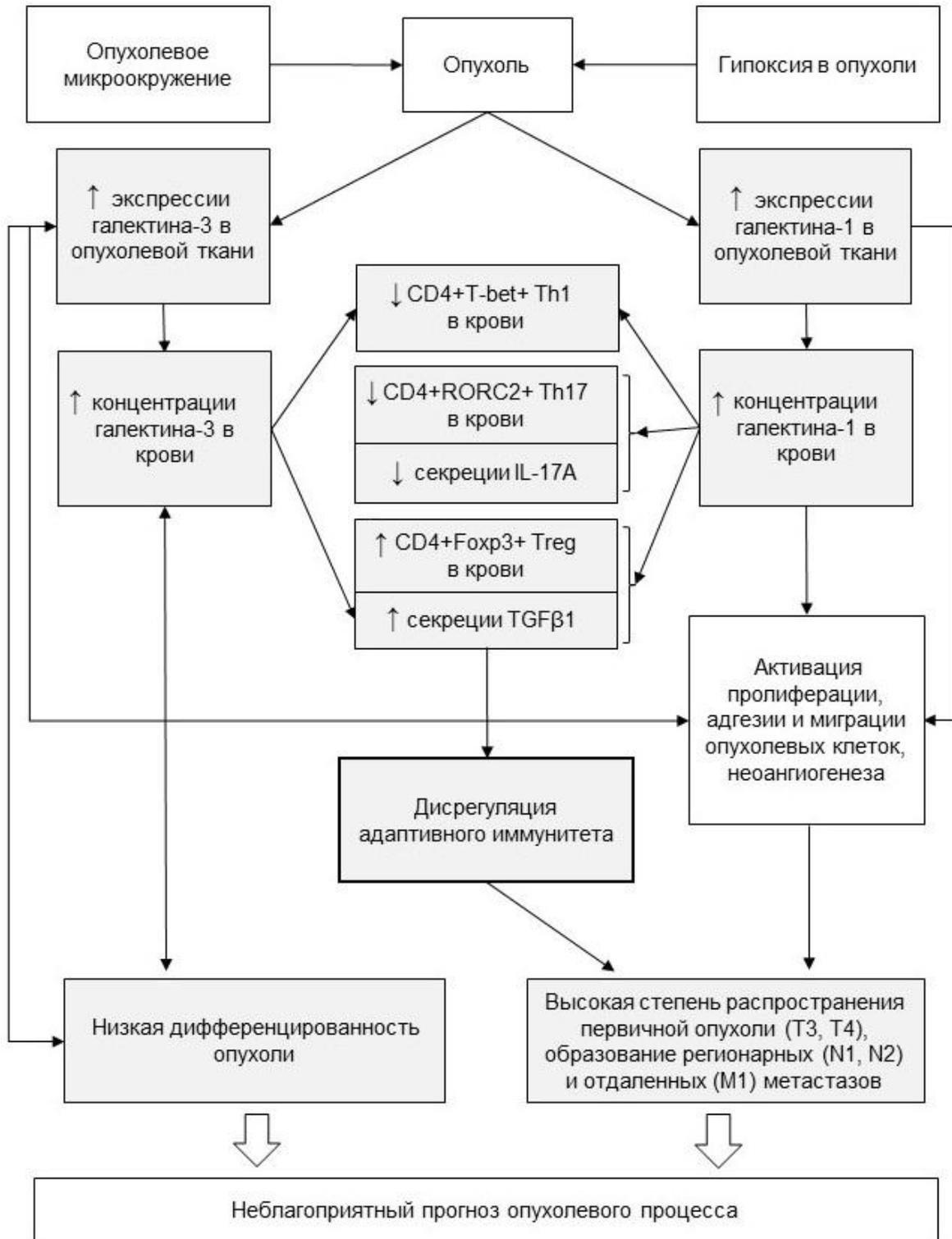


Рисунок 6 – Роль галектинов 1 и 3 в механизмах дисрегуляции адаптивного иммунитета и опухолевой прогрессии при раке толстого кишечника (по данным Zhao X. et al. (2010), Watanabe M. et al. (2011), Wu K. et al. (2013), Croci D. et al. (2014), Chen C. et al. (2014) и результатам собственных исследований (выделено

серым цветом))

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При раке толстого кишечника в опухолевой ткани и плазме крови повышается содержание галектинов 1 и 3, способных модулировать состояние адаптивного иммунитета и течение опухолевого процесса, принимая участие в механизмах прогрессии роста опухоли.

Установлены особенности фенотипа злокачественно трансформированных клеток толстого кишечника, проявляющиеся высокой экспрессией ими галектина-1 и галектина-3 в сравнении с клетками доброкачественных опухолей аналогичной локализации. Гиперэкспрессия внутриопухолевых галектинов-1,3 у больных колоректальным раком сопровождается увеличением содержания данных белков в периферической крови в ассоциации с нарушением субпопуляционного состава и цитокин-секреторной функции CD4⁺ Т-лимфоцитов крови с регуляторной активностью. Патогенетическими факторами дисрегуляции адаптивного иммунитета являются снижение содержания в периферической крови CD4⁺ Т-лимфоцитов-хелперов типов 1 и 17 и *in vitro* гипосекреция IL-17A в сочетании с увеличением числа иммуносупрессорных Treg-лимфоцитов и *in vitro* секреции их маркерного цитокина – TGFβ1.

Продемонстрирована взаимосвязь гиперэкспрессии галектинов-1,3 и дисбаланса субпопуляций регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов (Th1 и Treg) со степенью дифференцированности и инвазии первичной опухоли, формированием вторичных опухолевых очагов. Так, высокие показатели экспрессии галектина-1 клетками опухоли и плазменной концентрации галектина-1 в сочетании с дефицитом Th1-лимфоцитов и, напротив, увеличением числа иммуносупрессорных Treg-клеток в крови выявлены у больных колоректальным раком с проращением первичной опухоли в субсерозный слой кишечника и наличием очагов регионарного и отдаленного метастазирования. При этом показано, что внутриопухолевая гиперэкспрессия галектина-3 связана с низкой дифференцированностью новообразований толстого кишечника и наличием лимфогенных метастазов.

Ассоциация высокой экспрессии галектинов (типов 1 и 3) в опухолевой ткани и их плазменной концентрации с проявлениями иммунного Th1/Th17-клеточного дефицита и повышением активности иммуносупрессорных Treg-лимфоцитов, а также высоким инвазивным и метастатическим потенциалом опухоли свидетельствует об участии лектинов в механизмах дисрегуляции адаптивного иммунитета и прогрессии рака толстого кишечника, и обосновывает возможность их использования в качестве предиктора неблагоприятного прогноза заболевания.

ВЫВОДЫ

1. При раке толстого кишечника повышено содержание галектин-1,3-экспрессирующих клеток в опухолевой ткани (выше, чем при аденомах

толстого кишечника) и галектинов 1 и 3 в периферической крови (выше, чем у здоровых доноров). Установлено прямое соотношение между концентрацией галектина-1 в плазме крови и количеством галектин-1-позитивных клеток в ткани злокачественного новообразования.

2. Иммунная дисрегуляция у больных раком толстого кишечника развивается вследствие дефицита CD4⁺T-bet⁺ (Th1) и CD4⁺RORC2⁺ (Th17) лимфоцитов и увеличения относительного содержания иммуносупрессорных CD4⁺Foxp3⁺ Treg-клеток в крови в комплексе с нарушениями *in vitro* секреции Th17- и Treg-маркерных цитокинов – IL-17A (снижение) и TGFβ1 (повышение). Секреция IFNγ варьирует в пределах нормы.
3. Нарушения субпопуляционного состава регуляторных T-лимфоцитов крови (дефицит Th1, Th17) и их цитокин-секреторной активности (гиперсекреция TGFβ1) у больных раком толстого кишечника коррелируют с увеличением концентрации галектина-1 и галектина-3 в плазме крови.
4. У больных раком толстого кишечника высокая внутриопухолевая экспрессия галектина-1 и повышение концентрации галектина-1 в крови определяются при выраженной инвазии новообразования с наличием очагов регионарного и отдаленного метастазирования, в то время как высокая экспрессия галектина-3 клетками первичной опухоли соответствует низкой степени ее дифференцированности и регионарному метастазированию.
5. Галектин-1,3-зависимый дефицит CD4⁺T-bet⁺ Th1-лимфоцитов крови и *in vitro* гипосекреция IL-17A сочетаются с высокой степенью распространения первичной опухоли, а увеличение количества CD4⁺Foxp3⁺ иммуносупрессорных Treg-клеток в крови – с наличием отдаленных метастазов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Экспрессия галектинов-1,3 при раке желудка и толстой кишки с тканевой эозинофилией / Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И., Янкович К.И., Васильева О.А., Пурлик И.Л., Полетика В.С., Новицкий В.В., Уразова О.И. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2018. – Т. 165, № 2. – С. 220–223. Импакт-фактор РИНЦ 0,656.
2. Галектины-1,3 в механизмах рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в опухолевую ткань при раке желудка и толстого кишечника / Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Васильева О.А., Романова Е.В., Комар А.А., Литвинова Л.С., Полетика В.С., Чумакова С.П., Новицкий В.В. // **Вестник РАМН**. – 2019. – Т. 74, № 5. – С. 317–322. Импакт-фактор РИНЦ 1,070.
3. Роль галектина-1, -3 в механизмах дисрегуляции T-клеточного звена иммунного ответа при раке толстого кишечника / Полетика В.С., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Васильева О.А., Дмитриева А.И., Янкович К.И., Новицкий В.В., Рябова Л.М., Грищенко М.Ю. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 76–82. Импакт-фактор РИНЦ 0,643.
4. Взаимосвязь экспрессии галектинов-1,3 с клинико-морфологическими параметрами опухоли при раке толстого кишечника / Полетика В.С.,

Колобовникова Ю.В., Уразова О.И. // Сб. «Материалы международной научно-практической конференции (68-ой годичной) «Фундаментальные основы инновационного развития науки и образования», посвященной «Годам развития села, туризма и народных ремесел (2019-2021)», г. Душанбе, 27 ноября 2020. – Душанбе, 2020. – Т. 3. – С. 360–361.

5. Роль галектинов-1,3 в дизрегуляции Т-клеточного звена иммунного ответа при раке толстого кишечника / Полетика В.С., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Васильева О.А., Дмитриева А.И., Янкович К.И., Новицкий В.В. // Сб. «Материалы VI Петербургского международного онкологического форума «Белый ночи-2020», г. Санкт-Петербург, 25-28 июня 2020. – СПб., 2020. – С. 144.

6. Галектины-1,3 как факторы дизрегуляции Т-клеточного иммунитета при раке толстого кишечника / Полетика В.С., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Васильева О.А., Дмитриева А.И., Янкович К.И., Новицкий В.В. // **Злокачественные опухоли.** – 2020. – Т. 10, № 3s1. – С. 116–117. Импакт-фактор РИНЦ 0,673.

7. Роль циркулирующих галектинов-1,3 в развитии дисбаланса Т-клеточного иммунитета при раке толстого кишечника / Полетика В.С., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Васильева О.А., Романова Е.В., Новицкий В.В. // **Трансляционная медицина.** – 2020. – Приложение № 2. – С. 270. Импакт-фактор РИНЦ 0,340.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЦТЛ – цитотоксические лимфоциты

АРС – alyphycosuanin (аллофикоцианин)

CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

Foxp3 – forkhead box p3

IFN – interferon (интерферон)

IL – interkeukin (интерлейкин)

НК-клетки – natural killer cells (натуральные киллеры)

T-bet – T-box protein expressed in T cells (T-box белок, экспрессирующийся в Т-клетках)

TCR – T-cell receptor (Т-клеточный рецептор)

TGF – transforming growth factor (трансформирующий фактор роста)

Th – T-helpers (Т-лимфоциты-хелперы)

RORC2 – retinoic acid receptor-related orphan receptor C2 (родственный ретиноидным рецепторам орфанный рецептор C2)

VEGF – vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов)