

УДК 616.345-006.6:575.117:616.155.33
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-55-63>

Фенотипический профиль моноцитов крови и опухоль-ассоциированных макрофагов во взаимосвязи с экспрессией галектинов 1 и 3 при раке толстой кишки

Курносенко А.В.^{1,2}, Рейнгардт Г.В.^{1,2}, Полетика В.С.¹, Колобовникова Ю.В.¹,
Чумакова С.П.¹, Уразова О.И.¹, Грищенко М.Ю.^{1,2}, Чурина Е.Г.¹, Гамирова К.А.^{1,2}

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634055, г. Томск, Московский тракт, 2

² Томский областной онкологический диспансер (ТООД)
Россия, 634040, г. Томск, пр. Ленина, 115

РЕЗЮМЕ

Цель. Выявить особенности субпопуляционного состава моноцитов крови и макрофагов опухоли во взаимосвязи с плазменной концентрацией и внутриопухолевой экспрессией галектинов 1 и 3 у больных раком толстой кишки.

Материалы и методы. Обследованы 23 больных колоректальным раком (МКБ С18–20) – 5 мужчин и 18 женщин, средний возраст ($63,8 \pm 9,4$) лет. Группу контроля составили здоровые добровольцы, группу сравнения – пациенты с аденомами толстой кишки, сопоставимые по полу и возрасту. Материалом исследования являлись цельная кровь и биоптаты опухоли. Концентрацию галектинов 1 и 3 в крови определяли методом иммуноферментного анализа, содержание опухолевых галектин-1⁺ и галектин-3⁺ клеток – методом иммуногистохимии. Подсчет субпопуляций моноцитов крови выполняли методом проточной цитофлуориметрии, определение иммунофенотипов M1 (CD68⁺CD80⁺) и M2d (CD68⁺CD206⁺) макрофагов в опухолевой ткани – методом иммунофлуоресценции. Результаты исследования обрабатывали статистическими методами с применением программного пакета Jamovi 2.3.21 для Windows.

Результаты. У больных раком толстой кишки (РТК) установлена положительная связь между высокой плазменной концентрацией галектинов 1 и 3 и нарушением баланса моноцитов крови в виде снижения относительного содержания классических CD14⁺CD16[–] моноцитов и, напротив, увеличения численности неклассических CD14⁺CD16⁺⁺ и переходных CD14⁺CD16[–] клеток. Относительное количество M1 (CD68⁺CD80⁺) и M2d (CD68⁺CD206⁺) макрофагов в образцах тканей РТК оказалось сопоставимым и не зависело от уровня галектинов 1 и 3 в крови и опухоли. У пациентов с аденомами толстой кишки преобладала M2d-субпопуляция опухоль-ассоциированных макрофагов ($p = 0,031$).

Заключение. У больных РТК галектины 1 и 3 оказывают модулирующее влияние на соотношение неклассических CD14⁺CD16⁺⁺, переходных CD14⁺CD16[–] и классических CD14⁺CD16[–] моноцитов в крови и не влияют на формирование M1/M2d-экспрессионного профиля опухоль-ассоциированных макрофагов.

Ключевые слова: галектины, моноциты, макрофаги, рак толстой кишки, иммунофенотип

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом СибГМУ (протокол № 8881 от 29.11.2021).

✉ Курносенко Анна Васильевна, kurnosenko.av@ssmu.ru

Для цитирования: Курносенко А.В., Рейнгардт Г.В., Полетика В.С., Колобовникова Ю.В., Чумакова С.П., Уразова О.И., Грищенко М.Ю., Чурина Е.Г., Гамирова К.А. Фенотипический профиль моноцитов крови и опухоль-ассоциированных макрофагов во взаимосвязи с экспрессией галектинов 1 и 3 при раке толстой кишки. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(4):55–63. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-55-63>.

Phenotypic profile of blood monocytes and tumor-associated macrophages in relation to the expression of galectins 1 and 3 in colorectal cancer

Kurnosenko A.V.^{1,2}, Reingardt G.V.^{1,2}, Poletika V.S.¹, Kolobovnikova Yu.V.¹, Chumakova S.P.¹, Urazova O.I.¹, Grishchenko M.Yu.^{1,2}, Churina E.G.¹, Gamirova K.A.^{1,2}

¹ Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Tomsk Regional Cancer Center

115, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To identify the features of the subpopulation composition of blood monocytes and tumor macrophages in relation to the plasma concentration and intratumoral expression of galectins 1 and 3 in patients with colorectal cancer.

Materials and methods. A total of 23 patients with colorectal cancer (ICD C18-20) were examined – 5 men and 18 women (average age 63.8 ± 9.4 years). The control group consisted of healthy volunteers; the comparison group encompassed age- and sex-matched patients with colon adenomas. The study materials included whole blood and tumor biopsies. The concentration of galectins 1 and 3 in the blood was determined by enzyme-linked immunosorbent assay, the content of tumor galectin-1⁺ and galectin-3⁺ cells – by immunohistochemistry. Subpopulations of blood monocytes were evaluated by flow cytometry; the macrophage immunophenotypes M1 (CD68⁺CD80⁺) and M2d (CD68⁺CD206⁺) in tumor tissues were determined using immunofluorescence staining. Statistical processing of the research results was performed by the Jamovi 2.3.21 software package for Windows.

Results. In patients with colorectal cancer (CRC), a positive relationship was identified between high plasma concentrations of galectins 1 and 3 and an imbalance of blood monocytes manifested by a decrease in the relative count of classical CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes and, conversely, an increase in the number of non-classical CD14⁺CD16⁺⁺ and intermediate CD14⁺CD16⁻ cells. The relative numbers of M1 (CD68⁺CD80⁺) and M2d (CD68⁺CD206⁺) macrophages in CRC tissue samples turned out to be comparable and did not depend on the level of galectins 1 and 3 in the blood and tumor. In patients with colon adenomas, the M2d subpopulation of tumor-associated macrophages was predominant ($p = 0.031$).

Conclusion. In patients with CRC, galectins 1 and 3 have a modulating effect on the ratio of non-classical CD14⁺CD16⁺⁺, intermediate CD14⁺CD16⁻, and classical CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes in the blood and do not affect the M1/M2d expression profile of tumor-associated macrophages.

Keywords: galectins, monocytes, macrophages, colorectal cancer, immunophenotype

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol No. 8881 of 29.11.2021).

For citation: Kurnosenko A.V., Reingardt G.V., Poletika V.S., Kolobovnikova Yu.V., Chumakova S.P., Urazova O.I., Grishchenko M.Yu., Churina E.G., Gamirova K.A. Phenotypic profile of blood monocytes and tumor-associated macrophages in relation to the expression of galectins 1 and 3 in colorectal cancer. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(4):55–63. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-55-63>.

ВВЕДЕНИЕ

Рак толстой кишки (РТК) занимает одно из первых мест по уровню заболеваемости и смертности как в России, так и за ее пределами [1, 2]. Несмотря на значительные усилия, направленные на раннее выявление РТК и совершенствование методов лечения, до сих пор в половине случаев это заболевание на момент выявления имеет III–IV стадии. Одногодичная летальность также высока и составляет 19,2%, а пятилетняя выживаемость – 57%. Наблюдается прирост заболеваемости среди молодых людей [3].

Патогенез РТК основывается на взаимодействии опухолевых клеток с микроокружением опухоли (макрофагами, эндотелиальными и мезенхимальными прогениторными клетками, фибробластами и др.), опосредуемом многими регуляторными молекулами, в том числе галектинами – белками, связывающими β -галактозиды. Молекулы этого семейства характеризуются сходным по строению углевод-распознающим доменом и выполняют разнообразные функции как вне, так и внутри клетки [4–7]. Показано, что пул опухоль-ассоциированных макрофагов, супрессорных клеток миелоидного происхождения и отдельных дендритных клеток популяруется за счет моноцитов крови [8].

Цель исследования – выявить особенности субпопуляционного состава моноцитов крови и макрофагов опухоли во взаимосвязи с плазменной концентрацией и внутриопухолевой экспрессией галектинов 1 и 3 у больных РТК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 23 пациента с верифицированным раком толстой кишки (МКБ C18–20) – 5 мужчин и 18 женщин, средний возраст ($63,8 \pm 9,4$) лет, находившихся на диспансерном учете в Томском областном онкологическом диспансере (главный врач – канд. мед. наук, доцент М.Ю. Грищенко). Пациенты были разделены на группы в соответствии со стадией заболевания: в группу с I стадией вошли 4 человека, со II стадией – 9, с III – 5, с IV – 5 человек. В группу сравнения были включены пациенты с аденомами толстой кишки – 8 мужчин и 7 женщин, средний возраст ($60,7 \pm 10,4$) лет. В контрольную группу вошли 11 здоровых добровольцев (6 мужчин и 5 женщин в возрасте $61,5 \pm 9,7$ лет) из числа обратившихся в лечебное учреждение с целью профосмотра.

Критериями исключения пациентов из исследования служили: хронические воспалительные неинфекционные или инфекционные (в стадии обострения) и аутоиммунные или аллергические (без достижения контроля) заболевания, гнойные процессы, наличие

других злокачественных новообразований, противоопухолевая терапия (на момент проведения исследования и в анамнезе), а также отказ пациента от участия в эксперименте. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом СибГМУ (протокол № 8881 от 29.11.2021). Информацию о возрасте пациентов, диагнозе и локализации опухоли, стадии заболевания получали из медицинской документации.

Материалом исследования служили цельная венозная кровь и биоптаты опухолей (злокачественных и доброкачественных) толстой кишки. Концентрацию галектина-1 и галектина-3 в плазме крови измеряли методом иммуноферментного анализа с применением тест-систем BosterBio (США). Экспрессию галектинов в опухолевых биоптатах определяли методом иммуногистохимии по стандартной методике. Подсчет численности субпопуляций моноцитов осуществляли методом проточной цитофлуориметрии на анализаторе Accuri BD (США) с применением антител к кластерам клеточной дифференцировки CD14, меченных фикоэритрином, и CD16, меченных FITC.

Пробоподготовка заключалась в лизисе эритроцитов, отмывании лейкоцитов, внесении в клеточную суспензию меченных флуорохромами антител согласно инструкции производителя, инкубировании раствора и внесении окрашивающего буфера Stain Buffer. Подсчет численности каждой субпопуляции моноцитов производили, исходя из способности клеток экспрессировать на поверхностной мембране CD14 и CD16. Моноциты, экспрессирующие CD14⁺CD16⁺⁺, относили к группе неклассических, CD14⁺CD16⁻ – классических и CD14⁺⁺CD16⁺ – промежуточных клеток.

Для установления колокализации маркеров CD68, CD206 и CD80 на поверхности макрофагов было выполнено тройное иммунофлуоресцентное окрашивание парафиновых срезов (по стандартной методике) с последующей конфокальной микроскопией. Иммунофлуоресцентную окраску проводили с использованием первичных антител: моноклональные мышиные анти-CD68 (Novus Biologicals, NBP2 445-39, клон KP1, рабочее разведение 1 : 200, США), поликлональные кроличьи анти-CD80 (Abcam, ab64116, рабочее разведение 1 : 70, США), поликлональные козы анти-CD206 (R&D Systems, AF2634, рабочее разведение 1 : 40, США). Использовали следующие комбинации вторичных антител: анти-мышиные AlexaFluor488-меченные, анти-кроличьи AlexaFluor555-меченные, анти-козы AlexaFluor647-меченные (рабочее разведение всех вторичных антител 1 : 400). При окрашивании ядер

использовали флуоресцентный ядерный краситель DAPI (ab104135, Abcam, США) для последующей их визуализации на конфокальном микроскопе Carl

Zeiss LSM 780 NLO (Германия). Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения Black Zen и Qupath 0.4.4 (рис. 1).

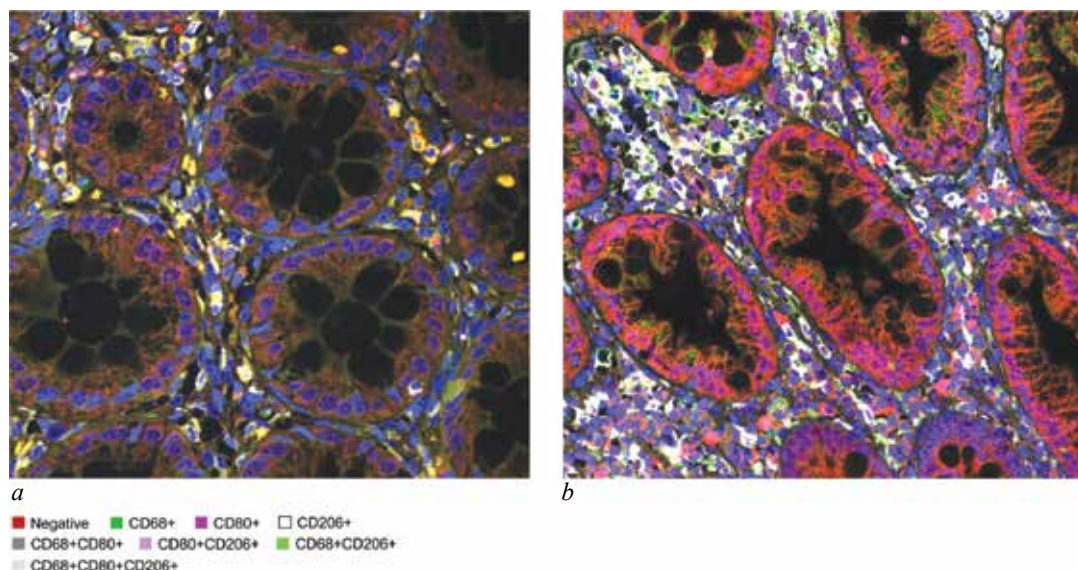


Рис. 1. Образец иммунофлуоресцентного окрашивания парафиновых срезов: *a* – рак толстой кишки, *b* – аденома толстой кишки

Использовали комбинации антител CD68/CD206/CD80. На основании данных об экспрессии указанных маркеров макрофаги, экспрессирующие CD68⁺CD80⁺, обозначали как клетки с иммунофенотипом M1, CD68⁺CD206⁺ – с иммунофенотипом M2d. Поскольку CD68 является общим маркером для макрофагов [9], первоначально оценивали количество CD68-позитивных клеток в процентном выражении от всех клеток стромы и далее определяли относительное количество CD68⁺CD206⁺ и CD68⁺CD80⁺ клеток.

Статистическая обработка результатов исследования выполнена в программном пакете Jamovi 2.3.21 для Windows. Для проверки нормальности распределения изученных параметров использовались критерии Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка. Для оценки статистической значимости различий количественных показателей между исследуемыми выборками использовали *U*-критерий Манна – Уитни. Для выявления взаимосвязей между двумя количественными показателями вычисляли ранговый коэффициент корреляции Спирмена (r_s). Результаты считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По данным ранее проведенного нами исследования [10], содержание клеток, экспрессирующих галектин-1, в опухолевой ткани у пациентов с РТК было выше, чем в группе сравнения: 33,5 (27,0;

55,0)% при РТК и 11,0 (5,0; 21,0)% при аденомах ($p < 0,001$). Концентрация галектинов 1 и 3 в периферической крови при РТК также была выше, чем у пациентов с доброкачественными опухолями толстой кишки и здоровыми донорами в 2,5 и 6,6 раза соответственно ($p < 0,001$). Установлена положительная корреляционная связь между концентрацией галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической крови ($r_s = 0,843$; $p < 0,01$).

В ходе изучения субпопуляционного состава моноцитов крови у пациентов с РТК были обнаружены статистически значимые различия в количестве классических, промежуточных и неклассических моноцитов между исследуемыми группами (табл. 1). В то же время общее количество лейкоцитов ($p = 0,201$) и моноцитов ($p = 0,673$) в крови оказалось сопоставимым.

Таблица 1

Субпопуляционный состав моноцитов крови у больных раком толстой кишки, <i>Me (Q₁; Q₃)</i>		
Субпопуляции моноцитов, %	Больные раком толстой кишки	Здоровые доноры
Классические CD14 ⁺ CD16 ⁻	75,53 (71,41; 78,12)	88,66 (86,06; 93,29)
	$p < 0,001$	
Промежуточные CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	8,76 (6,19; 10,53)	1,87 (0,93; 2,6)
	$p < 0,001$	
Неклассические CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	15,08 (11,80; 19,91)	4,09 (1,26; 5,51)
	$p < 0,001$	

Увеличение числа неклассических $CD14^{+}CD16^{+}$ моноцитов имело прямую сильную связь с уровнем галектина-1 ($rs = 0,557$) и галектина-3 ($rs = 0,780$) в плазме крови. Аналогичная взаимосвязь прослеживалась и в отношении численности промежуточных $CD14^{++}CD16^{+}$ моноцитов: отмечалась прямая сильная корреляция с концентрацией галектина-1 ($rs = 0,618$) и галектина-3 ($rs = 0,617$) в плазме крови.

Таким образом, у больных РТК в целом отмечалось возрастание количества $CD16$ -положительных моноцитов в крови по сравнению с группой здоровых добровольцев. При этом была установлена прямая сильная корреляция численности неклассической субпопуляции моноцитов с низкой степенью дифференцировки опухоли (G3), т.е. с большим потенциалом ее злокачественности. В качестве реципрокного изменения выявлялась обратная сильная связь между численностью классических моноцитов ($CD14^{+}CD16^{-}$) в крови и степенью дифференцировки опухоли ($rs = -0,469$; $p < 0,01$), содержанием галектина-1 ($rs = -0,663$; $p < 0,001$) и галектина-3 ($rs = -0,804$; $p < 0,001$) в плазме крови.

По результатам анализа субпопуляционного состава макрофагов в биоптатах опухолей у пациентов

с РТК и аденомами толстого кишечника межгрупповых различий по содержанию опухоль-ассоциированных $CD68^{+}CD80^{+}$ макрофагов (с фенотипом M1) не было выявлено. Количество $CD68^{+}CD206^{+}$ -экспрессирующих клеток (макрофагов с фенотипом M2d) у пациентов с раком толстой кишки оказалось в 1,9 раза ниже, чем у пациентов с аденомами (табл. 2). При этом у пациентов с аденомами толстой кишки в ткани опухоли отмечалось относительное преобладание M2d-субпопуляции макрофагов ($p = 0,030$), в то время как при РТК соотношение опухоль-ассоциированных M1- и M2d-макрофагов было сопоставимым.

Таблица 2

Субпопуляционный состав макрофагов в опухолевой ткани у пациентов с раком толстой кишки, $Me (Q_1; Q_3)$		
Иммунофенотип макрофагов, %	Рак толстой кишки	Аденомы толстой кишки
M1 ($CD68^{+}CD80^{+}$)	4,34 (1,80; 6,74)	4,26 (1,19; 6,53)
	$p = 0,454$	
M2d ($CD68^{+}CD206^{+}$)	3,21 (2,01; 4,79)	6,10 (3,97; 7,71)
	$p = 0,031$	

Пример изображения, полученного при окрашивании образцов опухолевой ткани, показан на рис. 2.

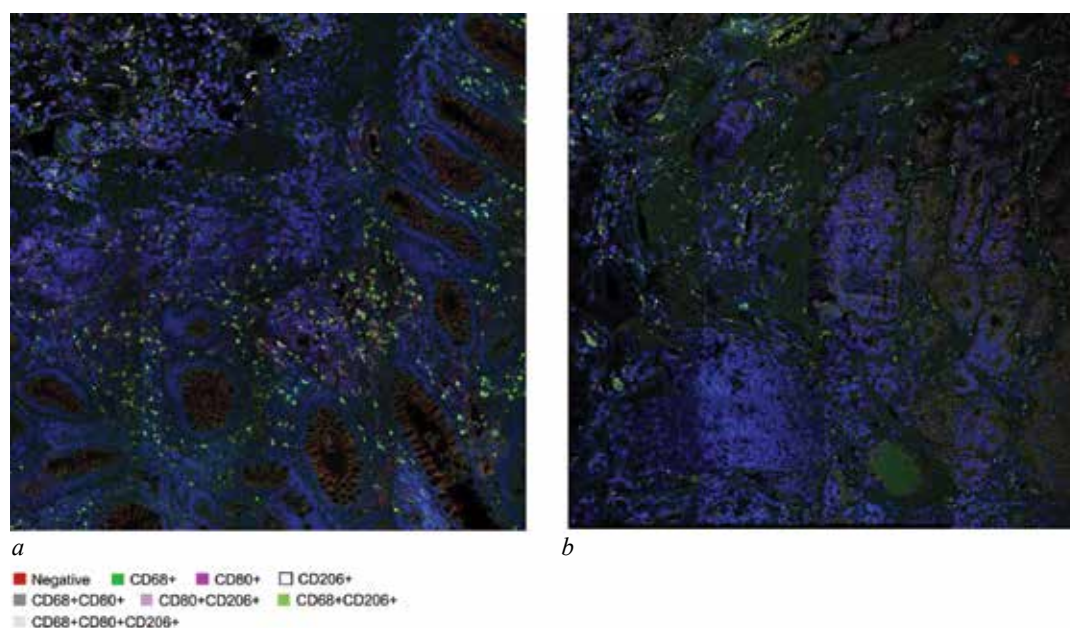


Рис. 2. Образец иммунофлюоресцентного окрашивания парафинового среза: *a* – при исследовании ткани аденомы: относительное количество M2-макрофагов ($CD68^{+}CD206^{+}$) – 2,6%, M1 ($CD68^{+}CD80^{+}$) – 5,4%; *b* – при исследовании ткани аденокарциномы: относительное количество M2d-макрофагов ($CD68^{+}CD206^{+}$) – 6%, M1 ($CD68^{+}CD80^{+}$) – 0,55%»

По результатам корреляционного анализа M1/M2-экспрессионного профиля опухоль-ассоциированных макрофагов и содержания галектинов 1 и 3 в периферической крови и опухолевой ткани статистически значимых взаимосвязей установлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Галектины – семейство белков, экспрессируемых многими клетками, в том числе клетками самой опухоли [11]. Среди лектинов, вовлеченных в патогенез опухолевого процесса, особое внимание уделяется

галектину-1 и галектину-3 [12, 13]. Эти молекулы не только влияют на свойства самих опухолевых клеток, такие как способность к делению и метастазированию (отрыву от первичной опухоли, агрегации, адгезии, интра- и экстравазации, миграции и инвазии), программируемая клеточная смерть [14], но и участвуют во взаимодействии опухоли с иммунокомпетентными клетками по типу иммуносупрессии, что способствует «ускользанию» опухоли от факторов иммунного надзора [4]. Механизм этого эффекта заключается в связывании галектинов с CD-рецепторами на лейкоцитах, что регулирует поляризацию созревания, активацию и апоптоз этих клеток [15, 16]. В отношении макрофагального звена иммунной системы галектины 1 и 3 обладают преимущественно противовоспалительным и толерогенным (супрессивным) действием, направляя специализацию макрофагов по альтернативному пути M2 [17, 18]. Дифференцированные таким образом макрофаги, в свою очередь, сами активно синтезируют галектин-1 и галектин-3, в то время как классические M1-макрофаги, напротив, характеризуются низким уровнем экспрессии данных лектинов [19].

По сведениям Н.Н. Сарбаевой (2016), выделение двух полярных субпопуляций M1 и M2 не в полной мере характеризует разнообразие иммунофенотипов макрофагов ввиду их пластичности [20]. Макрофаги с противовоспалительным фенотипом M2 классифицируются на субпопуляции M2a, M2b, M2c и M2d. Основанием для такого рода различий между клетками служит набор экспрессируемых ими внутриклеточных и мембранных молекул (транскрипционных факторов, кластеров дифференцировки, рецепторов к цитокинам и хемокинам и др.), секретируемых цитокинов (преимущественно интерлейкина (IL) 10 и трансформирующего фактора роста β (TGF β)) и функций (фагоцитоз, активация роста клеток и процессов регенерации, поддержание гомеостаза тканей, поляризация иммунного ответа по пути Th2 (гуморальных) или Th17 (аутоиммунных) реакций, или Treg-опосредованной иммуносупрессии, и др.). В соответствии с данными литературы, макрофаги, экспрессирующие маркеры CD68 и CD206 (т.е. имеющие M2d-фенотип), способствуют опухолевому росту, ангиогенезу (в том числе васкуляризации опухолевых образований посредством продукции проангиогенных медиаторов) и ремоделированию экстрацеллюлярного матрикса [21, 22].

Галектины 1 и 3 служат хемоаттрактантами для вновь рекрутируемых в опухолевый очаг моноцитов, тем самым формируется порочный круг, что способствует прогрессии новообразования [17, 23]. Есть данные о том, что галектин-1 способствует M2-поля-

ризации макрофагов, регулируя метаболизм аргинина и снижая выработку оксида азота [24].

По результатам проведенного исследования, у пациентов с РТК обнаруживалась незначительная тенденция к увеличению процентного количества M1-активированных макрофагов по сравнению с таковым у больных аденомами толстой кишки. Данный результат, по-видимому, обусловлен участием процесса воспаления в механизмах злокачественного роста опухоли. Известно, что воспаление может как предшествовать развитию колит-ассоциированного РТК, так и сопровождать формирование и прогрессию опухоли, не имеющей связи с колитом. Сформировавшаяся на фоне хронического воспаления опухоль толстой кишки морфологически характеризуется выраженной инфильтрацией иммунокомпетентными клетками, которые, в свою очередь, являются источниками про- и противотуморогенных и воспалительных цитокинов [25].

При доброкачественном процессе (аденоме) толстой кишки нами был установлен, напротив, дисбаланс соотношения M1/M2-макрофагов по пути доминирования M2d-субпопуляции, что, по мнению многих авторов, характерно в большей степени для злокачественных новообразований [26–28]. Интерпретируя полученные результаты, следует отметить, что в большинстве работ авторы определяют иммунофенотип опухоль-ассоциированных макрофагов в сравнении с образцами здоровых тканей. В нашем исследовании мы оценивали соотношение M1- и M2-макрофагов при РТК по сравнению с их численностью у пациентов с аденомами толстой кишки.

Следует отметить, что разделение макрофагов на полярные субпопуляции – M1 и M2 в большей степени соответствует условиям *in vitro* и не отражает в полной мере гетерогенность популяции этих клеток *in vivo*. Маркеры, определяющие иммунофенотипы M1 и M2, могут быть одновременно экспрессированы на одной клетке. Так, макрофаги кожных ран человека наряду с цитокинами, характерными для M1, синтезируют IL-10, а также несут на своей мембране CD206, CD163, CD36 и рецептор к IL-4 [29]. Описана вероятность прямой и обратной трансформации иммунофенотипов M1 и M2 при изменении спектра секретируемых цитокинов и эффероцитоза (процесса «захоронения мертвых клеток» – удаления апоптотических клеток путем фагоцитоза) [30, 31].

Вместе с тем следует констатировать отсутствие стандартизированных методов количественной оценки макрофагов и существенные различия в протоколах их иммунофлуоресцентного типирования [32]. Для оценки субпопуляционного состава макрофагов исследователи используют различные сочетания по-

верхностных маркеров [33–35] ввиду отсутствия высокоспецифичных факторов. В нашем исследовании для нивелирования субъективного компонента оценки мы применяли программное обеспечение QuPath, позволяющее автоматизировать подсчет клеток или исключить «опухолевую» составляющую из анализа и оценить только клетки микроокружения опухоли.

Известно, что пул опухоль-ассоциированных макрофагов, иммуносупрессорных клеток миелоидного происхождения, иммуногенных и толерогенных дендритных клеток пополняется путем миграции в ткани моноцитов, имеющих костномозговое происхождение. При этом влияние опухоли на моноциты может проявляться не только в опухолевом очаге, но и непосредственно на уровне их предшественников в костном мозге или селезенке. В свою очередь, сами моноциты вырабатывают цитокины и хемокины, тем самым принимая участие в рекрутировании новых клеток иммунной системы в опухолевый очаг и поддерживая процесс воспаления [8].

По мнению одних исследователей, свойства макрофагов ткани определяются статусом моноцитов крови, другие заявляют о неоднозначной роли моноцитов в формировании иммунофенотипов макрофагов [8, 30], а дифференцировка зависит от взаимодействия клеток с элементами микроокружения и опосредовано факторами роста, компонентами внеклеточного матрикса и др. [23]. Галектин-1 является индуктором хемотаксиса моноцитов и может модулировать экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости и рецепторов типа FcγRI, опосредующих фагоцитоз [28].

В настоящем исследовании было выдвинуто предположение о том, что галектины 1 и 3 способны оказывать влияние на направление дифференцировки моноцитов как предшественников опухоль-ассоциированных макрофагов. Согласно полученным нами результатам, у пациентов с раком толстого кишечника регистрировалось снижение содержания классической субпопуляции моноцитов в крови, в то время как число клеток с альтернативными иммунофенотипами – неклассическим и переходным – было повышенным.

Согласно данным литературы, увеличение количества циркулирующих неклассических CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитов может быть связано с их специфической функцией в отношении синтеза факторов роста, а промежуточных CD14⁺⁺CD16⁺ моноцитов – с продукцией фактора некроза опухоли альфа (TNFα), который выступает в качестве медиатора опухоль-ассоциированного воспаления [29]. Установленная в нашем исследовании положительная связь между высоким содержанием галектина-1

и галектина-3 и увеличением числа неклассических CD14⁺CD16⁺⁺ и промежуточных CD14⁺⁺CD16⁺ моноцитов в крови свидетельствует о вероятном влиянии данных лектинов на формирование субпопуляций моноцитов в направлении CD16-позитивных клеток.

Полученные нами результаты не были связаны с клинико-морфологическими параметрами опухоли, полом и возрастом пациентов. Мы полагаем, что это объясняется изменчивостью течения основного заболевания и многообразием его клинических проявлений, которые зависят от расположения первичного опухолевого узла, характера роста новообразования, наличия осложнений, степени выраженности связанных с воспалением проявлений альтерации, сопровождающих опухолевый процесс, и других факторов.

Отсутствие взаимосвязи между содержанием галектинов 1 и 3 в крови и в опухоли с M1/M2-экспрессионным профилем опухоль-ассоциированных макрофагов у больных раком толстого кишечника, с одной стороны, указывает на то, что галактозид-связывающие белки не обладают значимым дистантным и локальным влиянием на созревание и функциональную специализацию тканевых макрофагов. С другой стороны, это может быть связано с недостаточным объемом выборки, что требует дальнейших более детальных исследований с увеличением количества выборочных данных и расширением спектра тестируемых регуляторных биомолекул, способных поляризовать дифференцировку миелоидных клеток в опухолевом микроокружении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено галектин-1,3-зависимое изменение субпопуляционного состава моноцитов вследствие снижения числа классических CD14⁺⁺CD16⁻ клеток и увеличения количества неклассических CD14⁺CD16⁺⁺ и переходных CD14⁺CD16⁻ клеток в периферической крови у больных раком толстой кишки. При этом избыточное содержание галектин-1-экспрессирующих клеток в опухолевой ткани и высокая концентрация галектинов 1 и 3 в плазме крови не влияют на соотношение M1 (CD68⁺CD80⁺) и M2d (CD68⁺CD206⁺) опухоль-ассоциированных макрофагов.

Детальное изучение иммунорегуляторного действия галектинов на отдельные субпопуляции моноцитов крови и тканевых макрофагов открывает перспективы использования данных лектинов в качестве новых биомаркеров РТК и молекулярных мишеней для инновационных методов таргетной и иммунной (путем перепрограммирования клеток опухолевого микроокружения) терапии злокачественных новообразований толстой кишки.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021;71(3):209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
2. Siegel R.L., Wagle N.S., Cercek A., Smith R.A., Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA Cancer J. Clin.* 2023;73(3):233–254. DOI: 10.3322/caac.21772.
3. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2022:239.
4. Чердынцева Н.В., Митрофанова И.В., Булдаков М.А., Стахеева М.Н., Патышева М.Р., Завьялова М.В. и др. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии. *Бюллетень сибирской медицины.* 2017;16(4):61–74.
5. Chou F.C., Chen H.Y., Kuo C.C., Sytwu H.K. Role of galectins in tumors and in clinical immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(2):430. DOI: 10.3390/ijms19020430.
6. Orozco C.A., Martinez-Bosch N., Guerrero P.E., Vinaixa J., Dalotto-Moreno T., Iglesias M. et al. Targeting galectin-1 inhibits pancreatic cancer progression by modulating tumor-stroma crosstalk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(16):e3769–778. DOI: 10.1073/pnas.1722434115.
7. Lin Y.H., Qiu D.C., Chang W.H., Yeh Y.Q., Jeng U.S., Liu F.T. et al. The intrinsically disordered N-terminal domain of galectin-3 dynamically mediates multisite self-association of the protein through fuzzy interactions. *J. Biol. Chem.* 2017;292(43):17845–17856. DOI: 10.1074/jbc.M117.802793.
8. Патышева М.Р., Стахеева М.Н., Ларионова И.В., Тарабановская Н.А., Григорьева Е.С., Слонимская Е.М. и др. Моноциты при злокачественных новообразованиях: перспективы и точки приложения для диагностики и терапии. *Бюллетень сибирской медицины.* 2019;18(1):60–75. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-1-60-75.
9. Zwager M.C., Bense R., Waaijer S., Qiu S.Q., Timmer-Bosscha H., de Vries E.G.E. et al. Assessing the role of tumour-associated macrophage subsets in breast cancer subtypes using digital image analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2023;198(1):11–22. DOI: 10.1007/s10549-022-06859-y.
10. Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Полетика В.С., Рейнгардт Г.В., Романова Е.В., Курносенко А.В., и др. Особенности экспрессии галектинов 1 и 3 при раке толстого кишечника во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами опухоли. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2021;6(4):45–53.
11. Ge X.N., Ha S.G., Liu F.T., Rao S.P., Sriramaraio P. Eosinophil-expressed galectin-3 regulates cell trafficking and migration. *Front. Pharmacol.* 2013;4:37. DOI: 10.3389/fphar.2013.00037.
12. Cornejo-García J.A., Romano A., Guéant-Rodríguez R.M., Oussalah A., Blanca-López N., Gaeta F. et al. A non-synonymous polymorphism in galectin-3 lectin domain is associated with allergic reactions to beta-lactam antibiotics. *Pharmacogenomics J.* 2016;16(1):79–82. DOI: 10.1038/tpj.2015.24.
13. Chetry M., Thapa S., Hu X., Song Y., Zhang J., Zhu H. et al. The role of galectins in tumor progression, treatment and prognosis of gynecological cancers. *J. Cancer.* 2018;9(24):4742–4755. DOI: 10.7150/jca.23628.
14. Ito K., Stannard K., Gabutero E., Clark A.M., Neo S.Y., Onturk S. et al. Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(3–4):763–778. DOI: 10.1007/s10555-012-9388-2.
15. Iqbal A.J., Sampaio A.L.F., Maione F., Greco K.V., Niki T., Hirashima M. et al. Endogenous galectin-1 and acute inflammation: emerging notion of a galectin-9 pro-resolving effect. *Am. J. Pathol.* 2011;178(3):1201–1209. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.073.
16. Rabinovich G.A., Conejo-García J.R. Shaping the immune landscape in cancer by galectin-driven regulatory pathways. *J. Mol. Biol.* 2016;428(16):3266–3281. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.03.021.
17. Якушина В.Д., Васильева О.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Савельева О.Е., Прохоренко Т.С. и др. Галектин-1: роль в формировании особенностей врожденного и приобретенного иммунитета. *Медицинская иммунология.* 2012;14(1-2):21–32. DOI: 10.15789/1563-0625-2012-1-2-21-32.
18. Kianoush F., Nematollahi M., Waterfield J.D., Brunette D.M. Regulation of RAW264.7 macrophage polarization on smooth and rough surface topographies by galectin-3. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2017;105(9):2499–2509. DOI: 10.1002/jbm.a.36107.
19. Novak R., Dabelic S., Dumić J. Galectin-1 and galectin-3 expression profiles in classically and alternatively activated human macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1820(9):1383–1390. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.11.014.
20. Dragomir A.C.D., Sun R., Choi H., Laskin J.D., Laskin D.L. Role of galectin-3 in classical and alternative macrophage activation in the liver following acetaminophen intoxication. *J. Immunol.* 2012;189(12):5934–5941. DOI: 10.4049/jimmunol.1201851.
21. Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Милякова М.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами. *Гены и клетки.* 2016;11(1):9–17. DOI: 10.23868/gc120550.
22. Капитанова К.С., Науменко В.А., Гаранина А.С., Мельников П.А., Абакумов М.А., Алиева И.Б. Перспективы использования наночастиц для репрограммирования опухолевых макрофагов в иммунотерапии злокачественных новообразований. *Биохимия.* 2019;84(7):934–952. DOI: 10.1134/S0320972519070054.
23. Жгулева А.С., Зементова М.С., Сельков С.А., Соколов Д.И. Макрофаги M1/M2: происхождение, фенотип, способы получения, взаимодействие с естественными киллерами и трофобластом. *Медицинская иммунология.* 2024;26(3):425–448. DOI: 10.15789/1563-0625-ММО-2877.
24. Correa S.G., Sotomayor C.E., Aoki M.P., Maldonado C.A., Rabinovich G.A. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology.* 2003;13(2):119–128. DOI: 10.1093/glycob/cwg010.
25. Грачев А.Н., Самойлова Д.В., Рашидова М.А., Петренко А.А., Ковалева О.В. Макрофаги, ассоциированные с

- опухолью: современное состояние исследований и перспективы клинического использования. *Успехи молекулярной онкологии*. 2018;5(4):20–28.
26. Barrionuevo P., Beigier-Bompadre M., Ilarregui J.M., Toscano M.A., Bianco G.A., Isturiz M.A. et al. A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. *J. Immunol.* 2007;178(1):436–445. DOI: 10.4049/jimmunol.178.1.436.
 27. Baran B., Bechthold I., Siedlar M., Szpak K., Mytar B., Sroka J. et al. Blood monocytes stimulate migration of human pancreatic carcinoma cells *in vitro*: the role of tumour necrosis factor- α . *Eur. J. Cell Biol.* 2009;88(12):743–752. DOI: 10.1016/j.ejcb.2009.08.002.
 28. Wu K., Lin K., Li X., Yuan X., Xu P., Ni P. et al. Redefining tumor-associated macrophage subpopulations and functions in the tumor microenvironment. *Front. Immunol.* 2020;11:1731. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01731.
 29. Sindrilaru A., Peters T., Wieschalka S., Baican C., Baican A., Peter H. et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 2011;121(3):985–997. DOI: 10.1172/JCI44490.
 30. Gong D., Shi W., Yi S., Chen H., Groffen J., Heisterkamp N. TGF β signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol.* 2012;13:31. DOI: 10.1186/1471-2172-13-31.
 31. Bill R., Wirapati P., Messemaker M., Roh W., Zitti B., Duval F. et al. CXCL9:SPP1 macrophage polarity identifies a network of cellular programs that control human cancers. *Science*. 2023;381(6657):515–524. DOI: 10.1126/science.ade2292.
 32. Jayasingam S.D., Citartan M., Thang T.H., Mat Zin A.A., Ang K.C., Ch'ng E.S. Evaluating the polarization of tumor-associated macrophages into M1 and M2 phenotypes in human cancer tissue: technicalities and challenges in routine clinical practice. *Front. Oncol.* 2020;24(9):1512. DOI: 10.3389/fonc.2019.01512.
 33. Dunstan R.W., Wharton K.A., Quigley C., Lowe A. The use of immunohistochemistry for biomarker assessment – can it compete with other technologies? *Toxicol. Pathol.* 2011;39(6):988–1002. DOI: 10.1177/0192623311419163.
 34. Da C., Mc K., Va M., An O., Yv B. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab. Invest.* 2017;97(1):4–13. DOI: 10.1038/labinvest.2016.116.
 35. Fan W., Yang X., Huang F., Tong X., Zhu L. The Second Clinical Medical College ZCMU. Identification of CD206 as a potential biomarker of cancer stem-like cells and therapeutic agent in liver cancer. *Oncology Letters*. 2019;18(3):3218–3226. DOI: 10.3892/ol.2019.10673.

Вклад авторов

Курносенко А.В., Рейнгардт Г.В., Гамирова К.А. – проведение исследований, анализ и интерпретация данных. Полетика В.С., Грищенко М.Ю., Чурина Е.Г. – разработка концепции и дизайна исследования, обоснование цели, основных положений и заключения рукописи. Колобовникова Ю.В., Чумакова С.П., Уразова О.И. – проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации. Все члены группы отвечают критериям и требованиям для авторов.

Информация об авторах

Курносенко Анна Васильевна – аспирант, кафедра патофизиологии, СибГМУ; врач-онколог, ТООД, г. Томск, kurnosenko.av@ssmu.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3210-0298>

Рейнгардт Глеб Вадимович – ассистент, кафедра патофизиологии, СибГМУ; врач-онколог, ТООД, г. Томск, glebreynardt@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-3148-0900>

Полетика Вадим Сергеевич – канд. мед. наук, доцент кафедры патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, vpoletika@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2005-305X>

Колобовникова Юлия Владимировна – д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой нормальной физиологии, профессор кафедры патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, kolobovnikova.julia@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-7156-2471>

Чумакова Светлана Петровна – д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ, г. Томск, chumakova_s@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3468-6154>

Уразова Ольга Ивановна – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, urazova.oi@ssmu.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9457-8879>

Грищенко Максим Юрьевич – канд. мед. наук, доцент, зав. кафедрой хирургии с курсом мобилизационной подготовки и медицины катастроф, СибГМУ; гл. врач, ТООД, г. Томск, grischenko.mj@ssmu.ru, <http://orcid.org/0000-0002-0961-7336>

Чурина Елена Георгиевна – д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, lena1236@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8509-9921>

Гамирова Кристина Анатольевна – аспирант, кафедра организации здравоохранения и общественного здоровья, СибГМУ; врач-онколог, ТООД, г. Томск, k.a.gamirova@tomonco.ru, <http://orcid.org/0009-0007-7947-360X>

(✉) Курносенко Анна Васильевна, kurnosenko.av@ssmu.ru

Поступила в редакцию 19.07.2024;
одобрена после рецензирования 09.08.2024;
принята к публикации 12.09.2024