

На правах рукописи

Курносенко Анна Васильевна

**РОЛЬ ГАЛЕКТИНОВ 1 И 3 В МЕХАНИЗМАХ ФОРМИРОВАНИЯ
ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ
МОНОЦИТОВ/МАКРОФАГОВ И НЕОАНГИОГЕНЕЗЕ
ПРИ РАКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ**

3.3.3. Патологическая физиология
1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2025

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент

Колобовникова
Юлия Владимировна

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Уразова
Ольга Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией молекулярно-клеточной
физиологии и патологии
НИИ медицинских проблем Севера –
обособленного подразделения
ФИЦ КНЦ СО РАН

Савченко
Андрей Анатольевич

доктор медицинских наук, доцент, директор
Центра иммунологии и клеточных биотехнологий
Образовательно-научного кластера
«Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)»
ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта»

Литвинова
Лариса Сергеевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» ____ 2025 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.068.01 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 « ____ » _____ 2025 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Рак толстой кишки (РТК) занимает одно из ведущих мест по уровню заболеваемости и смертности в России и мире [Sung H. et al., 2021; Rebecca L. et al., 2023; Каприн А.Д., 2024]. Ключевую роль в патогенезе опухолевой прогрессии играет опухолевое микроокружение (Tumor Microenvironment – TME), сформированное посредством перекрестного взаимодействия злокачественно трансформированных клеток и «здоровых клеток» [Airoldi I. et al., 2015; Birbrair A., 2020].

Примером регуляторных молекул, обеспечивающих взаимодействие элементов TME с опухолевыми клетками, являются галектины 1-го и 3-го типов – бета-галактозид-связывающие лектины [Ge X.N. et al., 2013; Johannes L., 2018]. В основе механизма действия галектинов лежит их способность связываться с гликозилированными рецепторами на поверхности клеточных мембран, что влияет на сродство мембранных рецепторов к их лигандам, интернализацию рецепторных структур и передачу сигнала внутрь клетки [Thiemann S., 2016; Nambiar D., 2019]. Известно, что галектины способны проявлять противовоспалительную и толерогенную активность в отношении макрофагов и индуцировать их дифференцировку по альтернативному M2-пути [Chou F. et al., 2018]. Макрофаги с иммунофенотипом M2 составляют основную массу опухоли-ассоциированных макрофагов с «проопухолевым потенциалом» [Chou F. et al., 2018]. Макрофаги, дифференцированные по альтернативному пути, сами активно синтезируют галектин-1 и галектин-3, тогда как классические M1-активированные макрофаги, напротив, характеризуются низким уровнем экспрессии данных лектинов [Novak R. et al., 2012]. Изменение фенотипа макрофагов TME может обеспечивать ускользание опухоли из-под иммунологического надзора [Чердынцева Н.В. и соавт., 2017].

Макрофаги в составе TME имеют в основном гемическое (моноцитарное) происхождение. $CD14^{++}CD16^{-}$ классические и $CD14^{++}CD16^{+}$ промежуточные моноциты характеризуются провоспалительными свойствами, а $CD14^{+}CD16^{++}$ неклассические моноциты обеспечивают репаративную функцию в отношении эндотелия [Anthony S., 2014; Zhang R. et al., 2024]. Моноциты и макрофаги могут принимать участие в реализации механизмов ангиогенеза [Anthony S., 2014; Zhang R. et al., 2024].

Ключевым фактором ангиогенеза является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor – VEGF) [Yun L. et al., 2022]. VEGF-опосредованное усиление опухолевого неоангиогенеза предрасполагает к формированию метастазов и прогрессии опухоли [Bertolini F. et al., 2006; Melincovici C. et al., 2018]. Подобно VEGF-зависимой стимуляции неоангиогенеза, передача внутриклеточного сигнала возможна при активации рецепторов к эпидермальному фактору роста (epidermal growth factor receptor – EGFR), который регулирует процессы пролиферации, дифференцировки и миграции опухолевых клеток [Wang Z., 2017; Sabbah A. et al., 2020].

Функциональная неполноценность вновь образованных сосудов в ткани опухоли сопровождается развитием эндотелиальной дисфункции, патогномичным маркером которой является увеличение содержания десквамированных эндотелиоцитов с фенотипом CD45⁻CD146⁺ в периферической крови [Малютина Н.Н. и соавт., 2012; Kovalenko L., 2014].

В целом, эффекты галектина-1 и галектина-3 в отношении клеток врожденного иммунитета, факторов неоангиогенеза и дисфункции эндотелия и значение галектинов в механизмах прогрессии опухолевых заболеваний остаются не до конца ясными.

Степень разработанности темы

Интерес к изучению галектинов в патогенезе опухолевого роста определяется существенным объемом сведений о структуре и функциях данных белков [Hittlet A. et al., 2003; Uhlén M. et al., 2005; Watanabe M. et al., 2008; Козич Ж.М. и соавт., 2020]. Известно, что галектины способны модулировать взаимодействие мембранных рецепторов с цитокинами, хемокинами и ростовыми факторами [Thiemann S., 2016; Nambiar D., 2019]. По данным S. Pinho (2015), галектин-1 играет важную роль в регуляции основных свойств злокачественной клетки, способствуя ее трансформации и выживанию. Другие авторы демонстрируют способность галектинов регулировать кооперативное взаимодействие компонентов опухолевого микроокружения (ТМЕ) [Xiao Y. et al., 2020; Wang H. et al., 2021]. В исследованиях F. Chou et al. (2018) показано, что галектины 1-го и 3-го типов инициируют дифференцировку макрофагов в направлении M2-иммунофенотипа. Согласно современным представлениям, галектин-1 и галектин-3 функционируют не только как хемоаттрактанты для опухолеассоциированных макрофагов, но и модулируют экспрессию ростовых факторов (EGF и VEGF) и их рецепторов [Markowska A. et al., 2010], а также проявляют самостоятельную проангиогенную активность [Etulain J. et al., 2014]. Известно, что EGF и VEGF играют ключевую роль в индукции пролиферации опухолевых клеток, инвазии опухоли и неоангиогенезе [Bertolini F. et al., 2006; Zhang R. et al., 2024].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в изучении молекулярных механизмов канцерогенеза, недостаточно исследованными остаются отдельные аспекты синергического взаимодействия галектина-1 и галектина-3 с проангиогенными ростовыми факторами EGF и VEGF в регуляции функций иммунокомпетентных клеток ТМЕ. Отсутствуют данные о влиянии галектинов на баланс субпопуляционного состава моноцитов и развитие эндотелиальной дисфункции, маркером которой может служить повышение уровня десквамированных эндотелиальных клеток (CD45⁻CD146⁺) [Gong D. et al., 2012; Kovalenko L., 2014].

Таким образом, вклад галектинов в модуляцию иммунного ответа и эндотелиальную дисфункцию при РТК требует детального изучения, что определяет актуальность настоящего исследования.

Цель исследования – установить роль галектинов 1 и 3 в формировании фенотипического дисбаланса моноцитов периферической крови и макрофагов опухолевой ткани, и механизмах неоангиогенеза у больных раком толстой кишки с разной степенью прорастания и дифференцированности опухоли,

наличием/отсутствием очагов метастазирования.

Задачи исследования:

1. Проанализировать особенности субпопуляционного состава моноцитов (классические CD14⁺⁺CD16⁻, промежуточные CD14⁺⁺CD16⁺ и неклассические CD14⁺CD16⁺⁺) в крови и макрофагов (M1 (CD68⁺CD80⁺) и M2d (CD68⁺CD206⁺)) в опухолевой ткани в комплексе с измерением плазменной концентрации галектинов 1 и 3 и количества галектин-1⁺ и галектин-3⁺ опухолевых клеток у больных раком толстой кишки.

2. Оценить количество десквамированных эндотелиальных CD45⁻CD146⁺ клеток в крови, плазменную концентрацию проангиогенных факторов (VEGF и EGF) и экспрессию опухолевыми клетками рецепторов к эндотелиальному (VEGFR) и эпидермальному (EGFR) факторам роста у больных раком толстой кишки во взаимосвязи с содержанием галектина-1 и галектина-3 в опухоли и периферической крови.

3. Сопоставить результаты оценки экспрессии галектинов-1,3 в опухоли и их плазменной концентрации с изменениями соотношения субпопуляций моноцитов в периферической крови и макрофагов в опухолевой ткани, содержанием проангиогенных факторов и количеством десквамированных эндотелиоцитов в крови у больных раком толстой кишки с разной степенью инвазии и дифференцированности опухоли, а также наличием/отсутствием очагов метастазирования.

Научная новизна

Впервые у больных раком толстой кишки изучено влияние галектинов 1 и 3 на дисбаланс субпопуляций моноцитов периферической крови во взаимосвязи с проангиогенными факторами, показателем эндотелиальной дисфункции и клинкоморфологическими параметрами опухоли. Выявлена значимая положительная связь между высоким содержанием галектинов 1 и 3 в периферической крови и нарушением баланса моноцитов крови в виде снижения доли классических CD14⁺⁺CD16⁻ моноцитов и, напротив, увеличения неклассических CD14⁺CD16⁺⁺ и промежуточных CD14⁺⁺CD16⁺ клеток у больных раком толстой кишки с низкой степенью дифференцированности опухоли. Установлено, что изменение концентрации галектинов 1 и 3 в периферической крови и содержания галектин-1⁺ и галектин-3⁺ клеток в опухоли не влияет на M1/M2d-экспрессионный профиль опухоль-ассоциированных макрофагов. Прямая зависимость между содержанием ростового фактора VEGF и концентрацией галектинов 1 и 3 в периферической крови, между плазменным уровнем EGF и количеством опухолевых галектин-3⁺ клеток, а также числом EGFR- и галектин-1-позитивных клеток в опухоли у больных раком толстой кишки отражает способность изученных галектинов модулировать VEGF- и EGF-опосредованное взаимодействие между клетками опухоли и ее микроокружением, обосновывает неоангиогенез-промотирующий потенциал лектинов. Впервые показано, что у больных раком толстой кишки увеличение абсолютного содержания десквамированных CD45⁻CD146⁺ эндотелиоцитов (показатель эндотелиальной дисфункции) сопряжено с повышением концентрации галектинов-1,3 и VEGF в периферической крови вне зависимости от стадии заболевания и степени дифференцированности опухоли.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные новые фундаментальные данные существенно расширяют современные представления о роли галектинов-1,3 в механизмах дифференцировки субпопуляций моноцитов крови и макрофагов опухолевой ткани, и неоангиогенезе при раке толстой кишки. Результаты анализа фенотипического профиля моноцитов крови у больных раком толстой кишки с высоким содержанием плазменных галектинов 1 и 3 указывают на преобладание неклассических CD14⁺CD16⁺⁺ и промежуточных CD14⁺⁺CD16⁺ клеток при снижении количества CD14⁺⁺CD16⁻ моноцитов с противоопухолевым потенциалом. Продemonстрировано модулирующее действие галектинов 1 и 3 в отношении VEGF- и EGF-зависимой кооперации клеток опухоли и ее микроокружения: установлена прямая зависимость между концентрацией галектинов (1 и 3) и содержанием ростового фактора VEGF в периферической крови, между количеством опухолевых галектин-3⁺ клеток и плазменным уровнем EGF, а также числом галектин-1- и EGFR-позитивных клеток в опухоли. Описаны особенности распределения иммунофенотипов макрофагов M1 и M2d в опухолевой ткани при злокачественных и доброкачественных новообразованиях толстой кишки. Установлена тенденция к увеличению относительного числа M1-активированных внутриопухолевых макрофагов при раке толстой кишки и, напротив, повышение количества M2d-субпопуляции этих клеток у пациентов с аденомой толстой кишки. Отсутствие взаимосвязи между содержанием галектинов-1,3, ростовых факторов (EGF, VEGF) и десквамированных эндотелиальных клеток в крови у больных раком толстой кишки с наличием очагов метастазирования, со степенью инвазии и дифференцированности опухоли, связанное, по-видимому, с однородностью групп пациентов, требует дальнейших исследований ввиду перспективности использования галектинов в качестве новых молекулярных мишеней при лечении рака толстой кишки.

Методология и методы исследования

Для реализации поставленных задач были отобраны и обследованы пациенты с морфологически верифицированным диагнозом рака толстой кишки. Материалом исследования служила цельная кровь, полученная из локтевой вены, плазма крови, а также биоптаты опухоли и ткань удаленных аденом толстой кишки, полученные при эндоскопическом исследовании. Взятие проб осуществлялось до назначения любого противоопухолевого лечения. Относительное количество субпопуляций моноцитов в цельной крови определяли с применением антител к CD14, меченных фикоэритрином, и CD16, меченных FITC. Относительную численность M1, M2d субпопуляций макрофагов определяли методом иммунофлуоресценции с применением антител к CD 206, CD80, CD68. Подсчет численности десквамированных эндотелиоцитов выполняли методом проточной цитофлуориметрии с применением антител к CD45, меченных фикоэритрином, и CD146, меченных Alexa Flour 647. Методом иммуноферментного анализа производили количественную оценку содержания галектинов (1 и 3) и ростовых факторов (EGF и VEGF) в плазме периферической крови. Содержание галектин-1⁺, галектин-3⁺, VEGFR⁺ и EGFR⁺ опухолевых клеток определяли методом

иммуногистохимии с применением поликлональных антител к галектину-1, галектину-3, VEGFR и EGFR.

Исследование выполнено в научно-образовательной лаборатории молекулярной медицины (руководитель – зав. кафедрой патофизиологии, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН О.И. Уразова) и Центральной научно-исследовательской лаборатории (руководитель – д-р мед. наук, профессор РАН Е.В. Удут) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, в клинко-диагностической лаборатории (руководитель – д-р мед. наук А.И. Дмитриева) и отделении патологической анатомии (руководитель – Л.Э. Ерендеева) ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (главный врач – канд. мед. наук, доцент М.Ю. Грищенко).

Положения, выносимые на защиту:

1. Галектин-1,3-опосредованный дисбаланс субпопуляционного состава моноцитов крови с преобладанием их неклассического CD14⁺CD16⁺⁺ и промежуточного CD14⁺⁺CD16⁺ иммунофенотипов на фоне дефицита классических CD14⁺⁺CD16⁻ клеток у больных раком толстой кишки коррелирует с низкой дифференцированностью опухолевых клеток.

2. Соотношение M1- и M2d-иммунофенотипов макрофагов с тенденцией к увеличению относительного числа M1-клеток в опухолевой ткани при раке толстой кишки не зависит от степени дифференцированности опухоли, клинической стадии болезни и содержания галектина-1 в крови и опухоли. При этом плазменная концентрация галектина-3 коррелирует с количеством внутритропулевых M2d-макрофагов.

3. Галектины 1 и 3 стимулируют неоангиогенез при раке толстой кишки, что подтверждается их положительным влиянием на содержание проангиогенных факторов в крови (VEGF и EGF) и опухоли (EGFR) и эндотелиальную дисфункцию независимо от дифференцированности опухолевых клеток, степени инвазии первичной опухоли и наличия регионарных и отдаленных метастазов.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения научной работы докладывались и обсуждались на IV Всероссийской конференции с международным участием «Опухолевые маркеры. Фундаментальные и клинические аспекты» (г. Горно-Алтайск, 5 августа 2022 г.); XXVIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (г. Москва, 20–23 марта 2023 г.), 9-м Международном конгрессе по патофизиологии (Сербия, г. Белград, 4–6 июля 2023 г.); Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи» (г. Санкт-Петербург, 4–6 июля 2023 г.); II международной конференции «Генетические технологии в трансляционной биомедицине», г. Томск (г. Томск 5–7 сентября 2023 г.); Первом конгрессе ереванской научной медицинской школы с международным участием «Азнауряновские чтения» (Армения, г. Ереван, 17 ноября 2023 г.); IV Балтийском симпозиуме по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине: «Механизмы воспаления и регенерации в норме и при патологии» (г. Калининград, 14–16 мая 2024 г.); II-й Всероссийской конференции с международным участием «Молодые лидеры в медицинской науке» (г. Томск, 20–21 мая 2024 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 7 статей в рецензируемых научных журналах, в том числе 6 – в научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (включая 3 статьи в журналах, индексируемых в международных наукометрических базах данных Scopus и Web of Science), и 7 статей и тезисов в сборниках научных трудов.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

Автор принимала непосредственное участие в планировании исследования, разработке его концепции и дизайна, формулировании цели и задач, анализе данных литературы по теме диссертационной работы. Клинико-лабораторные методы исследования, статистическая обработка, анализ и обсуждение результатов выполнены автором лично. Лично и в соавторстве подготовлены научные публикации по теме исследования. Написание всех глав и оформление иллюстративного материала диссертации выполнены автором самостоятельно.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 115 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и выводов. Список литературы содержит 137 источников, из них 32 на русском и 105 на английском языках. Диссертация иллюстрирована 15 таблицами и 14 рисунками.

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. В частности, отражены особенности этиологии и патогенеза рака толстой кишки. Описаны структура и функции опухолевого микроокружения, особенности ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции при опухолевых заболеваниях. Рассмотрена роль галектинов в регуляции неоангиогенеза и дифференцировке клеток, формирующих опухолевое микроокружение, при злокачественных новообразованиях. Охарактеризованы современные взгляды в отношении деления моноцитов и макрофагов на отдельные субпопуляции и их роль в патогенезе опухолевого процесса и реализации противоопухолевого иммунитета.

Во второй главе диссертации описаны объект, материал и методы исследования. В исследование были включены 23 пациента с диагнозом рака толстой кишки (код по МКБ С18-С20) – 5 мужчин и 18 женщин (средний возраст $63,8 \pm 9,4$ лет). Все пациенты находились на диспансерном учете в ОГАУЗ «ТООД» (главный врач – канд. мед. наук, доцент М.Ю. Грищенко). Набор пациентов для

исследования осуществлялся при участии врачей-онкологов Е.С. Дроздова и К.А. Гамировой. Для проведения исследования получено разрешение локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ № 8881 от 22.11.2021 г. У всех обследованных добровольцев было получено информированное согласие на участие в исследовании.

В основную группу исследования вошли пациенты с РТК; группу сравнения составили пациенты с аденомой толстой кишки (АТК) – 9 мужчин и 10 женщин, средний возраст ($60,7 \pm 10,4$) лет; контрольную группу составили 17 практически здоровых доноров (группа здоровья II-IIIa) – 8 мужчин и 9 женщин в возрасте ($64,0 \pm 9,2$ лет), приглашенные к участию после прохождения профилактического осмотра.

Диагноз РТК был установлен на основании данных клинических и клинико-лабораторных методов исследования и верифицирован морфологически. Исследование морфологии новообразования и отнесение его к определенному гистологическому типу было выполнено в патологоанатомическом отделении ОГАУЗ «ТООД» (заведующий – Л.Э. Ерендеева). Получение материала для гистологического исследования осуществлялось на догоспитальном этапе до начала специализированной терапии. Описание распространенности опухолевого процесса у каждого отдельного пациента выполнялось в соответствии с классификацией по системе TNM (AJCC 8th Edition, 2018 г.). Распространение первичной опухоли (Т) соответствовало Т1, Т2 у 3 (13,0 %) пациентов с РТК, Т3, Т4 – у 20 (87,0 %) пациентов. Регионарные метастазы (N1, N2) были диагностированы у 10 (43,5 %) пациентов, отдаленные (M1) – у 4 (17,4 %) человек, при этом, все пациенты с отдалёнными метастазами (M1) имели также поражение регионарных лимфоузлов (N1, N2). Подразделение злокачественных новообразований толстой кишки на гистологические типы выполняли в соответствии с «Международной гистологической классификацией» (ВОЗ, 2010), по степени дифференцированности опухолевых клеток – согласно «Клиническим рекомендациям по диагностике и лечению опухолей» [Ассоциация онкологов России, 2014]. Согласно данным морфологического исследования, у 21 (91,3 %) пациента с РТК была диагностирована аденокарцинома высокой или умеренной степени дифференцированности.

Критериями исключения, общими для всех групп, являлись: наличие первично-множественных злокачественных заболеваний как синхронных, так и метасинхронных, проведенная противоопухолевая и цитостатическая терапия, в том числе в анамнезе; обострение хронических воспалительных, инфекционных или паразитарных заболеваний, наличие аутоиммунной и аллергической патологии без достигнутого контроля, наличие гнойных процессов, а также отказ от участия в исследовании.

Материалом исследования служили биоптаты ткани толстой кишки, полученные во время фиброколоноскопии у пациентов с РТК и АТК. Подготовку материала для иммуногистохимического исследования проводили на базе патологоанатомического отделения ОГАУЗ «ТООД» (заведующий – Л.Э. Ерендеева).

В образцах РТК и АТК определяли содержание галектин-1⁺, галектин-3⁺

VEGFR⁺ и EGFR⁺ опухолевых клеток методом иммуногистохимии по стандартной методике с помощью автоматического иммуногистостейнера «Bond-maX» («Leica Biosystems», Германия).

Содержание опухолевых клеток, экспрессирующих галектин-1, галектин-3, VEGFR и EGFR, подсчитывали в «горячих точках» – участках максимальной экспрессии искомым галектинам, окрасившихся положительно. Подсчитывали не менее 300 клеток. 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, мышинные), к EGFR (клон EGFR.25, RTU, мышинные) и VEGFR (клон KLT9, рабочее разведение 1:100, мышинные) фирмы «Novocastra» (Leica Biosystems, Германия).

Оценку иммунофенотипов M1 (CD68⁺CD80⁺) и M2 (CD68⁺CD206⁺) макрофагов в опухолевой ткани проводили методом иммунофлуоресценции с последующей конфокальной микроскопией [Меркулов Г.А., 1996]. Использовали первичные антитела анти-CD68 (Novus Biologicals, 1:200), анти-CD80 (Abcam, 1:70), анти-CD206 (R&D Systems, 1:40) и вторичные антитела AlexaFluor488 (анти-мышинные), AlexaFluor555 (анти-кроличьи), AlexaFluor647 (анти-козьи) в разведении 1:400. Ядра окрашивали при помощи антител DAPI (Abcam). Анализ проводили на конфокальном микроскопе Carl Zeiss LSM 780 NLO (объектив 40×) в режиме последовательного сканирования. Обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения Black Zen и Qupath 0.4.4.

Материалом исследования также была цельная кровь больных РТК и здоровых добровольцев. Взятие крови осуществлялось в утреннее время натощак посредством пункции локтевой вены в пробирки Vacutainer с напылением К₃ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Для измерения концентрации галектина-1 и галектина-3 в крови использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Процедуру ИФА проводили с использованием набора реагентов «Human Galectin-1 PicoKine ELISA Kit» по протоколу фирмы-производителя «BosterBio» (США). Результат выражали в нг/мл. Измерение концентрации EGF и VEGF в плазме периферической крови проводили методом ИФА с использованием наборов реагентов «Human EGF ELISA Kit» и «Human VEGF-A ELISA Kit» соответственно согласно протоколам фирмы-производителя «RayBio» (Китай). Концентрацию EGF и VEGF определяли по калибровочной кривой. Результат выражали в нг/мл.

Подсчет численности отдельных субпопуляций моноцитов крови выполняли методом проточной цитофлуориметрии. Субпопуляции моноцитов идентифицировали по экспрессии CD14/CD16: CD14⁺CD16⁻ (классические), CD14⁺⁺CD16⁺ (промежуточные), CD14⁺CD16⁺⁺ (неклассические). Измерения проводили на проточном цитофлуориметре «Accuri C6» («BD Bioscience», США) с анализом данных в программном обеспечении «BD Cell Quest». Результаты выражали в % от популяции CD14⁺ клеток.

Подсчет числа десквамированных эндотелиальных клеток (CD45⁻CD146⁺, ДЭК) осуществляли методом проточной лазерной двухцветной цитофлуориметрии с применением антител к CD45, меченных фикоэритрином, и CD146, меченных изотиоцианатом, в соответствии с инструкцией производителя (BD Bioscience,

США). Содержание ДЭК в крови оценивали путем пересчета на общее количество лейкоцитов в крови (CD45 – общий лейкоцитарный маркер). Результаты анализа содержания десквамированных эндотелиоцитов в крови выражали в $\times 10^5/\text{л}$.

Статистическая обработка результатов исследования была выполнена в программном пакете Jamovi 2.3.21 для Windows. Для проверки нормальности распределения изученных параметров использовали критерии Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Для оценки статистической значимости различий количественных показателей между исследуемыми выборками применяли U-критерий Манна-Уитни (U). Для выявления взаимосвязей между двумя количественными показателями вычисляли ранговый коэффициент корреляции Спирмена (ρ). Для сравнения между несколькими (тремя) группами применяли однофакторный дисперсионный анализ. При обнаружении значимого различия при межгрупповом сравнении выполняли попарное сравнение с помощью критерия Ньюмана-Кеулса. С целью обнаружения скрытых взаимосвязей использовали факторный анализ. Результаты считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

В третьей главе представлены результаты исследования взаимосвязи галектинов 1 и 3 с фенотипическим профилем моноцитов крови и макрофагов опухолевой ткани при РТК. Проанализированы особенности субпопуляционного состава моноцитов крови и опухолеассоциированных макрофагов в зависимости от содержания галектинов-1,3 (в опухоли и крови), концентрации проангиогенных факторов в крови и экспрессии комплементарных им рецепторов в опухоли, численности десквамированных эндотелиальных клеток и клинико-морфологических характеристик опухолевого процесса.

В четвертой главе проведено обсуждение и интерпретация полученных данных, с учетом современных взглядов на изучаемые компоненты патогенеза опухолевого роста.

Известно, что галектины оказывают регуляторное воздействие на фундаментальные клеточные функции – пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз – как в физиологических условиях, так и в патогенезе онкологических заболеваний [Rabinovich G. et al., 2002; Blaževič O. et al., 2016; Wu K.-L., 2024]. По данным литературы, рак толстой кишки характеризуется гиперэкспрессией галектинов 1-го и 3-го в ассоциации с быстрой прогрессией опухоли [Uhlén M. et al., 2005; Watanabe M. et al., 2008; Козич Ж.М. и соавт., 2020].

На основании проведенного иммуногистохимического исследования выявлено увеличение доли галектин-1-позитивных опухолевых клеток у больных РТК по сравнению с группой пациентов с АТК. Медианное значение содержания галектин-1⁺ клеток в группе больных РТК составило 33,5 % (27,0; 55,0), что в 3,0 раза превышало показатель в группе пациентов с АТК – 11,0 % (5,0; 21,0) ($p < 0,001$). В отличие от галектина-1, экспрессия галектина-3 в опухолевой ткани не показала статистически значимых различий между группами: 17,5 % (7,0; 21,0) при РТК против 15,0% (7,0; 21,0) при АТК ($p = 0,089$). Таким образом, только галектин-1 демонстрирует выраженную гиперэкспрессию в ткани злокачественных опухолей толстой кишки.

Галектины 1 и 3 могут вырабатываться как «здоровыми клетками» различных

тканей организма [Tronsoco M. et al., 2023], так и злокачественно трансформированными [Якушина В. и соавт., 2012], и определяться не только в тканях, но и в периферической крови. Полученные в результате исследования данные продемонстрировали, что у пациентов с колоректальным раком уровень галектинов в плазме периферической крови статистически значимо превышал значения контрольной группы (группы здоровых доноров): уровень галектина 1 – в 2,5 раза ($p < 0,001$), а галектина 3 – в 5,7 раза ($p < 0,01$) (Рисунок 1).

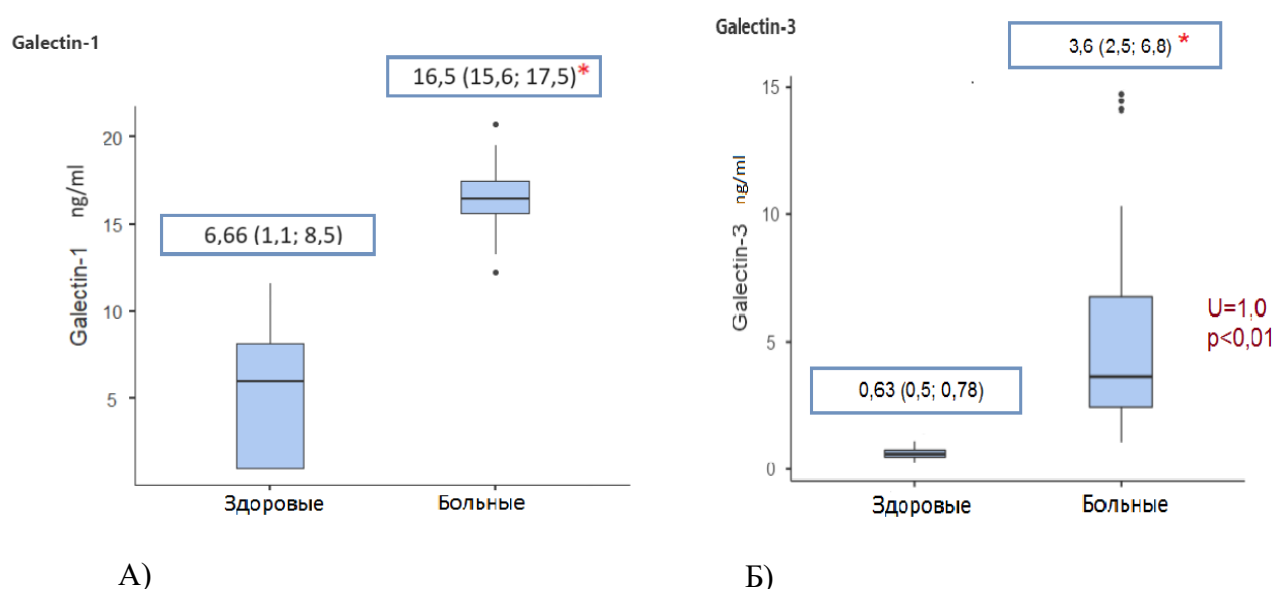


Рисунок 1 – А) Концентрация галектина-1 в плазме крови у больных раком толстой кишки; Б) Концентрация галектина-3 в плазме крови у больных раком толстой кишки

Примечание – Здесь и далее в рисунках: * – статистически значимые различия.

При этом у пациентов с колоректальным раком обнаруживалась высокая положительная корреляция ($\rho = 0,843$; $p < 0,001$) между содержанием галектина-1 и галектина-3 в плазме крови. В целом, у больных РТК следует констатировать увеличение количества опухолевых галектин-1⁺ клеток при одновременном увеличении концентрации галектинов 1 и 3 в периферической крови.

Многие механизмы, посредством которых галектин-1 оказывает проангиогенное действие в опухоли, связаны с разными семействами рецепторов ростовых факторов. Галектин-1 может вступать во взаимодействие с нейропилином (neuropilin – NRP) 1, одним из корецепторов для VEGF, и приводить к активации экспрессии рецептора VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) 2 с последующей стимуляцией миграции эндотелиальных клеток [Hsieh S. et al., 2008].

В исследовании мы проанализировали наличие связи между содержанием плазменных галектинов 1 и 3 и концентрацией VEGF и EGF в периферической крови (у больных РТК и здоровых доноров), а также экспрессией рецепторов VEGFR и EGFR в ткани опухоли (у пациентов с РТК и АТК).

Установлено, что плазменная концентрация VEGF у пациентов с РТК на 22,1 % превышала аналогичный параметр у здоровых добровольцев. Однако концентрация EGF в периферической крови у пациентов с РТК и здоровых доноров оказалась сопоставимой (Таблица 1).

Таблица 1 – Концентрация ростовых факторов роста в периферической крови у больных раком толстой кишки, Me (Q1; Q3)

Ростовые факторы	Пациенты с РТК	Здоровые добровольцы
VEGF (нг/мл)	165,8 (136,0; 179,0)	135,8 (103,0; 145,0)
	$p = 0,027$	
EGF (нг/мл)	57,80 (36,70; 70,00)	36,90 (16,30; 56,30)
	$p = 0,770$	
Примечание – p – уровень статистической значимости различий.		

Несомненно, выраженность проопухолевых эффектов, реализуемых ростовыми факторами VEGF и EGF, определяется не только концентрацией этих медиаторов в периферической крови, но и экспрессией соответствующих им рецепторов на мембране злокачественно трансформированных клеток. Интенсификация экспрессии рецептора эпидермального фактора роста EGFR является прогностическим фактором, связанным с ухудшением исхода заболевания, частыми рецидивами и недостаточной эффективностью терапевтических вмешательств [Galizia G. et al., 2007].

По результатам исследования экспрессии VEGFR типа A и EGFR в образцах тканей злокачественных и доброкачественных новообразований толстой кишки методом иммуногистохимии нами были установлены сопоставимые значения процентного числа опухолевых VEGFR⁺ клеток. У пациентов с РТК относительное содержание опухолевых VEGFR-позитивных клеток составило 10,0 (6,5; 18,3) %, у пациентов с АТК оказалось равным 8,0 (6,0; 10,0) %. Медианное значение числа опухолевых EGFR⁺ клеток, равное 17,0 (5,75; 28,50) %, у больных РТК также не отличалось от аналогичного показателя при АТК (11,0 (6,0; 16,0) %). Это свидетельствует о том, что помимо непосредственного участия ростовых факторов и их рецепторов в индукции опухолевого роста, немаловажная роль отводится компонентам опухолевого микроокружения.

Так, у больных РТК была обнаружена прямая корреляционная связь умеренной силы между содержанием галектин-1⁺ клеток в опухоли и процентным содержанием клеток, экспрессирующих EGFR ($\rho = 0,404$; $p = 0,038$). Также у пациентов с РТК была зарегистрирована умеренная положительная связь между плазменным уровнем VEGF и содержанием галектинов 1 и 3 в периферической крови. Анализ взаимосвязей концентрации EGF и галектинов (1 и 3) в плазме периферической крови при РТК не позволил выявить статистически значимых различий. В свою очередь, относительное количество опухолевых галектин-3-позитивных клеток положительно коррелировало (связь умеренной силы) с содержанием EGF в плазме периферической крови ($\rho = 0,394$; $p = 0,042$) у больных РТК. Установленные значимые положительные взаимосвязи между концентрацией циркулирующих галектинов-1, -3 и VEGF; содержанием EGF в плазме и экспрессией галектина-3 в опухоли; между экспрессией EGFR и галектина-1 в опухоли у больных РТК могут указывать на способность изученных галектинов

модулировать VEGF- и EGF-опосредованное взаимодействие между злокачественными клетками и элементами опухолевого микроокружения. Они обосновывают способность галектина-1 и галектина-3 проявлять синергизм в реализации VEGF- и EGF-зависимого злокачественного потенциала опухоли. Предполагаемым механизмом взаимного влияния галектинов-1,3 и рецепторов ростовых факторов является удержание лигандов этих рецепторов на плазматической мембране и, как следствие, модуляция процессов фосфорилирования и сигнальной трансдукции [Wu K.-L. et al., 2018].

Одними из клеток опухолевого микроокружения, участвующих в поддержании опухолевого роста, прогрессии и ангиогенеза, предположительно, являются опухоль-ассоциированные макрофаги. У больных РТК и АТК методом иммунофлуоресценции было определено в ткани опухоли относительное количество макрофагов с фенотипами M1 (CD68⁺CD80⁺), которым отводится в основном провоспалительная роль, и M2d (CD68⁺CD206⁺), имеющим проопухолевый потенциал.

Относительное содержание M1 (CD68⁺CD80⁺) макрофагов в опухолевой ткани у пациентов с РТК и АТК не имело существенных различий. Содержание в опухоли M2d-макрофагов с иммунофенотипом CD68⁺CD206⁺ у больных РТК оказалось в 1,9 раза ниже, чем у пациентов с АТК. При оценке соотношения M1- и M2d-макрофагов внутри каждой исследуемой группы мы наблюдали относительное преобладание M2d-субпопуляции макрофагов ($p = 0,031$) у пациентов с АТК, тогда как у больных РТК соотношение изучаемых субпопуляций было сопоставимым (Таблица 2).

Таблица 2 – Иммунофенотипы макрофагов в ткани опухоли у больных раком толстой кишки, Me (Q1; Q3)

Макрофаги, %	Пациенты с РТК	Пациенты с АТК
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)
	$p = 0,031$	
Примечание – p – уровень статистической значимости различий.		

Полученный результат, по-видимому, обусловлен вкладом воспалительного процесса в патогенез злокачественного роста и развитие опухоли. Однако, по мнению ряда авторов, для злокачественных новообразований, как правило, характерен дисбаланс соотношения M1/M2d-макрофагов по пути доминирования M2d-субпопуляции [Barrionuevo P. et al., 2007; Baran B. et al., 2009; Wu K. et al., 2020].

Известно, что пул опухоль-ассоциированных макрофагов, иммуносупрессорных клеток миелоидного происхождения, иммуногенных и толерогенных дендритных клеток популяцией пополняется за счет моноцитов, имеющих костномозговое происхождение и мигрирующих в ткани [Богданова И.М. и соавт., 2019].

У пациентов с РТК установлено статистически значимое снижение относительного числа классических CD14⁺⁺CD16⁻ моноцитов крови по сравнению с таковым у здоровых лиц, и отсутствие достоверных отличий от аналогичного параметра у пациентов с АТК. Одновременно с этим у больных РТК показано реципрокное увеличение относительной численности CD16⁺ клеток: количество промежуточных моноцитов в 3,0 раза, а неклассических в 3,8 раза превышало соответствующие значения в контрольной группе. Процентное содержание CD14⁺⁺CD16⁺ и CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитов в периферической крови при РТК и АТК оказалось сопоставимым (Таблица 3).

Таблица 3 – Соотношение субпопуляций моноцитов в периферической крови у больных раком толстой кишки, (M ± SD)

Субпопуляции моноцитов, %	Пациенты с РТК (n = 23)	Пациенты с АТК (n = 13)	Здоровые доноры (n = 11)	Межгрупповое сравнение
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ (классические)	74,7 ± 6,7	75,2 ± 6,8	88,2 ± 5,6	F = 18,07 p < 0,001
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ (промежуточные)	8,7 ± 3,9	8,2 ± 3,6	2,9 ± 3,5	F = 9,65 p < 0,001
CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ (неклассические)	15,7 ± 5,5	16,6 ± 6,1	4,1 ± 3,2	F = 21,87 p < 0,001
Примечание – F – значение критерия однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), p – уровень статистической значимости различий у пациентов и здоровых доноров.				

Таким образом, в периферической крови у больных РТК превалировала субпопуляция CD16⁺-позитивных моноцитов (промежуточных и неклассических). Увеличение количества неклассических CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитов в циркуляции исследователи связывают с одной из их специфических функций – синтезом факторов роста, а повышение числа моноцитов с иммунофенотипом CD14⁺⁺CD16⁺ (промежуточных) – с продукцией ими TNF (tumor necrosis factor – фактор некроза опухоли) α, играющего роль медиатора воспаления, ассоциированного с опухолевым процессом [Sindrilaru A. et al., 2011].

У больных РТК нами была проанализирована связь галектинов 1 и 3 с содержанием отдельных субпопуляций гемических моноцитов и опухолеассоциированных макрофагов. По результатам исследования установлена положительная взаимосвязь между относительным количеством неклассических CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитов и содержанием галектина-1 (ρ = 0,557; p < 0,01) и галектина-3 (ρ = 0,780; p < 0,01) в периферической крови у больных РТК. Сходная связь прослеживалась и в отношении численности промежуточных CD14⁺⁺CD16⁺ моноцитов. Установлена заметная прямая корреляция между содержанием этих клеток в крови и тканевым уровнем галектина-1 (ρ = 0,618) и галектина-3 (ρ = 0,617; p < 0,01) у пациентов данной группы.

Анализ взаимосвязей M1/M2d-экспрессионного профиля опухолеассоциированных макрофагов с содержанием галектинов 1 и 3 (в крови и

опухолевой ткани) у больных РТК не позволил выявить статистически значимых значений коэффициентов корреляции. Примечательна взаимосвязь между содержанием галектина-3 в опухолевой ткани и плазме крови с относительной численностью опухолевых M2d-макрофагов. Данная тенденция, вероятно, объясняется участием галектинов в дифференцировке и активации макрофагов по M2-пути при РТК.

Опухолевый процесс неизбежно сопровождается явлениями эндотелиальной дисфункции, что может сопровождаться появлением в крови маркеров эндотелиальной дисфункции – десквамированных эндотелиоцитов [Гончаров Н.В. и соавт., 2020].

Статистический анализ продемонстрировал достоверное увеличение абсолютного количества десквамированных CD45⁻CD146⁺ эндотелиоцитов в крови до 183,0 (76,0; 724,0) ед.×10⁵/л у больных РТК по сравнению с группой здоровых доноров, у которых оно составляло 22,30 (38,50;60,90) ед.×10⁵/л ($U = 31,0$; $p = 0,001$). Это подтверждает наличие эндотелиальной дисфункции при РТК и, как следствие, увеличение проницаемости сосудистой стенки, что является предрасполагающими факторами к развитию отдаленных метастазов при злокачественном процессе в толстой кишке. У пациентов с РТК продемонстрированы значимые (умеренные и заметные) корреляции между количеством десквамированных эндотелиоцитов в периферической крови и содержанием VEGF ($\rho = 0,307$; $p < 0,05$), галектина-1 ($\rho = 0,650$; $p < 0,01$) и галектина-3 ($\rho = 0,622$; $p < 0,01$) в плазме крови. Изменение экспрессии проангиогенных факторов и эндотелиальная дисфункция могут быть связаны с комплексным воздействием факторов опухолевой биологии и элементов микроокружения, где значимый вклад вносят регуляторные молекулы, такие как галектины [Ge X. et al., 2013].

Для уменьшения размерности данных и выявления латентных структур между изученными переменными и определения основных факторов, объясняющих вариативность исходных данных, в диссертационном исследовании был использован факторный анализ методом главных компонент. С целью оценки пригодности выборки для факторного анализа выполнялась проверка значений с помощью критерия Кайзера-Мейера-Олкина. Общий критерий составил 0,78 ($> 0,7$), а для отдельных переменных – не менее 0,6, что свидетельствует о высокой пригодности всех данных для факторного анализа. С той же целью был выполнен тест сферичности Бартлетта, при котором получены значения χ^2 (хи-квадрат), равное 215,4, степени свободы (df) – 120, при значении уровня статистической значимости $p = 0,001$. Таким образом, тест отвергает нулевую гипотезу о независимости переменных и подтверждает наличие латентных взаимозависимостей между переменными, тем самым обосновывая применение факторного анализа. Определение числа извлекаемых факторов определено с помощью критерия Кайзера, и получен результат, что оптимальное количество вычисляемых факторов, объясняющих наибольшие значения дисперсии – три. На этапе извлечения факторов мы выделили три фактора, объясняющих 56 % дисперсии. Основная часть дисперсии значений в изученной выборке зависела в большей степени от содержания галектина-3 в опухоли и (или) крови, но в меньшей

степени – от содержания галектина-1 в крови и особенностей субпопуляционного профиля опухолевых макрофагов, что подчеркивает значимую роль и приоритет данных факторов в механизмах кооперативного взаимодействия элементов опухолевого микроокружения – клеток врожденного иммунитета и регуляторных молекул.

Гиперэкспрессия ростовых факторов и их рецепторов, а также модуляторов рецепции при опухолевом процессе может индуцировать инвазивный рост и метастазирование, а также опухолевый неоангиогенез [Ghosh S. et al., 2001; Bertolini F. et al., 2006; Niyaz M. et al., 2015].

У больных РТК мы проанализировали взаимосвязь молекулярных и клеточных показателей с такими характеристиками опухоли, как глубина инвазии основного очага (распространение вглубь стенки толстой кишки) и наличие или отсутствие метастазов.

В зависимости от степени дифференцированности клеток все злокачественные новообразования были разделены на две группы – с низкой и высокой степенью злокачественности. В соответствии с классификацией ВОЗ пересмотра 2019 года к опухолям с низкой степенью злокачественности (low grade) относятся аденокарциномы высокой степени дифференцированности, к опухолям с высокой степенью злокачественности (high grade) – аденокарциномы низкой и умеренной дифференцированности.

При анализе связи исследованных параметров с гистологическими особенностями новообразований было установлено, что у пациентов с колоректальным раком наибольшая численность CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитов в крови обнаруживалась при высокой степени злокачественности опухоли, то есть при более агрессивном клиническом течении РТК ($\rho = 0,447$; $p = 0,032$). Это, вероятно, обусловлено способностью неклассических моноцитов секретировать цитокины и поддерживать воспаление. В качестве реципрокного изменения нами была зарегистрирована отрицательная связь между численностью классических CD14⁺⁺CD16⁻ моноцитов и степенью дифференцированности опухоли ($\rho = -0,469$; $p = 0,010$).

В отношении других плазменных и тканевых параметров значимых зависимостей от степени злокачественности (дифференцированности) опухоли у пациентов с РТК установлено не было. В частности, у больных РТК нам не удалось обнаружить статистически значимой связи между содержанием галектинов-1,3, ростовых факторов (EGF и VEGF) и десквамированных эндотелиоцитов в крови и степенью дифференцированности опухоли, а также наличием регионарных и/или гематогенных метастазов.

Полученные результаты могут быть обусловлены достаточной однородностью группы пациентов, преобладанием в выборке больных РТК со II и III клинической стадией, ввиду редкости случаев диагностики РТК на I стадии, и исключением из исследования пациентов с выраженным коморбидным фоном.

В целом, полученные нами корреляции и зависимости можно представить в виде схемы (Рисунок 2).

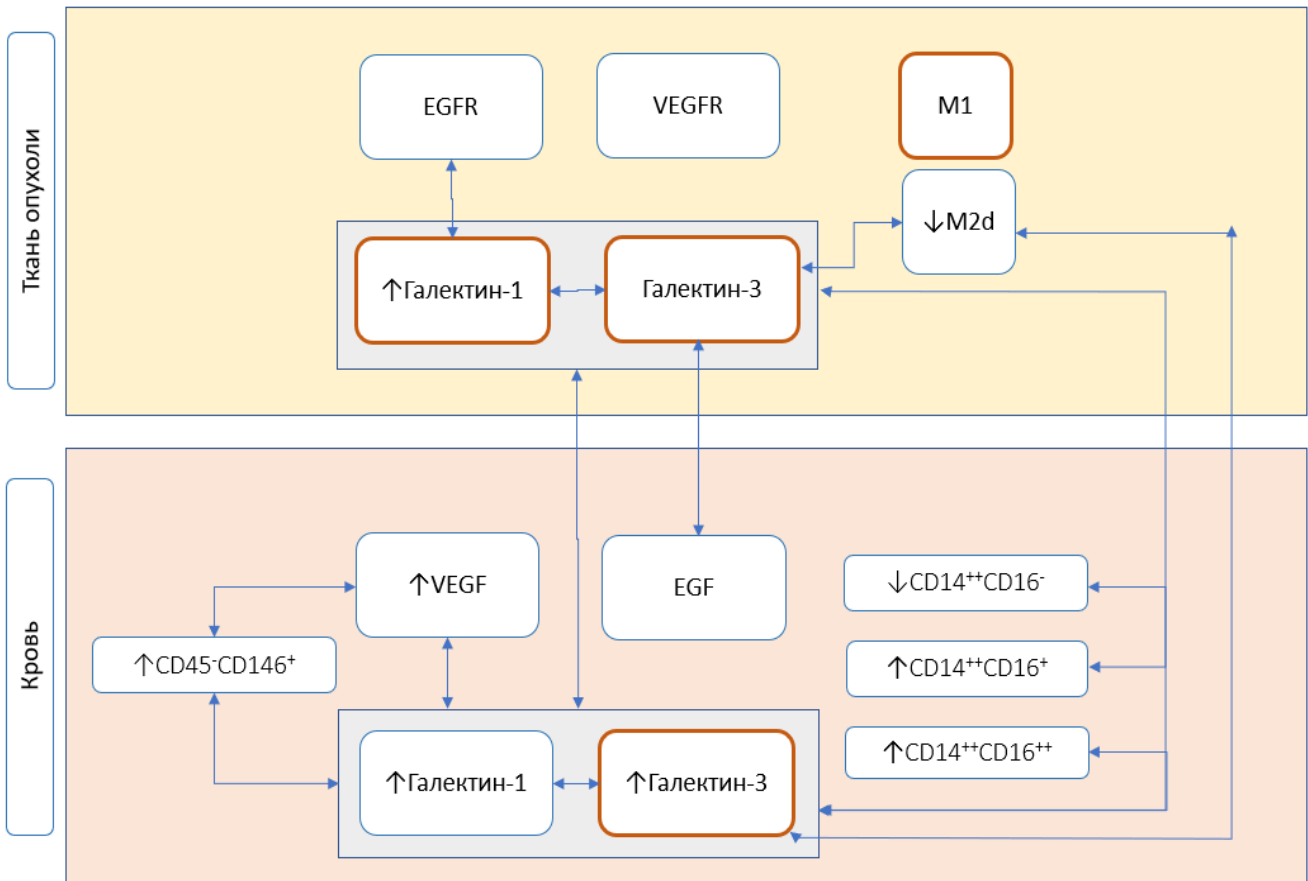


Рисунок 2 – Схема положительных корреляций между исследованными параметрами в патогенезе рака толстой кишки

Примечание – голубые стрелки показывают выявленные взаимосвязи согласно полученным результатам; жирным контуром обведены факторы, в наибольшей степени обуславливающие вариабельность исходных данных.

По результатам проведенного исследования, можно констатировать, что галектины 1 и 3 выступают в роли модуляторов взаимодействия рецепторов на мембране клеток (здоровых и опухолевых) и их лигандов, значимых в патогенезе РТК.

Следствием галектин-1,3-опосредованной дисрегуляции данного взаимодействия является нарушение баланса субпопуляционного состава клеток врожденного иммунитета – моноцитов и опухоль-ассоциированных макрофагов, которые, в свою очередь, изменяют свой иммунофенотип на «более выгодный» для поддержания опухолевого роста и неоангиогенеза, даже при «нормальном содержании» ростовых факторов в плазме периферической крови и экспрессии их рецепторов в опухолевой ткани. Вместе с тем, установлены признаки галектин-1,3-зависимой эндотелиальной дисфункции, выражающейся в появлении десквамированных эндотелиоцитов в периферической крови (Рисунок 3).

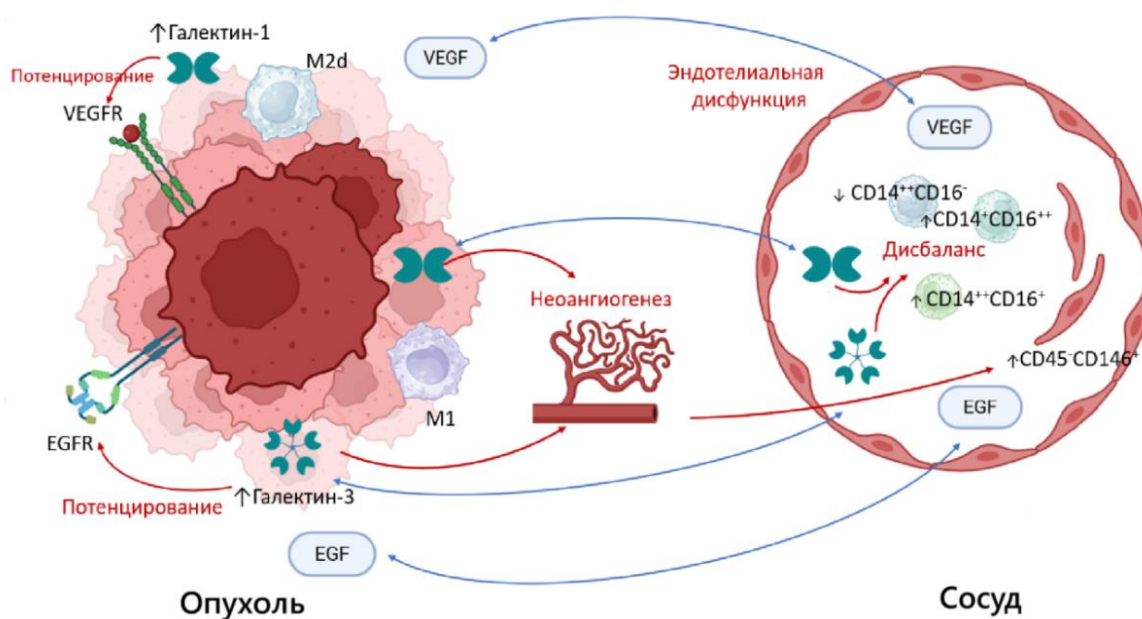


Рисунок 3 – Связь галектинов 1 и 3 с дисбалансом субпопуляций моноцитов/макрофагов и факторов ангиогенеза при раке толстой кишки (по данным литературы (А.А. Корчагиной и соавт. (2013), Н.Л. Светозарского и соавт. (2015), М.П. Топузовой и соавт. (2018), С.Т. Олжаева и соавт., (2022), F. Bertolini et al. (2006)) и результатам собственных исследований

Примечание – синие стрелки – секреция молекул VEGF, EGF и галектинов в ткани опухоли их попадание в сосудистое русло; красные стрелки – роль изучаемых факторов в патогенезе рака толстой кишки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При раке толстой кишки галектин-1 и галектин-3 проявляют модулирующие свойства в отношении дисрегуляции фенотипического профиля клеток врожденного иммунитета и факторов неангиогенеза в механизмах прогрессии опухоли. У больных раком толстой кишки 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, отрицательно коррелирующего со степенью дифференцированности опухоли, и, напротив, увеличения численности моноцитов с альтернативным иммунофенотипом ($CD14^{+}CD16^{++}$ и $CD14^{+}CD16^{+}$).

Относительное количество M1- ($CD68^{+}CD80^{+}$) и M2d- ($CD68^{+}CD206^{+}$) макрофагов в тканях аденокарциномы толстой кишки было сопоставимым и не демонстрировало статистически значимой зависимости от колебаний уровня галектина-1 в системной циркуляции или плотности распределения галектин-1⁺ и галектин-3⁺ клеток в опухолевой ткани. Однако у пациентов с РТК была зафиксирована взаимосвязь между концентрацией галектина-3 в плазме крови и

количеством M2d-положительных опухолевых макрофагов. При этом в группе больных с установленным раком толстой кишки отмечена тенденция к нарастанию удельного веса M1-поляризованных макрофагов в опухолевой строме, в то время как у пациентов с аденомой толстой кишки выявлен противоположный дисбаланс в соотношении M1/M2d-макрофагов с выраженным преобладанием их M2d-субпопуляции. Полученные результаты подчеркивают сложность и многокомпонентность механизмов формирования фенотипического профиля моноцитов/макрофагов при опухолевом процессе.

У больных раком толстой кишки продемонстрирована положительная взаимосвязь повышенной концентрации галектинов 1 и 3 в периферической крови с высоким плазменным уровнем VEGF. Установлена прямая зависимость между содержанием EGF в крови и экспрессией EGFR в опухоли с содержанием галектин-3⁺ и галектин-1⁺ опухолевых клеток. Это характеризует способность галектинов 1-го и 3-го типов проявлять синергизм в реализации VEGF- и EGF-зависимого злокачественного потенциала опухоли.

У пациентов с раком толстой кишки выявлены признаки эндотелиальной дисфункции, выражающейся в появлении высокого количества десквамированных эндотелиоцитов в периферической крови. При раке толстой кишки установлена взаимосвязь между численностью десквамированных эндотелиальных клеток и содержанием VEGF, галектина-1 и галектина-3 в периферической крови.

Галектин-1,3-опосредованный дисбаланс субпопуляционного состава моноцитов крови, связь плазменной концентрации и внутриопухолевой экспрессии галектинов 1 и 3 с содержанием ростовых факторов и численностью десквамированных эндотелиальных клеток в периферической крови у больных раком толстой кишки вне зависимости от степени дифференцированности опухоли и клинической стадии болезни свидетельствует об участии изученных лектинов в механизмах дисрегуляции врожденного иммунитета и опухолевого неоангиогенеза. Последнее обосновывает перспективу использования галектинов в качестве биомаркеров опухолевой активности и потенциальных мишеней для терапевтического воздействия.

ВЫВОДЫ

1. У больных раком толстой кишки снижение относительного содержания классических CD14⁺⁺CD16⁻ моноцитов сочетается с увеличением относительного числа неклассических CD14⁺CD16⁺⁺ и промежуточных CD14⁺⁺CD16⁺ клеток и абсолютного количества десквамированных CD45⁻CD146⁺ эндотелиоцитов в крови.

2. Дисбаланс субпопуляционного состава моноцитов у больных раком толстой кишки коррелирует с повышением концентрации галектина-1 и галектина-3 в периферической крови, ассоциирован с низкой дифференцированностью опухолевых клеток и не зависит от степени инвазии опухоли, и наличия очагов метастазирования.

3. Относительное количество M1 (CD68⁺CD80⁺) и M2d (CD68⁺CD206⁺) макрофагов в ткани опухоли у пациентов с раком толстой кишки сопоставимо, не

зависит от содержания галектинов 1 и 3 в опухоли, от степени дифференцированности и прорастания опухоли, а также наличия регионарных и отдаленных метастазов. У пациентов с аденомами толстой кишки преобладает M2d-субпопуляция опухоли-ассоциированных макрофагов.

4. Прямая зависимость повышения плазменной концентрации проангиогенных ростовых факторов от содержания галектинов в крови и опухоли (VEGF – от содержания галектинов 1 и 3 в крови, EGF – от количества внутриопухолевых галектин-3⁺ клеток) и связь гиперэкспрессии галектина-1 с числом EGFR⁺ клеток в опухолевой ткани при раке толстой кишки свидетельствуют о стимулирующем влиянии галектинов 1 и 3 на процессы неоангиогенеза в опухоли.

5. У больных раком толстой кишки эндотелиальная дисфункция, проявляющаяся кумуляцией десквамированных CD45⁺CD146⁺ эндотелиоцитов, ассоциирована с увеличением концентрации галектинов 1 и 3 и ростового фактора VEGF в периферической крови. Избыточное содержание галектинов-1,3, ростового фактора VEGF и десквамированных эндотелиоцитов в крови при раке толстой кишки не зависит от стадии заболевания и степени дифференцированности опухоли.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Особенности экспрессии галектинов 1 и 3 при раке толстого кишечника во взаимосвязи с клиничко-морфологическими параметрами опухоли / Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Полетика В.С., Рейнгардт Г.В., Романова Е.В., Курносенко А.В., Дмитриева А.И., Янкович К.И., Грищенко М.Ю. // **Фундаментальная и клиническая медицина**. – 2021. – Т. 6, № 4. – С. 45-53. DOI: 10.23946/2500-0764-2021-6-4-45-53. **Импакт-фактор РИНЦ 0,777. К2 в перечне ВАК.**

2. Галектин-1,3-зависимые факторы патогенеза дизрегуляции адаптивного иммунитета при раке толстого кишечника / Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Полетика В.С., Рейнгардт Г.В., Романова Е.В., Курносенко А.В., Дмитриева А.И., Янкович К.И., Грищенко М.Ю. // **Клиническая патофизиология**. – 2021. – № 3. – С. 69-73. **Импакт-фактор РИНЦ 0,131.**

3. Галектин-3 как модулятор цитокинопосредованной кооперации лимфоцитов *in vitro* / Васильева О.А., Прохоренко Т.С., Колобовникова Ю.В., Полетика В.С., Уразова О.И., Кононова Т.Е., Чурина Е.Г., Рейнгардт Г.В., Курносенко А.В. // **Цитокины и воспаление**. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 21-27. DOI: 10.17816/CI2022221-4-4. **Импакт-фактор РИНЦ 0,132. В перечне ВАК до 22.03.2023.**

4. Галектины 1 и 3 как факторы прогрессии колоректального рака / Рейнгардт Г.В., Полетика В.С., Курносенко А.В., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И. // В сб.: Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты : материалы конференции (2-6 августа 2022 г.). – Москва : Блок-Принт, 2022. – С. 103-106.

5. Особенности регуляторного влияния галектинов 1 и 3 на баланс Т-клеток с регуляторной активностью при раке толстой кишки / Васильева О.А.,

Колобовникова Ю.В., Полетика В.С., Рейнгардт Г.В., Курносенко А.В., Уразова О.И. // В сб. : Научные лабораторные технологии для клинической медицины : Материалы XXVIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Москва, 20-22 марта 2023 года / Под редакцией В.В. Долгова. – Москва: Блок-Принт, 2023. – С. 24-26.

6. Association of plasma galectins-1,3 with features of subpopulation composition and functional activity of circulating T-lymphocytes in colon cancer / Vadim S. Poletika, Anna V. Kurnosenko, Gleb V. Reingardt, Olga A. Vasileva, Yulia V. Kolobovnikova, Olga I. Urazova // В сб. : 9th International Congress of Pathophysiology and 5th Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation : final Program and Abstract Book, 04-06 July 2023, Belgrade, Serbia / eds I. Srejić, I. Milosavljević; International Society of Pathophysiology. – Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, 2023. – P. 161.

7. Связь экспрессии галектинов-1,3 с продукцией ростовых факторов VEGF и EGF у больных колоректальным раком в зависимости от клинкоморфологических характеристик опухоли / Курносенко А.В., Рейнгардт Г.В., Васильева О.А., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Дмитриева А.И. // Вопросы онкологии. – 2023. – Т. 69, Приложение 3S : Материалы IX Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2023». – С. 325-326. Импакт-фактор РИНЦ 0,467.

8. Связь галектинов 1 и 3 с проангиогенными факторами и дисфункцией эндотелия при раке толстого кишечника / Курносенко А.В., Васильева О.А., Рейнгардт Г.В., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И. // В сб. : Генетические технологии в трансляционной биомедицине : сборник материалов II международной конференции, Томск, 6-8 сентября 2023 г. / отв. ред. Ю.Г. Кжышковска. – Томск : СибГМУ, 2023. – С. 31.

9. Взаимосвязь галектинов 1- и 3-го типов с экспрессией ростовых факторов и их рецепторов при раке толстой кишки / Курносенко А.В., Рейнгардт Г.В., Полетика В.С., Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И., Грищенко М.Ю., Абрамов В.К., Уразова О.И. // **Технологии живых систем.** – 2024. – Т. 21, № 3. – С. 84-91. DOI: 10.18127/j20700997-202403-09. **Импакт-фактор РИНЦ 0,282. Уровень в Белом списке: 4. К2 в перечне ВАК.**

10. Полиморфизм гена *LGALS1* не связан с содержанием галектина-1 в опухолевой ткани и крови у больных раком толстой кишки / Уразова О.И., Рейнгардт Г.В., Колобовникова Ю.В., Курносенко А.В., Полетика В.С., Васильева О.А., Августинович А.В. // **Альманах клинической медицины.** – 2024. – Т. 52, № 3. – С. 170-177. DOI: 10.18786/2072-0505-2024-52-006. **Импакт-фактор РИНЦ 0,809. Scopus Q4. Уровень в Белом списке: 3. К1 в перечне ВАК.**

11. Связь галектинов 1 и 3 с дисбалансом субпопуляций моноцитов крови и проангиогенных факторов при раке толстой кишки / Курносенко А.В., Вигуль Л.Е., Басеник В.Э. // В сб. : «Молодые лидеры в медицинской науке», Томск, 20-21 мая 2024 г. – 2024. – С. 152.

12. Связь галектинов-1 и -3 с проангиогенными факторами и дисфункцией эндотелия при раке толстой кишки / Курносенко А.В., Рейнгардт Г.В., Полетика В.С., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И. // **Казанский медицинский**

журнал. – 2024. – Т. 105, №4. – С. 551-559. DOI: 10.17816/KMJ623114. **Импакт-фактор РИНЦ 0,456. Scopus Q4. Уровень в Белом списке: 4. К1 в перечне ВАК.**

13. Галектины-1 и -3 в механизмах формирования фенотипического профиля моноцитов крови и неоангиогенезе при раке толстой кишки / Колобовникова Ю.В., Курносенко А.В., Полетика В.С., Рейнгардт Г.В., Уразова О.И. // В сб. : Механизмы воспаления и регенерации в норме и при патологии : материалы IV Балтийского симпозиума по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине с международным участием, Калининград, 14-16 мая 2024 года. – Калининград : Балтийский федеральный университет им. И. Канта, 2024. – С. 22-24.

14. Фенотипический профиль моноцитов крови и опухоль-ассоциированных макрофагов во взаимосвязи с экспрессией галектинов 1 и 3 при раке толстой кишки / 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. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2024. – Т. 23, № 4. – С. 55-63. DOI: 10.20538/1682-0363-2024-4-55-63. **Импакт-фактор РИНЦ 0,724. Scopus Q4, Web of Science Q4. Уровень в Белом списке: 3. К1 в перечне ВАК.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТК – аденома толстой кишки

РТК – рак толстой кишки

EGF (epidermal growth factor) – эпидермальный фактор роста

EGFR (epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста

M1 (CD68⁺CD80⁺) – макрофаг с иммунофенотипом M1

M2d (CD68⁺CD206⁺) – макрофаг с иммунофенотипом M2

TME (tumor microenvironment) – опухолевое микроокружение

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

VEGF (vascular endothelial growth factor) – сосудистый эндотелиальный фактор роста

VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) – рецептор к сосудистому эндотелиальному фактору роста