

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

д-р мед. наук, доцент

Ю.В. Колобовникова

д-р мед. наук, профессор,

член-корреспондент РАН

О.И. Уразова

Томск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Этиология и патогенез рака толстой кишки.....	14
1.2 Опухолевое микроокружение	20
1.3 Ангиогенез и эндотелиальная дисфункция при опухолевых заболеваниях	23
1.4 Роль галектинов в регуляции неоангиогенеза и опухолевого микроокружения при злокачественных новообразованиях.....	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1 Клиническая характеристика обследованных пациентов.....	33
2.2 Материал исследования.....	37
2.3 Методы исследования.....	38
2.3.1 Определение содержания галектин-1 ⁺ , галектин-3 ⁺ , VEGFR ⁺ и EGFR ⁺ опухолевых клеток	38
2.3.2 Определение иммунофенотипов макрофагов в опухолевой ткани.....	39
2.3.3 Определение концентрации галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической крови.....	45
2.3.4 Определение концентрации EGF и VEGF в плазме периферической крови	46
2.3.5 Оценка субпопуляционного состава моноцитов в периферической крови	47
2.3.6 Исследование содержания десквамированных эндотелиоцитов в периферической крови.....	48
2.3.7 Статистический анализ результатов	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
3.1 Экспрессия галектинов 1 и 3 в ткани опухоли у больных раком толстой кишки.....	51

3.2 Концентрация галектинов 1 и 3 в периферической крови у больных раком толстой кишки	51
3.3 Экспрессия VEGFR и EGFR в ткани опухоли у больных раком толстой кишки.....	53
3.4 Концентрация EGF и VEGF в периферической крови у больных раком толстой кишки	54
3.5 Иммунофенотипы макрофагов в опухолевой ткани у больных раком толстой кишки	55
3.6 Субпопуляционный состав моноцитов периферической крови у больных раком толстой кишки	57
3.7 Содержание десквамированных CD45 ⁺ CD146 ⁺ эндотелиоцитов в периферической крови у больных раком толстой кишки	60
3.8 Связь содержания галектинов 1 и 3 в плазме крови и опухолевой ткани с ростовыми факторами и дисфункцией эндотелия у больных раком толстой кишки	61
3.9 Связь содержания галектинов 1 и 3 в плазме крови и опухолевой ткани с показателями фенотипического дисбаланса моноцитов крови и макрофагов опухоли у больных раком толстой кишки	64
3.10 Связь исследуемых параметров с клиническим распространением опухоли и степенью злокачественности у больных раком толстой кишки	68
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

ВВЕДЕНИЕ

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]. В развитых странах риск развития РТК составляет 3–5 %, а при наличии семейного анамнеза заболевания, этот риск увеличивается более, чем в два раза. В последние годы отмечается тенденция к росту заболеваемости РТК среди лиц младше 40 лет.

Ключевую роль в патогенезе опухолевой прогрессии играет опухолевое микроокружение (Tumor Microenvironment – TME), сформированное посредством перекрестного взаимодействия злокачественно трансформированных клеток и «здоровых клеток». Компоненты TME включают стромальные клетки, эндотелиоциты, клетки врожденного и адаптивного иммунитета, а также белки внеклеточного матрикса, цитокины, факторы роста и др. [Airolid 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 с двухвалентной или поливалентной структурой, реализующие свои свойства как внутри клетки, так и за ее пределами [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 с последующим образованием поливалентной решетки, 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 (компонентов TME) и индуцировать их дифференцировку по альтернативному M2-пути. Согласно

сведениям F. Chou et al. (2018), макрофаги с иммунофенотипом M2 составляют основную массу опухоль-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 и обуславливать снижение противоопухолевого иммунитета, способствуя тем самым прогрессии новообразования [Чердынцева Н.В. и соавт., 2017].

Макрофаги в составе TME имеют в основном гемическое (моноцитарное) происхождение. Данные современной литературы, касающиеся генезиса и функций различных субпопуляций моноцитов и макрофагов моноцитарного происхождения, неоднозначны. Предположительно, $CD14^{++}CD16^{-}$ классические и $CD14^{++}CD16^{+}$ промежуточные моноциты характеризуются провоспалительными свойствами, а $CD14^{+}CD16^{++}$ неклассические (или патрулирующие) моноциты обеспечивают репаративную функцию в отношении эндотелия. По данным литературы, моноциты и макрофаги могут принимать участие в реализации индукции механизмов ангиогенеза [Anthony S., 2014; Zhang R. et al., 2024].

Ключевым фактором ангиогенеза является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF – vascular endothelial growth factor), проявляющий митогенную активность в отношении эндотелиоцитов и действующий через специфический рецептор (vascular endothelial growth factor receptor – VEGFR). Наиболее изученный рецептор VEGFR-A участвует в хемотаксисе моноцитов и стимулирует высвобождение эндотелиоцитами ростовых факторов. Другие молекулы семейства VEGF-C и VEGF-D опосредуют главное свойство данного цитокина – образование новых сосудов [Yun L. et al., 2022]. VEGF-опосредованное усиление опухолевого неоангиогенеза проявляется увеличением проницаемости сосудистой стенки,

предрасполагая к формированию регионарных и отдаленных метастазов, и прогрессии опухоли [F. Bertolini et al., 2006; Melincovici C. et al., 2018].

Подобно VEGF-зависимой стимуляции неоангиогенеза, передача внутриклеточного сигнала в клетку возможна при активации рецепторов к эпидермальному фактору роста EGF (epidermal growth factor receptor – EGFR), который регулируют процессы пролиферации, дифференцировки, апоптоза, миграции и внутриклеточного метаболизма опухолевых клеток [Wang Z., 2017; Sabbah A et al., 2020]. По мнению Z. Wang (2017), гиперактивация EGFR лигандами ассоциирована с неблагоприятным прогнозом опухолевого заболевания [Wang Z., 2017].

Функциональная неполноценность вновь образованных сосудов в ткани опухоли сопровождается развитием эндотелиальной дисфункции, патогномоничным 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 накопленным к настоящему времени существенным объемом сведений литературы о структуре и функциях данных белков [Hittelet A. et al., 2003; Uhlén M. et al., 2005; Watanabe M. et al., 2008; Козич Ж.М. и соавт., 2020]. Известно, что галектины, не имея собственных рецепторов на клетках, способны модулировать взаимодействие мембранных рецепторов с цитокинами, хемокинами и ростовым факторам [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 [Pinho S., 2015]. Другие авторы демонстрируют способность галектинов регулировать кооперативное взаимодействие компонентов опухолевого микроокружения (ТМЕ), включающего гетерогенную популяцию стромальных, трансформированных и иммунных клеток, в том числе макрофагов [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 [Chou F. et al., 2018].

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, что способствует преодолению клетками гипоксии с последующей метаболической адаптацией и формированием иммуносупрессорного микроокружения [Bertolini F. et al., 2006; Zhang R. et al., 2024].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в изучении молекулярных механизмов канцерогенеза, недостаточно исследованными до сих пор остаются отдельные аспекты синергического взаимодействия галектина-1 и галектина-3 с проангиогенными ростовыми факторами EGF и VEGF в регуляции функций иммунокомпетентных клеток ТМЕ. В частности, 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, несмотря на имеющиеся в современной литературе сведения о роли галектинов в механизмах прогрессии опухоли, вклад данных молекул 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-го и 3-го типов на дисбаланс субпопуляций моноцитов периферической крови во взаимосвязи с проангиогенными факторами, показателем эндотелиальной дисфункции и клинико-морфологическими 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. Продемонстрировано 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 внутриопухолевых 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Этиология и патогенез рака толстой кишки

Злокачественные новообразования (ЗНО) являются одной из ведущих причин смерти в мире. По данным ВОЗ в 2020 году смертность от злокачественных опухолей составила 10 млн человек, что соответствует одной шестой от числа всех смертельных случаев в мире. Рак толстой кишки (РТК) занимает третье место в структуре онкозаболеваемости с показателем 1,93 млн случаев за 2020 год, при этом смертность по причине РТК составила 916 тысяч случаев [Sung H. et al., 2021; Rebecca L. et al., 2023].

Показатели онкозаболеваемости в Российской Федерации соответствуют таковым в мире. В России на конец 2021 года в учреждениях онкологического профиля под диспансерным наблюдением находились 3 940 529 человек, из них 34 % – трудоспособного возраста, 57 % больных состояли на учете 5 лет и более. Пациенты с верифицированным РТК составили 10,5 % всего контингента и 9,9 % среди наблюдавшихся более 5 лет. Летальность на первом году с момента установления диагноза составила 19,2 % при раке прямой кишки и ректосигмоидного соединения и 23,1 % – при раке ободочной кишки. Несмотря на значительные усилия по модификации первичной и специализированной помощи пациентам, значительных изменений в показателях летальности за последние 5 лет не отмечено.

В целом, наблюдается тенденция к росту заболеваемости ЗНО в России и мире. В 2021 году показатель распространенности ЗНО составил 2 690,5 на 100 000 населения, что на 32,6 % (2 029,0) оказалось выше уровня 2011 года. Рост данного показателя связан как с увеличением частоты заболеваемости и выявляемости болезни, так и с увеличением средней продолжительности жизни в популяции.

Примечательно, что даже рак прямой кишки, который является новообразованием визуальной локализации, имеет высокие показатели

запущенности. В половине случаев (48,9 %) заболевание регистрируется в распространенных стадиях (III и IV). Показатели активной выявляемости варьируют в зависимости от региона России, в среднем доля опухолей толстой кишки, выявленных активно, составляет 14-18 % [Каприн А.Д. и соавт., 2022].

Рак толстой кишки – многофакторное заболевание, которое носит чаще спорадический характер (60-65 % случаев), реже оно обусловлено наследственными факторами (35-40 %). В развитии данной патологии изучен вклад различных факторов риска – внешних, т.е. модифицируемых, и внутренних, которые являются неотъемлемыми особенностями организма.

Об этиологическом влиянии окружающей среды свидетельствует неоднородность заболевания в разных странах. Так, в странах с западным типом диеты, богатой простыми углеводами и жирами, продуктами переработанного красного мяса, с большим содержанием поваренной соли, заболеваемость РТК наиболее высока [Vieira A. et al., 2017; Schwingshackl L. et al., 2018]. Данная закономерность обусловлена присутствием в красном мясе и продуктах его переработки канцерогенов (нитрозные соединения, гетероциклические амины, полициклические ароматические вещества, гемовое железо), которые образуются в процессе приготовления [Cascella M. et al., 2018]. Такой тип питания также ассоциирован с возникновением метаболического синдрома и инсулинорезистентности, которые сами по себе имеют негативный вклад в риск развития РТК и снижение выживаемости, если риск возникновения рака уже реализован. Также в литературе описана взаимосвязь частоты возникновения ЗНО этой локализации с дефицитом физической активности, в особенности, в случаях раннего возникновения РТК. Факторы, лежащие в основе данных наблюдений, исследователи связывают с пролиферативным действием инсулина на клетки слизистой оболочки толстой кишки и стимулирующим действием в отношении метастазирования [Vallis J. et al., 2021], с повышенным уровнем половых гормонов, которые также являются индукторами канцерогенеза [Lynch B., 2010]. Отдельно, в качестве факторов риска, исследователи выделяют алкоголь и курение. Метаболит

этанола – ацетальдегид – проявляет прямое канцерогенное действие на клетки эпителия органов желудочно-кишечного тракта и увеличивает заболеваемость не только РТК, но и плоскоклеточными раками слизистой полости рта, ротоглотки и пищевода. С приемом алкоголя также связан дефицит витамина В9 (фолиевой кислоты), ведущего к нарушению синтеза и репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [Cheng X. et al., 2016]. Табачный дым содержит ариламины, полициклические углеводороды и нитрозамины, которые служат индукторами активирующих мутаций в гене *KRAS* (Kirsten rat sarcoma virus) и гене *BRAF* (B-rafproto-oncogene) [Sierra M., 2016].

Противоположные наблюдения демонстрируют эпидемиологические исследования, проведенные в странах, где рацион питания включает большее количество фруктов и овощей, клетчатки, белого мяса, рыбы и молочных продуктов [Chapelle N. et al., 2020]. Положительную роль в профилактике данного заболевания играют физические нагрузки. Механизмы профилактического эффекта физических нагрузок изучены недостаточно. Предположительно, решающее значение имеет ускорение перистальтики кишечника и времени прохождения химуса по кишке, что, в свою очередь, уменьшает время контакта потенциальных канцерогенов со слизистой кишки [Aleksandrova K., 2011], а также профилактика метаболического синдрома.

Риск развития РТК в развитых странах в среднем составляет 3–5 %. Однако, при наличии семейного анамнеза заболевания, этот риск становится выше в два раза. В случае же выявления РТК у одного из членов семьи в возрасте до 50 лет данный риск оказывается выше более чем в три раза.

Возникновение РТК может быть ассоциировано с наследственными мутациями или не иметь связи с наследственностью.

Самым часто встречающимся наследственным синдромом, ассоциированным с 4 % всех случаев РТК, является синдром Линча [Aung K. et al., 2017]. Генами, ответственными за данное заболевание, являются *MLH1* (50 %), *MSH2* (37 %), *MSH6* (7 %), *PMS2* (3 %) и *EPCAM* (3 %) [Peltomäki P., 2003]. Эти

гены участвуют в системе репарации неспаренных оснований (mismatch repair, MMR), которые осуществляют удаление мутаций (делеции, инсерции, замены нуклеотидов), возникающих во время репликации нуклеиновых кислот. Транслокации хромосом, делеции и инсерции, затрагивающие область перечисленных генов, приводят к нарушению функции MMR и развитию заболевания. Синдром Линча связан с повышенным риском возникновения не только РТК (до 82 %), но и ЗНО других локализаций, таких как желудок (13 %), желчные протоки, тонкая кишка, верхние отделы мочевыводящих путей, кожа, головной мозг, яичники (12 %) и эндометрий (60 %) [Kohlmann W. et al., 2018].

Синдром Линча часто называют наследственным неполипозным колоректальным раком (ННКРР). Он наследуется аутосомно-доминантно, однако, даже в случае наследования пациентом от родителей герминальной мутации, для развития заболевания необходимо наличие повреждения второй, интактной копии гена в результате спонтанной соматической мутации [Clark S. et al., 2020]. Как следствие этих событий, клетка приобретает онкогенный потенциал, так как нарушен механизм репарации ДНК, и со временем, по мере деления образовавшегося клона, накапливаются патогенные изменения в онкогенах и генах-супрессорах опухолевого роста. Характерной особенностью опухолевой ткани при синдроме Линча являются микросателлитная нестабильность (microsatellite instability – MSI), так как микросателлитные участки ДНК в наибольшей степени чувствительны к нарушениям в системе репарации [Ishida H. et al., 2018], низкая дифференцированность клеток опухоли, муцинозный гистологический вариант и высокая частота полиплоидий [Overman M. et al., 2017].

В случае спорадического (ненаследственного) РТК заболеванию, как правило, предшествуют аденоматозные полипы или аденомы. Аденомы – это бессимптомные доброкачественные поражения, которые протекают без жалоб пациента и обычно выявляются при проведении колоноскопии. Аденомы толстой кишки различны по морфологии, процент малигнизации наиболее высок в случае так называемой зубчатой (зазубренной, пилообразной) аденомы. Данная опухоль

представлена двумя различными по гистологической картине видами: зубчатая аденома на широком основании, более распространенная в случае мутаций в гене *BRAF* и *CIMP*-фенотипе и традиционная зубчатая аденома, которая наиболее характерна при наличии мутантных генов *BRAF* и *KRAS* [Bettington M. et al., 2015]. Другие типы аденом – тубулярная, villезная и тубуло-villезная имеют различную степень дисплазии ткани, от легкой до тяжелой. В случаях тяжелой дисплазии, особенно, в сочетании с villезным компонентом и размером образования 1 см и более, риск опухолевой трансформации наиболее высок [Tanaka T., 2009]. В основе данных процессов лежит мутация антионкогена APC (adenomatous polyposis coli), осуществляющего регуляцию пролиферации путем связывания бета-катенина, ингибирования апоптоза и контроля клеточного цикла. Мутантный тип белка APC не способен связывать и разрушать бета-катенин, в результате чего последний запускает каскад реакций, в результате чего происходит индукция пролиферации [Fodde R. et al., 2001]. В свою очередь, стимуляция клеточной пролиферации, трансформации и дедифференцировки происходят в следствие мутации гена *KRAS*, а трансформация аденомы в рак – в следствие мутации гена-супрессора *TP53* [Grady W. et al., 2002].

В патогенезе колоректального рака предрасполагающим фактором является также хроническое воспаление, сопровождающее такие заболевания, как язвенный колит и болезнь Крона. РТК, ассоциированный с колитом (КАР, колит-ассоциированный рак), развивается у 20 % больных воспалительными заболеваниями кишечника в течение 30 лет, имеет преимущественно мультицентричный рост, низкую степень дифференцировки и высокую инвазивность. Нередко поражение имеет первично-множественный характер, синхронный или метакронный [Кит О.И. и соавт., 2024]. Сигнальные пути, претерпевающие изменения как при КАР, так и при «невоспалительном» РТК, общие и связаны с мутациями ранее упомянутых генов *KRAS*, *BRAF*, *TP53* и гена *CTNNB1*, который кодирует бета-катенин, являющийся индуктором пролиферации [Fodde R. et al., 2001]. Отличительной особенностью КАР, в сравнении с РТК, не

ассоциированным с воспалением, является наличие травм слизистой, участков дисплазии и отсутствие предшествующего формирования четко определенной аденомы через последовательность этапов: хроническое воспаление – травма – дисплазия – РТК.

Сформировавшаяся на фоне хронического воспаления опухоль толстой кишки морфологически характеризуется выраженной инфильтрацией иммунокомпетентными клетками, которые в свою очередь являются источниками про- и противоопухолевых факторов, провоспалительных цитокинов и хемокинов. В качестве примера, $CD4^+$ (CD – cluster of differentiation, кластер дифференцировки) и $CD8^+$ Т-лимфоциты проявляют противоопухолевую активность, продуцируя IFN (interferon, интерферон) γ , обладающий антипролиферативным действием в отношении как нормальных, так и опухолевых клеток, а также способный модулировать апоптозиндуцирующую активность TNF (tumor necrosis factor, фактора некроза опухоли) α , проявлять антиангиогенное действие, тем самым ограничивая рост опухоли. Однонаправленным действием обладает IL (interleukine, интерлейкин) 6, продуцируемый Т-лимфоцитами, мононуклеарными фагоцитами, эндотелиальными клетками и являющийся плеiotропным цитокином, играющим центральную роль в торможении опухолевого роста и воспаления. Вместе с тем, в литературе содержатся данные о способности IL-6 потенцировать рост отдельных опухолей, таких как миелома, рак шейки матки, рак почки и рак молочной железы, аденокарцинома предстательной железы и РТК в эксперименте при условии экспрессии рецепторов к IL-6 на поверхности опухолевых клеток [Фрейдлин И.С., 2001].

Еще одной отличительной чертой опухолей нижних отделов кишечного тракта является участие микробиоты. Изучение роли микробиоты в патогенезе РТК затруднено вследствие того, что от момента появления изменений в структуре микробного сообщества, формирующего предопухолевую среду, до появления клинически обнаруживаемой опухоли, может пройти 30 и более лет, и на момент исследования микробиом претерпевает многие изменения. В связи с этим большая

часть исследований посвящена описанию особенностей микробиоты у пациентов с уже реализовавшимся РТК. Установлено, что патогенезе колоректального рака участвуют многие виды микроорганизмов, не только патогенные, но и представители нормальной микрофлоры, такие как *Escherichea coli* и *Enterococcus faecalis*. По мнению ученых, решающим фактором является изменение соотношения отдельных видов бактерий в микробиоме. Патогенное действие *Escherichea coli* объясняется избыточной выработкой супероксида, индуцирующего перекисное окисление липидов и повреждение нуклеиновых кислот, а также колибактина, обладающего эффектом индуктора пролиферации опухолевых клеток [Cougnoux A. et al., 2014]. Еще одна бактерия *Campylobacter jejuni*, патогенная для человека, продуцирует токсины, вызывающие двуцепочечные разрывы ДНК. По сведениям O. Martin et al. (2019), микроорганизмы рода *Salmonella* также продуцируют генотоксин и токсин брюшного тифа, повреждающие ДНК эпителиоцитов толстой кишки [Martin O. et al., 2019]. Противоположное значение имеет *Enterococcus faecalis*. Являясь представителем нормальной флоры человека, микроорганизм играет защитную роль, особенно у детей раннего возраста, за счет индукции выработки IL-10 [Are A. et al., 2008] и подавления секреции провоспалительного IL-8. Препараты, содержащие штамм *Enterococcus faecalis*, применяются в качестве пробиотиков и в пищевом производстве [Franz C. et al., 2011].

Таким образом, патогенетические факторы, предшествующие появлению опухолевого клона, формируют среду, которая в свою очередь оказывает реципрокное влияние на рост опухоли и ее прогрессию.

1.2 Опухолевое микроокружение

Ключевое значение в поддержании роста опухоли и опухолевой прогрессии имеет опухолевое микроокружение (tumor microenvironment –TME) [Xiao Y. et al., 2020]. Микроокружение опухоли образуется при формировании перекрестных

связей между злокачественно трансформированными клетками и здоровыми клетками организма: стромальными, эндотелиальными, иммунными. К ТМЕ относят также внеклеточные молекулы, а именно белки внеклеточного матрикса, цитокины, хемокины, факторы роста и др. [Airoldi I. et al., 2015; Wang H. et al., 2021]. Влияния в ТМЕ осуществляются как аутокринно посредством активации опухолевых клеток через сигнальные молекулы, так и паракринно – путем стимуляции нормальных клеток к выработке ростовых факторов, которые будут передавать сигнал опухолевой клетке [Hanahan D. et al., 2011].

Помимо клеточного компонента ТМЕ на развитие опухоли влияют продуцируемые клетками цитокины. Так, продуцируемый опухолью IL-10 способствует агрессивному течению процесса и низкой выживаемости больных за счет угнетения активности цитотоксических Т-лимфоцитов и иммуносупрессивного эффекта, с одновременным усилением способности опухолевых клеток к миграции и пролиферации [Lane D. et al., 2018]. IL-10 совместно с TGF (transforming growth factor, трансформирующий фактор роста) β способен подавлять TLR-опосредованную активацию В-клеток за счет ингибирования в них окислительного фосфорилирования и гликолиза [Komai T. et al., 2018]. Таким образом, злокачественно трансформированные клетки модифицируют свое микроокружение на метаболически более выгодное, а канцерогенез поддерживается межклеточными взаимодействиями внутри вновь сформированной опухолевой ткани [Rivera C. et al., 2014].

Согласно данным современной литературы, значение разных клеток, составляющих ТМЕ, неоднозначно. Некоторые авторы связывают увеличение количества CD3⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в опухолевой ткани, которое чаще наблюдается при высокодифференцированных опухолях и сопровождается меньшей вероятностью метастазирования, с более благоприятным прогнозом заболевания [Hedal D., 2016], в том числе при солидных опухолях [Hendry S. et al., 2017]. По мнению ученых, данная взаимосвязь закономерна при инфильтрации лимфоцитами тканей в непосредственной близости опухолевого узла, в то время

как при лимфоцитарной инфильтрации опухолевой ткани в ее периферических отделах подобной взаимосвязи выявлено не было.

Важным компонентом опухолевого микроокружения являются макрофаги, демонстрирующие фенотипическую гетерогенность и пластичность. По сведениям P. Su, макрофаги, ассоциированные с опухолью (tumor-associated macrophages, TAM), взаимодействуют с другими клетками TME, трансформируются и приобретают проопухолевый фенотип [Su P., 2024]. TAM участвуют в опухолевой прогрессии, ангиогенезе, метастазировании и иммуносупрессии, а также реализации механизмов резистентности к противоопухолевому лечению [Su P., 2024]. Кроме этого, TAM обладают опухолецидным потенциалом, регулируя медиатор-зависимую цитотоксическую элиминацию и фагоцитоз злокачественно трансформированных клеток. Опухолевые макрофаги могут взаимодействовать с другими иммунокомпетентными клетками врожденного и адаптивного иммунитета [Mantovani A. et al., 2017; Cassetta L. et al., 2018]. Результаты других исследований указывают на тесную связь между высокой инфильтрацией TAM и прогрессией опухолевого роста, включая ангиогенез опухоли, метастазирование и иммуносупрессию, а также резистентность к терапии [Locati M. et al., 2020; Guo S. et al., 2022]. По мнению многих авторов, высокий уровень инфильтрации ткани опухоли макрофагами в значительной степени связан с негативным прогнозом заболевания [Zhang M. et al., 2014; Li X. et al., 2019; Larionova I. et al., 2020]. Влияние TME при перепрограммировании макрофагов на развитие и прогрессирование опухоли остается неясным.

Помимо прямого взаимодействия опухолевых и «здоровых» клеток, локализованных в непосредственной близости от опухолевого узла, вырабатываемые элементами TME цитокины привлекают в очаг фибробласты, миелоидные клетки и инициируют ангиогенез, способствуя образованию новых сосудов. Наличие развитой сети неопластических сосудов обеспечивает опухолевые клетки необходимыми метаболитами и является неблагоприятным прогностическим фактором в отношении быстрого роста опухоли и развития

отдаленных метастазов [Folkman J. et al., 2006]. Опухолевый неоангиогенез в значительной степени определяется участием клеток врожденного иммунитета и секретируемых ими цитокинов и хемокинов (IFN, IL, TNF, TGF и др.) [Acharia S.S. et al., 2024].

1.3 Ангиогенез и эндотелиальная дисфункция при опухолевых заболеваниях

Образование новых сосудов в опухоли, в отличие от ангиогенеза в нормальной ткани, имеет ряд морфологических особенностей, а именно, увеличенный размер межклеточных щелей между эндотелиоцитами во вновь образованных сосудах, их извитой ход, «слепые» ответвления, отсутствие перicyтов, «окончатость» и наличие повреждений сосудистой стенки [Matsumoto T., 2001]. Механизмы опухолевого неоангиогенеза включают прорастание сосудов, сосудистую мимикрию, инвагинацию сосуда, сосудистую кооптацию, ангиогенез из раковых стволовых клеток и костномозговых предшественников [Zhang R. et al., 2024]. Как опухолевые, так и стромальные клетки высвобождают ряд проангиогенных факторов: VEGF (vascular endothelial growth factor, сосудистый эндотелиальный фактор роста), EGF (epidermal growth factor, эпидермальный фактор роста), PDGF (platelet-derived growth factor, тромбоцитарный фактор роста), bFGF (fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов) и HGF (hepatocyte growth factor, фактор роста гепатоцитов), активирующих проангиогенные сигнальные пути [Acharia S.S. et al., 2024]. При опухолевом росте, когда высокая метаболическая активность опухолевых клеток не может быть удовлетворена, в них наблюдается активация синтеза факторов роста, в частности, HIF (hypoxia-inducible factor, гипоксия-индуцибельный фактор) 1 α , активирующего эндотелиальные клетки в близлежащих сосудах и привлечение костномозговых предшественников для индукции неоангиогенеза [Thijssen L. et al., 2024]. Одним из ангиогенных факторов является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor –VEGF), проявляющий митогенную активность в

отношении эндотелиоцитов и действующий через специфический рецептор (vascular endothelial growth factor receptor – VEGFR). Семейство молекул VEGF включает несколько представителей: VEGF-A, -B, -C, -D, -E, первый из которых изучен наиболее подробно. Рецепторы к VEGF-A подразделяются на 1 и 2 типы VEGFR-1 и VEGFR-2. Первый тип этого рецептора участвует в хемотаксисе моноцитов и стимулирует высвобождение эндотелиоцитами факторов роста. В свою очередь, VEGFR-2 является высокоафинным по отношению к VEGF-A, хотя может связывать и другие молекулы семейства – VEGF-C и VEGF-D, опосредуя главные свойства данного цитокина – образование новых сосудов и повышение проницаемости их стенок. Активирующее действие VEGF на ангиогенез подтверждено *in vitro* и *in vivo*. В экспериментальных исследованиях показано, что инактивация одного аллеля гена *VEGFA* у мышей приводила к таким негативным эффектам, как гибель эмбриона на сроке 11-12 дней, остановке роста лабораторных животных в возрасте 1-8 дней с последующей их гибелью, остановке роста костей, а также регрессу васкуляризации в раннем неонатальном периоде развития мышей. VEGF-A участвует в негативной регуляции синтеза белков Bcl-2, A1 и сурвивина, угнетающих апоптоз [Bertolini F. et al., 2006].

В патогенезе роста солидных опухолей VEGF-A является одним из звеньев «порочного круга», берущим начало с увеличения массы опухоли в результате деления трансформированного клона клеток. В результате несоответствия скорости роста опухолевого узла и развития сосудистой сети, неупорядоченности и извитости сосудистого русла, высокой проницаемости и неполноценности стенок новых сосудов, отсутствия деления сосудов на артериолы и вены, дефицита перicytes и наличия тупиковых ответвлений, неизбежно появление участков гипоксии в опухолевом узле. Последнее обуславливает выработку HIF1 α , который активирует экспрессию ростовых факторов VEGF, EGF, PDGF, TGF и транскрипцию ангиопоэтинов, способствуя высвобождению проангиогенных факторов опухолевыми клетками [Zhang R., 2024]. В свою очередь, VEGF стимулирует опухолевый неоангиогенез путем привлечения клеток-

предшественниц эндотелиоцитов и гемопоэтических клеток костномозгового происхождения, еще больше увеличивает проницаемость сосудистой стенки, что предрасполагает к развитию отдаленных метастазов, дальнейшему росту опухоли и усугублению гипоксии [Bertolini F. et al., 2006], которая является фактором агрессивного течения заболевания и резистентности опухоли к проводимой терапии (рисунок 1).

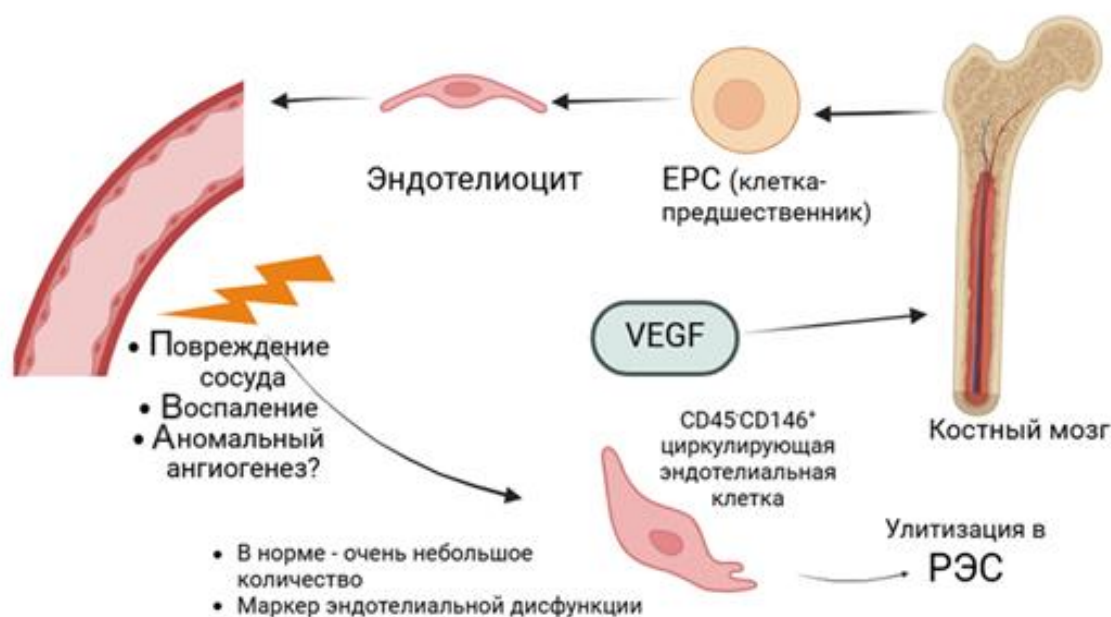


Рисунок 1 – Появление десквамированных эндотелиоцитов в периферической крови (оригинальная схема)

Примечание – EPC (endothelial progenitor cell) – эндотелиальная прогениторная клетка, VEGF (vascular endothelial growth factor) – сосудистый эндотелиальный фактор роста, РЭС – ретикуло-эндотелиальная система.

Помимо VEGF к факторам стимуляции ангиогенеза относится эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor – EGF), инициирующий передачу сигнала внутри клетки через комплементарный рецептор (epidermal growth factor receptor – EGFR). Данный ростовой фактор является

высокоаффинным лигандом для EGFR и секретируется многими клетками, в том числе эпителиоцитами, гладкими миоцитами, эндотелиоцитами и макрофагами [Singh B. et al., 2016].

EGFR относится к семейству ErbB (receptor tyrosine kinases) и состоит из трех доменов: внеклеточного лиганд-связывающего, трансмембранного гидрофобного участка и внутриклеточного тирозинкиназного домена [Mendelsohn J., Baselga J., 2006]. Известно, что в норме и при опухолевом процессе активность EGFR регулируется ростовыми факторами TGF и EGF. В результате лиганд-рецепторного взаимодействия данные факторы связываются с внеклеточным доменом, EGFR претерпевает димеризацию, запускается процесс фосфорилирования тирозиновых остатков внутриклеточного домена, и, как следствие, происходит индукция пролиферации и миграции, ингибирование апоптоза, синтез онкогенных белков, инициация инвазии и адгезии трансформированных клеток. Известно, что высокая экспрессия EGFR на поверхности клеток ассоциирована с неблагоприятным прогнозом опухолевого процесса [Niyaz M. et al., 2015]. Отдельные исследователи связывают наличие EGFR с вероятностью возникновения рецидива РТК и низкой выживаемостью больных [Galizia G. et al., 2007]. Основные механизмы активации EGFR-опосредованного пути в опухолевых клетках реализуются через гиперэкспрессию самого рецептора и повышенное содержание его лигандов TGF α и EGF, мутацию гена *EGFR* и гетеродимеризацию рецептора, при которой происходит образование другого рецептора семейства erbB – Her (human epidermal growth factor receptor) 2 и 3, что в значительной степени усиливает трансдукцию внутриклеточного сигнала [Jong J. et al., 1998; Ghosh S. et al., 2001].

Функциональная неполноценность опухолевых сосудов, их нестабильность и незрелость, неизбежно сопровождаются эндотелиальной дисфункцией. Последняя играет немаловажную роль в реализации системного воспалительного ответа, полиорганной недостаточности [Salluh J.I. et al., 2009] и образовании тромбов [Madoiwa S., 2009]. Ввиду этого некоторые авторы связывают эндотелиальную дисфункцию при опухолевых заболеваниях с повышенным риском операционных

осложнений и ухудшением прогноза заболевания [Олжаев С.Т. и соавт., 2022].

Биологическим маркером дисфункции эндотелия является появление в периферической крови десквамированных эндотелиоцитов с фенотипом CD45⁻CD146⁺ [Малютина Н.Н. и соавт., 2012; Гончаров и соавт., 2020; Kovalenko L., 2014]. Эндотелиальные клетки, обнаруживаемые в периферической крови здоровых людей, являются зрелыми клетками, отделившимися от внутренней оболочки сосуда при повреждении. В периферическом кровотоке их пул очень немногочисленный, так как даже в случае повреждения эндотелия они быстро удаляются из крови путем утилизации элементами ретикуло-эндотелиальной системы [Fadini G., 2010]. Многие авторы связывают увеличение численности таких десквамированных эндотелиальных клеток (ДЭК) в периферической крови с различными состояниями, в том числе инфекционными заболеваниями [Локтионова И.Л. и соавт., 2012], ишемической болезнью сердца [Вахрушева Ю.В. и соавт., 2015], в частности, при ишемической кардиомиопатии [Чумакова С.П., 2020], и опухолевым процессом [Kondo Sh., 2012]. При этом у больных с острой ишемией миокарда увеличение количества ДЭК оказалось независимым предиктором сердечно-сосудистых осложнений и летального исхода. В целом, определению численности и роли десквамированных эндотелиоцитов посвящено очень небольшое количество работ, и большинство из них посвящены изучению хронической сердечно-сосудистой патологии.

Значимым этапом ангиогенеза является адгезия моноцитов крови к активированным эндотелиальным клеткам артериол. Медиаторами данного взаимодействия являются адгезивные белки: селектины, молекулы межклеточной адгезии (intercellular adhesion molecule, ICAM-1, ICAM-2), экспрессируемые эндотелиоцитами, а также интегрины (macrophage antigen, MAC-1; lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1) моноцитов, экспрессию которых стимулирует VEGF, выделяемый эндотелиоцитами [Васильев И.С. и соавт., 2017].

В процессе ангиогенеза могут принимать участие и другие регуляторные молекулы, среди которых – ангиопоэтины и их Tie-рецепторы, тромбоцитарный

фактор роста (platelet-derived growth factor, PDGF-D), эфрины (ephrine-B, Eph-B) и их рецепторы, металлопротеиназы (matrix metalloproteinases, MMPs), а также активаторы плазминогена.

В настоящее время изучается роль галектинов, как возможных индукторов механизмов ангиогенеза [Васильев И.С. и соавт., 2017]. Галектин-3, по данным некоторых исследований, может экспрессироваться совместно с белками-переносчиками GLUT-1, например, при раке молочной железы и раке лёгкого, и экспрессия обоих белков повышается в гипоксичных опухолевых клетках, расположенных в непосредственной близости к некротизированным участкам опухолевой ткани [Oliveira J. et al., 2015]. Ответственными за сверхэкспрессию галектина-3 в клетках считаются HIF (hypoxia-inducible factor, гипоксия-индуцибельный фактор)-1 α и p53 [Ruvolo P., 2016; Cairns R., 2011]. S. Santos и соавт. (2017) сообщают, что галектин-3, экспрессия которого усиливается при гипоксии, является ключевым фактором в отношении индукции прорастающего ангиогенеза. В результате гипоксии и сопровождающего её изменения степени гликозилирования мембран эндотелиоцитов усиливается связывание галектина-3 и, как следствие, модуляция сигнального пути JAG1/Notch-1, что было подтверждено авторами в эксперименте *in vivo* [Santos S. et al., 2017].

Гиперэкспрессия галектина-3 может способствовать активации протоонкогенов Ras и Erk [Cairns R., 2011; Gao X. et al., 2014; Pavlova N. et al., 2015; Rinaldi G., 2018;]. Согласно *in vitro* исследованиям, галектины 1 и 3 могут оказывать влияние на пролиферацию и апоптоз клеток новообразования, их инвазивный и метастатический потенциал. Усиление синтеза галектина-3 при гипоксии продемонстрировано в эксперименте на клеточных линиях рака щитовидной железы, где повышение синтеза данного лектина было доказано при добавлении гипоксия-индуцибельного фактора (hypoxia-inducible factor, HIF-1 α) в культуральную среду. Исследовали также отметили, что при нокдауне галектина-3 в гипоксичной среде наблюдается подавление активности сигнальных путей Wnt, MAPK, Src, Rho, и способности злокачественных клеток к миграции [Zheng J.,

2017]. В остальном роль галектинов в механизмах опухолевого неоангиогенеза при РТК остается малоизученной.

1.4 Роль галектинов в регуляции неоангиогенеза и опухолевого микроокружения при злокачественных новообразованиях

Взаимодействие ТМЕ с клетками опухоли и регуляцию неоангиогенеза могут опосредовать особые белки – галектины – бета-галактозид-связывающие лектины с двухвалентной или поливалентной структурой, осуществляющие свою функцию как внутри клетки, так и за ее пределами [Ge X. et al., 2013]. Механизм действия галектинов связан с их способностью связываться с гликозилированными рецепторами на поверхности клеток с последующим образованием поливалентной решетки, модулирующей дальнейшее взаимодействие мембранных рецепторов с комплементарными лигандами и их интернализацию, тем самым модифицируя передачу внутриклеточного сигнала [Thiemann S., 2016; Nambiar D., 2019]. Учитывая особенность строения молекулы галектина, а именно, ее многовалентность, ожидаемо увеличение сродства этой молекулы ко многим лигандам, однако отдельные классы галектинов взаимодействуют лишь с некоторыми видами гликанов [Mariño K., 2023]. Галектин-1 преимущественно связывается с CD45, CD43, CD7, CD2, CD3, ганглиозидом GM1, ламинином и фибронектином. Взаимодействие галектинов с гликорепцепторами клеточной поверхности считается один из механизмов реализации их проопухолевого влияния [Girotti M., 2020]. Другим механизмом, описанным в 2018 году M. Gordon-Alonso, является галектин-зависимая модуляция экспрессии и секреции цитокинов, участвующих в реализации противоопухолевого иммунитета [Gordon-Alonso M., 2018]. В *in vitro* и *in vivo* экспериментах по изучению блокаторов галектина-3 было зарегистрировано снижение VEGF-опосредованного ангиогенного ответа, а также прямое взаимодействие между галектином-3 и VEGFR2 [Markowska A. et al., 2010], что демонстрировало возможность активации VEGFR альтернативными лигандами

[Porebska et al., 2021]. По сведениям J. Etulain et al. (2014), галектины 1 и 3 обладают свойствами индуцировать высвобождение VEGF тромбоцитами человека, стимулировать ангиогенные реакции, включая пролиферацию эндотелия и тубулогенез [Etulain J. et al., 2014].

В целом, галектины – это неспецифические белки, продуцируемые как здоровыми клетками организма, так и трансформированными, не имеющие собственных рецепторов на мембранах клеток (в отличие от цитокинов), однако способные играть значимую роль в регуляции основных свойств злокачественной клетки, способствуя ее выживанию, трансформации, метастазированию и опухолевому неоангиогенезу [Pinho S., 2015].

Галектины способны проявлять не только проангиогенную активность, но и действовать в отношении макрофагального звена иммунитета. Галектины 1-го и 3-го типов индуцировали дифференцировку макрофагов по альтернативному M2-пути, составляющих основную массу ТМА с «проопухолевым» значением, что может способствовать прогрессии новообразования [Chou F. et al., 2018]. Дифференцированные таким образом макрофаги, в свою очередь, сами активно синтезировали галектин-1 и галектин-3, в то время как классические, M1-активированные, макрофаги, напротив, характеризовались низким уровнем экспрессии данных лектинов [Novak R. et al., 2012]. Классическое деление макрофагов на две субпопуляции M1 и M2 не характеризует в полной мере разнообразие иммунофенотипов этих клеток, в том числе, из-за их пластичности [Сарбаева Н.Н. и соавт., 2016]. В зависимости от экспрессии поверхностных маркеров на мембране макрофагов, продуцируемых ими цитокинов и функций, M2-макрофаги подразделяются на подтипы: M2a, M2b, M2c и M2d. Макрофагам, несущим на своей поверхности CD206 и CD68 (M2d-фенотип), отводится роль опухоль-ассоциированных клеток, поддерживающих рост опухоли, ангиогенез и перестройку внеклеточного матрикса [Жгулева А.С. и соавт., 2024; Gharavi A.T. et al., 2022]. Изменение фенотипа макрофагов ТМЕ может обеспечивать ускользание опухоли из-под иммунного надзора и обуславливать снижение

противоопухолевого иммунитета, тем самым способствовать прогрессии новообразования [Чердынцева Н.В. и соавт., 2017]. Индукция дифференцировки макрофагов по M2-пути может быть опосредована ускорением гликолиза под действием экссомальной энолазы 2 опухолевого происхождения через сигнальный путь гликогенсинтазы-киназы $3\beta/\beta$ -катенин/c-Мус [Shao R., 2024], а также под влиянием галектина-1, так как он участвует в регуляции метаболизма аргинина и снижении выработки оксида азота [Фрейдлин И.С., 2001; Грачев А.Н. и соавт., 2018].

Известно, что пул опухоль-ассоциированных макрофагов, супрессорных клеток миелоидного происхождения, части дендритных клеток пополняется путем миграции 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 [Патышева М.Р. и соавт., 2019]. Многие исследователи предполагают, что свойства макрофагов зависят от статуса моноцитов крови, хотя роль моноцитов крови в формировании иммунофенотипа макрофагов до конца не изучена [Патышева М.Р. и соавт., 2019; Gong D. et al., 2012], а дифференцировка определяется при взаимодействии как с дистантными, так и локальными факторами микроокружения: ростовыми медиаторами, PAMP (pathogen-associated molecular pattern – молекулярные паттерны патогенов), продуктами опухолевого метаболизма и внеклеточным матриксом [Жгулева А.С. и соавт., 2024].

Одним из факторов хемотаксиса моноцитов может являться галектин-1. Его действие обусловлено модуляцией экспрессии Fc γ RI-рецептора, участвующего в фагоцитозе, и молекул главного комплекса гистосовместимости типа II (МСН-II), выполняющих функцию презентации антигена на поверхности антиген-презентирующей клетки [Wu K. et al., 2020].

Согласно классификации Международного союза иммунологических обществ, все моноциты крови могут быть разделены на три основные субпопуляции: $CD14^{++}CD16^{-}$ – классические, $CD14^{++}CD16^{+}$ – промежуточные и $CD14^{+}CD16^{++}$ – неклассические. Сведения современной литературы о происхождении и функциях отдельных субпопуляций моноцитов и макрофагов моноцитарного происхождения неоднозначны и являются предметом дискуссий. Предположительно, промежуточные и классические моноциты обладают провоспалительными свойствами, а неклассические – патрулирующими и обеспечивают репаративную функцию эндотелия. Увеличение численности неклассических $CD14^{+}CD16^{++}$ моноцитов исследователи также связывают с одной из их специфических функций – синтезом факторов роста, а промежуточных $CD14^{++}CD16^{+}$ моноцитов – продукцией $TNF\alpha$, играющего роль медиатора воспаления, ассоциированного с опухолевым процессом [Sindrila A. et al., 2011]. По данным ряда авторов, моноциты и макрофаги могут быть ответственными за индукцию ангиогенеза [Riabov V. et al., 2014; Jaipersad A. et al., 2013].

В целом, несмотря на высказываемые предположения и возможном влиянии галектинов на дифференцировку клеток, формирующих опухолевое микроокружение, роль галектинов 1 и 3 в механизмах дифференцировки моноцитов/макрофагов и регуляции ангиогенеза изучена недостаточно.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Клиническая характеристика обследованных пациентов

Исследование выполнено в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии (заведующий кафедрой – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН О.И. Уразова), Центральной научно-исследовательской лаборатории (руководитель – д-р мед. наук, профессор РАН Е.В. Удут) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, в отделении клинικο-диагностической лаборатории ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (ТООД) (руководитель – д-р мед. наук А.И. Дмитриева), отделении патологической анатомии ОГАУЗ «ТООД» (руководитель – Л.Э. Ерендеева).

Для проведения исследования получено разрешение локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ № 8881 от 22.11.2021 г. Набор пациентов для исследования осуществлялся при участии врачей-онкологов Е.С. Дроздова и К.А. Гамировой.

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) и соответствовали критериям включения в исследование, а именно: наличие верифицированного диагноза злокачественного новообразования толстой кишки, возраст от 45 до 75 лет. Диагноз рака толстой кишки (РТК) был установлен на основании данных клинических и клинικο-лабораторных методов исследования и верифицирован морфологически. Исследование морфологии новообразования и отнесение его к определенному гистологическому типу было выполнено в патологоанатомическом отделении ОГАУЗ «ТООД».

Все обследованные лица были проинформированы о дизайне экспериментальной работы и подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Описание распространенности опухолевого процесса у каждого отдельного пациента выполнялось в соответствии с классификацией по системе TNM (AJCC 8th Edition, 2018 г.). Распространение первичной опухоли (T) соответствовало T1, T2 у 3 (13,0 %) пациентов с РТК, T3, T4 – 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). У 13 человек (56,5%) ни регионарных, ни отдалённых метастазов выявлено не было. Распределение пациентов с РТК по клиническим стадиям представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение больных раком толстой кишки в соответствии с клинической стадией болезни

Клиническая стадия			
I	II	III	IV
4	9	5	5

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]. Опухоли разделяли на высокодифференцированные (более 95 % злокачественных клеток участвуют в образовании железистых структур), умереннодифференцированные (50-95 % клеток опухоли образуют железистые структуры) и низкодифференцированные (при уровне вовлеченности клеток в

формирование железистых структур 5-49 %). В случае если менее 5 % опухолевых клеток образовывали железистые структуры, опухоли относили к недифференцированным. Согласно данным морфологического исследования, у 21 (91,3 %) пациентов с РТК была диагностирована аденокарцинома высокой и умеренной степени дифференцированности, у 2 (8,7 %) больных – аденокарцинома низкой степени дифференцированности.

Получение материала для гистологического исследования осуществлялось на догоспитальном этапе до начала специализированной терапии.

В основную группу исследования вошли пациенты с РТК; группу сравнения составили 19 пациентов с доброкачественными опухолями – аденомами толстой кишки (АТК) – 9 мужчин и 10 женщин, средний возраст ($60,7 \pm 10,4$) лет, опухоль толстой кишки у которых была выявлена во время углубленной диспансеризации взрослого населения. Данная группа пациентов была направлена в ОГАУЗ «ТООД» с целью хирургического лечения аденом толстой кишки; у 18 пациентов была морфологически верифицирована тубулярная аденома (94,7 %), у 1 пациента – тубуловорсинчатая аденома (5,3 %).

Контрольную группу составили 17 практически здоровых доноров (группа здоровья II-IIIa) – 8 мужчин и 9 женщин в возрасте $64,0 \pm 9,2$ лет, приглашенных к участию после прохождения профилактического осмотра в ОГАУЗ «ТООД», у которых не наблюдалось состояний и патологических процессов, входящих в критерии исключения.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии опухолевыми клетками галектина-1, галектина-3, рецепторов к ростовым факторам – эпидермальному (EGFR) и сосудистому эндотелиальному (VEGFR), а также определение субпопуляционного состава макрофагов в ткани методом иммунофлуоресценции было выполнено на гистологических препаратах опухолевой ткани толстой кишки больных колоректальным раком (23 образца) и пациентов с аденомой толстой кишки (19 образцов). Измерение концентрации галектина-1, галектина-3, ростовых факторов – эпидермального (EGF) и сосудистого эндотелиального (VEGF), а также

определение относительного содержания моноцитов и количества десквамированных эндотелиоцитов в периферической крови проводили у 23 больных раком толстой кишки (5 мужчин и 18 женщин, средний возраст $63,8 \pm 9,4$ лет). Результат исследования концентрации плазменных факторов – галектинов 1 и 3, EGF, VEGF определяли также в группе из здоровых доноров – 7 мужчин и 10 женщин (средний возраст $62,0 \pm 11$ лет), а иммунофенотипирование моноцитов и подсчет числа десквамированных эндотелиальных клеток в периферической крови методом проточной цитофлуориметрии выполняли у 10 здоровых добровольцев – 6 мужчин и 4 женщин (средний возраст $64,0 \pm 9,2$ лет) (таблица 2).

Таблица 2 – Распределение обследованных лиц в соответствии с использованными методами исследования

Методы исследования	Группы обследованных лиц		
	Здоровые доноры	Пациенты с РТК	Пациенты с АТК
Оценка процентного содержания галектин-1 ⁺ и галектин-3 ⁺ опухолевых клеток, рецепторов к ростовым факторам - VEGFR, EGFR методом иммуногистохимии	–	23	19
Определение концентрации галектина-1, галектина-3, EGF, VEGF в плазме периферической крови методом иммуноферментного анализа	17	23	–
Определение относительного количества M1- и M2d-макрофагов в биоптатах опухолевой ткани методом иммунофлуоресценции	–	23	19
Иммунофенотипирование моноцитов и подсчет числа десквамированных эндотелиальных клеток в периферической крови методом проточной цитофлуориметрии	10	23	–

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. Заключение об отсутствии или наличии критериев исключения делалось на основании исследований, по поводу которых пациент обратился в ОГАУЗ «ТООД»: для основной группы и для группы сравнения - первичное обследование при постановке диагноза, для группы контроля – обследование в рамках профилактического осмотра.

2.2 Материал исследования

Материалом исследования служили биоптаты ткани толстой кишки, полученные вовремя фиброколоноскопии у пациентов с РТК и АТК. Полученные биоптаты фиксировали в двенадцатипроцентном растворе рН-нейтрального формалина, затем изготавливали парафиновые блоки в соответствии со стандартной методикой [Меркулов Г.А., 1996]. На микротоме из блоков изготавливали серии гистологических срезов толщиной 4-5 мкм, и с целью обзорной микроскопии использовали окраску гематоксилином-эозином (Непряхин Г.Г., 1964, Меркулов Г.И., 1996).

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

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 K_3 ЭДТА в качестве антикоагулянта.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Определение содержания галектин-1⁺, галектин-3⁺, VEGFR⁺ и EGFR⁺ опухолевых клеток

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).

Принцип метода основан на реакции лиганд-рецепторного взаимодействия, при котором немаркированное антитело фиксируется на искомом антигене (рецепторе) и далее осуществляется его идентификация с помощью вторичного меченного антитела. Добавление фермента и буферных растворов обуславливает накопление меченного продукта реакции.

На первом этапе пробоподготовки выполняли депарафинизацию срезов в ксилоле с последующей проводкой через спирты убывающей концентрации. Затем проводили демаскировку срезов на водяной бане при температуре 96 °С в растворе 1XTris-EDTA buffer solution в течение 20 мин, после чего раствор со стеклами остужали 15-20 мин при комнатной температуре. Блок BSA (bovine serum albumin) проходил во влажной камере: на образцы наносили 3 % раствор BSA и инкубировали 45 мин при комнатной температуре с последующей отмывкой в растворе фосфатно-солевого буфера. Гистологические срезы на стеклах были обведены гидрофобным карандашом, после чего были нанесены предварительно разведенные в 1 % BSA первичные антитела. Препараты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки стекол на них наносили вторичные антитела, разведенные в 1 % BSA/PBS1X в пробирке с УФ-защитой с последующей

инкубацией в течение 45 мин при комнатной температуре. После отмывки добавляли флуоресцентный ядерный краситель DAPI на каждый срез, срезы покрывали покровным стеклом.

Содержание опухолевых клеток, экспрессирующих галектин-1, галектин-3, VEGFR и EGFR, подсчитывали в «горячих точках» – участках максимальной экспрессии искомым галектинов, окрасившихся положительно, т. е. в зонах, соответствующих участкам максимальной экспрессии этих белков, вне зависимости от их локализации – на мембране клеток или в цитоплазме. Относительное количество положительно окрашенных опухолевых клеток выражали в процентах, оценивая мембранную и цитоплазматическую локализацию исследуемых лектинов. 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).

2.3.2 Определение иммунофенотипов макрофагов в опухолевой ткани

Оценку иммунофенотипов M1 (CD68⁺CD80⁺) и M2 (CD68⁺CD206⁺) макрофагов в опухолевой ткани у больных РТК и АТК оценивали методом иммунофлуоресценции.

Принцип метода основан на способности поверхностных антигенов клеточной мембраны специфически связываться с тропным к нему моноклональным антителом, меченным флуорохромом. Меченное антитело образует с антигеном комплекс «антиген-антитело», доступный для обнаружения посредством конфокальной микроскопии.

Иммунофлуоресцентное окрашивание парафиновых срезов осуществляли по стандартной методике [Меркулов Г.А., 1996]. Депарафинизацию проводили в

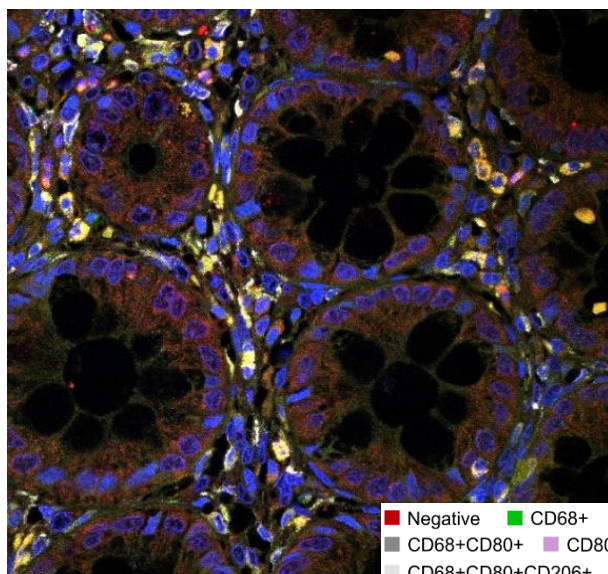
ксилоле с последующей отмывкой в спиртах, демаскировку парафиновых срезов – на водяной бане при 96 °С. Далее на образцы наносили 3 % раствор BSA и инкубировали 45 мин при комнатной температуре.

Для идентификации одновременной локализации CD68, CD206 и CD80 на макрофагах было выполнено тройное иммунофлуоресцентное окрашивание с последующим проведением конфокальной микроскопии.

Иммунофлуоресцентную окраску проводили с использованием следующего разведения первичных антител: моноклональные мышинные 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 козьи анти-CD206 (R&D Systems, AF2634, рабочее разведение 1:40, США). Использовали следующие комбинации вторичных антител – CD68/CD206/CD80: анти-мышинные AlexaFluor488-меченные, анти-кроличьи AlexaFluor555-меченные, анти-козьи AlexaFluor647-меченные (рабочее разведение всех вторичных антител 1:400). Для окрашивания ядер использовали флуоресцентный ядерный краситель DAPI (ab104135, Abcam, США) синего цвета и анализировали с помощью конфокального микроскопа (рисунок 2).

Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию выполняли на лазерном сканирующем спектральном конфокальном микроскопе Carl Zeiss LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Германия), оснащенном объективом 40×. Все трехцветные изображения были получены с использованием режима последовательного сканирования. Результаты были проанализированы с помощью программного обеспечения Black Zen и Qupath 0.4.4.

А)



Б)

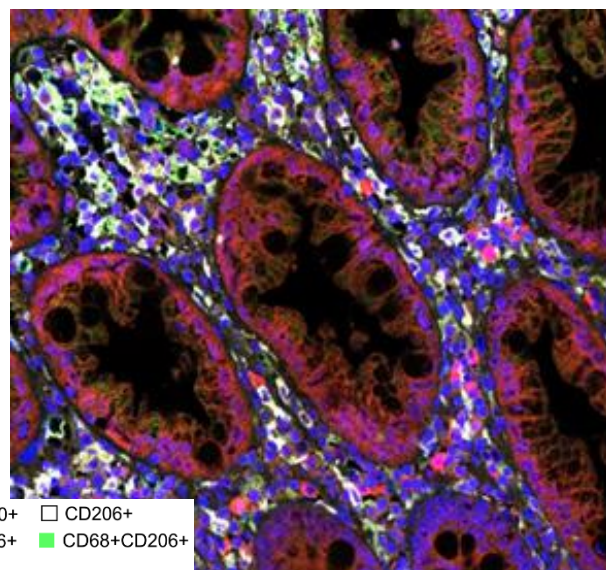


Рисунок 2 – Иммунофлуоресцентное окрашивание парафиновых срезов: А) при исследовании ткани аденомы; Б) при исследовании ткани аденокарциномы

Программное обеспечение QuPath (Великобритания, версия 0.5.1) использовали для анализа и количественной оценки экспрессии CD68, CD206 и CD80. Для каждого трехцветного изображения случайным образом были выбраны 6 областей, на которых производилось обучение нейронной сети распознавать положительную экспрессию маркера в трех разных каналах (рисунки 3, 4).

Впоследствии обученный алгоритм обнаружения положительной экспрессии трех маркеров CD68, CD206 и CD80 был применен ко всем изображениям с количественной оценкой каждого изображения на предмет определения CD68⁺, CD80⁺, CD206⁺, CD68⁺CD80⁺, CD80⁺CD206⁺, CD68⁺CD206⁺ и CD68⁺CD80⁺CD206⁺ клеток. Сначала по CD68 находили общее содержание макрофагов от всех клеток стромы. Затем среди CD68⁺ популяции высчитывали процент CD206⁺ (CD68⁺CD206⁺), CD80⁺ (CD68⁺CD80⁺) и CD206⁺CD80⁺ (CD68⁺CD80⁺CD206⁺) клеток.

Также отдельно было определено количество $CD68^+$ клеток, не экспрессирующих ни $CD80$, ни $CD206$, а также отдельно $CD80^+$ и $CD206^+$ клеток (негативных по $CD68$) внутри всей стромы.

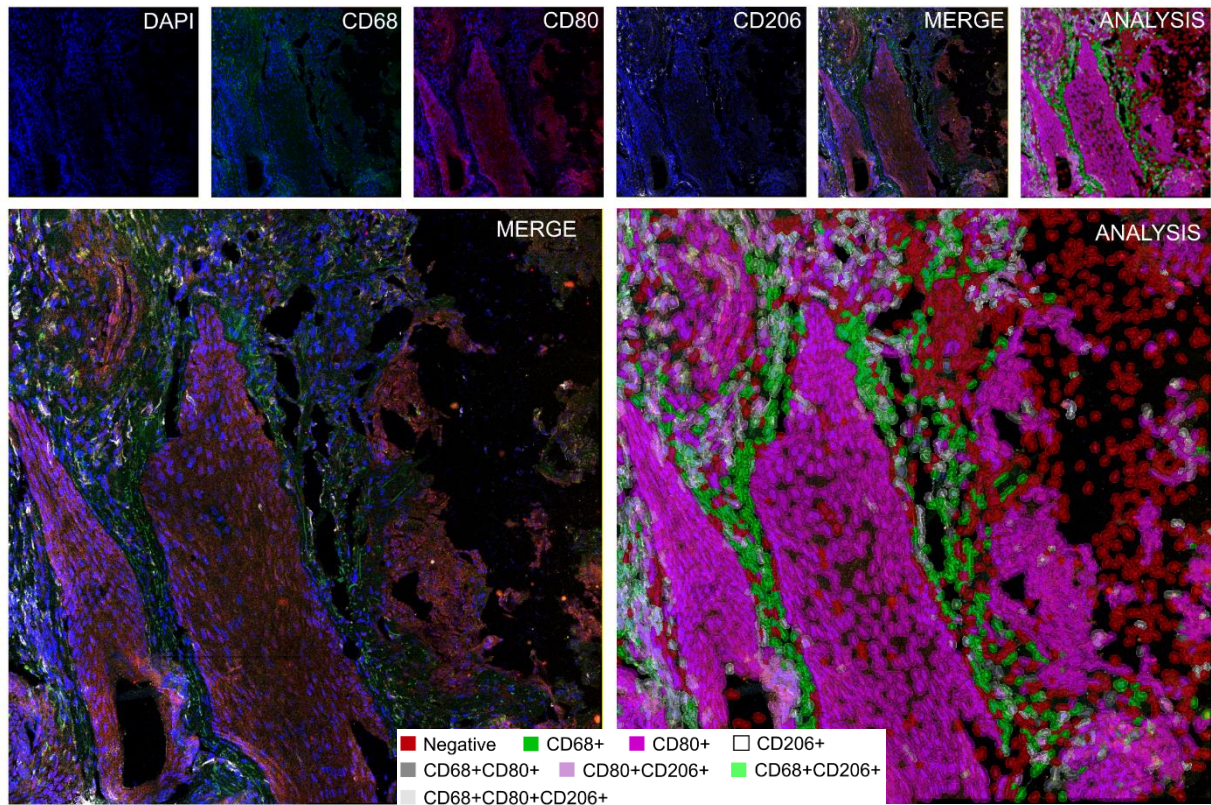


Рисунок 3 – Распознавание положительной экспрессии маркеров с помощью программного обеспечения QuPath при раке толстой кишки

Примечание – Здесь и в рис. 4: Merge – суммарное изображение, полученное путем объединения последовательных сканов, соответствующих каждому исследуемому маркеру; Analysis – изображение, полученное после программного анализа и используемое для количественной оценки экспрессии исследуемых маркеров; DAPI – изображение, полученное при окрашивании ядерным красителем DAPI.

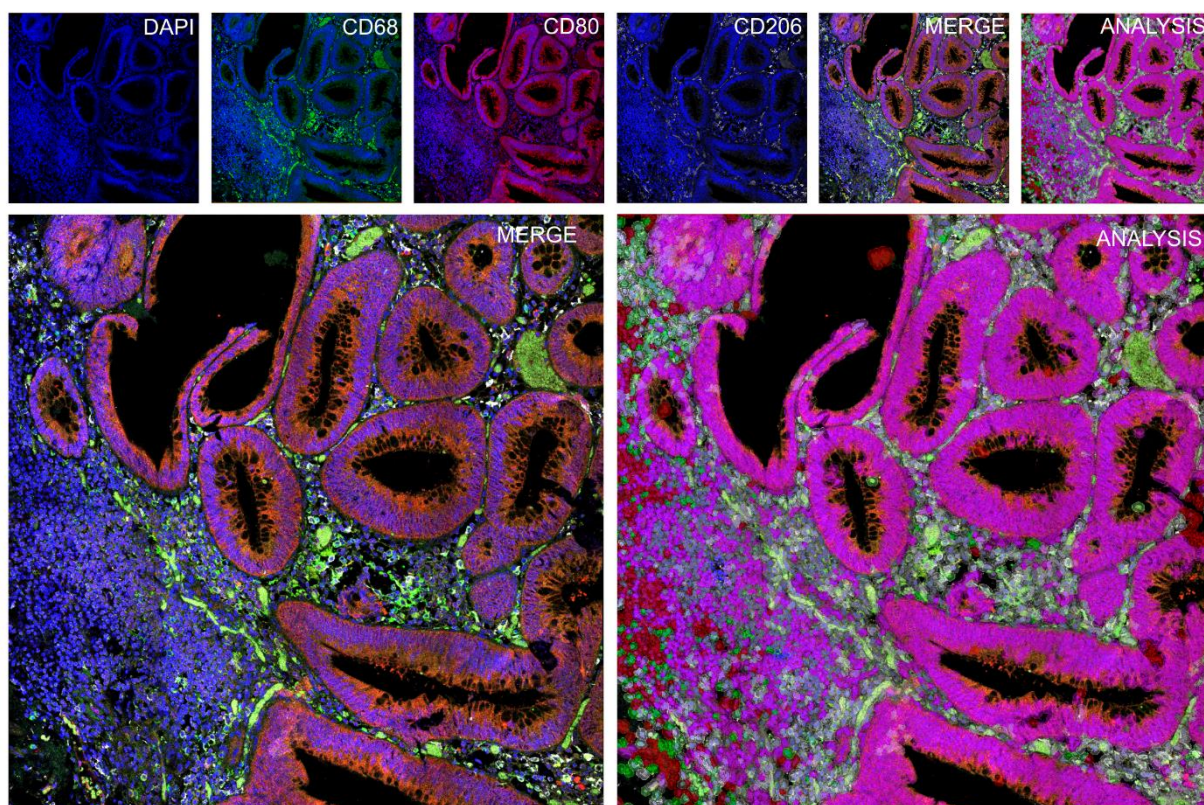


Рисунок 4 – Распознавание положительной экспрессии маркеров с помощью программного обеспечения QuPath при аденоме толстой кишки

Примечание – Merge – суммарное изображение, полученное путем объединения последовательных сканов, соответствующих каждому исследуемому маркеру; Analysis – изображение, полученное после программного анализа и используемое для количественной оценки экспрессии исследуемых маркеров; DAPI – изображение, полученное при окрашивании ядерным красителем DAPI.

По данным литературы, CD80 может экспрессироваться опухолевыми клетками [Scarpa M. et al., 2020; Vackova J. et al., 2021], в связи с чем на заключительном этапе работы было произведено исключение опухолевых клеток из анализа (рисунки 5 и 6) для получения достоверных результатов количественной оценки содержания иммунокомпетентных клеток в составе опухолевого микроокружения (рисунок 4).

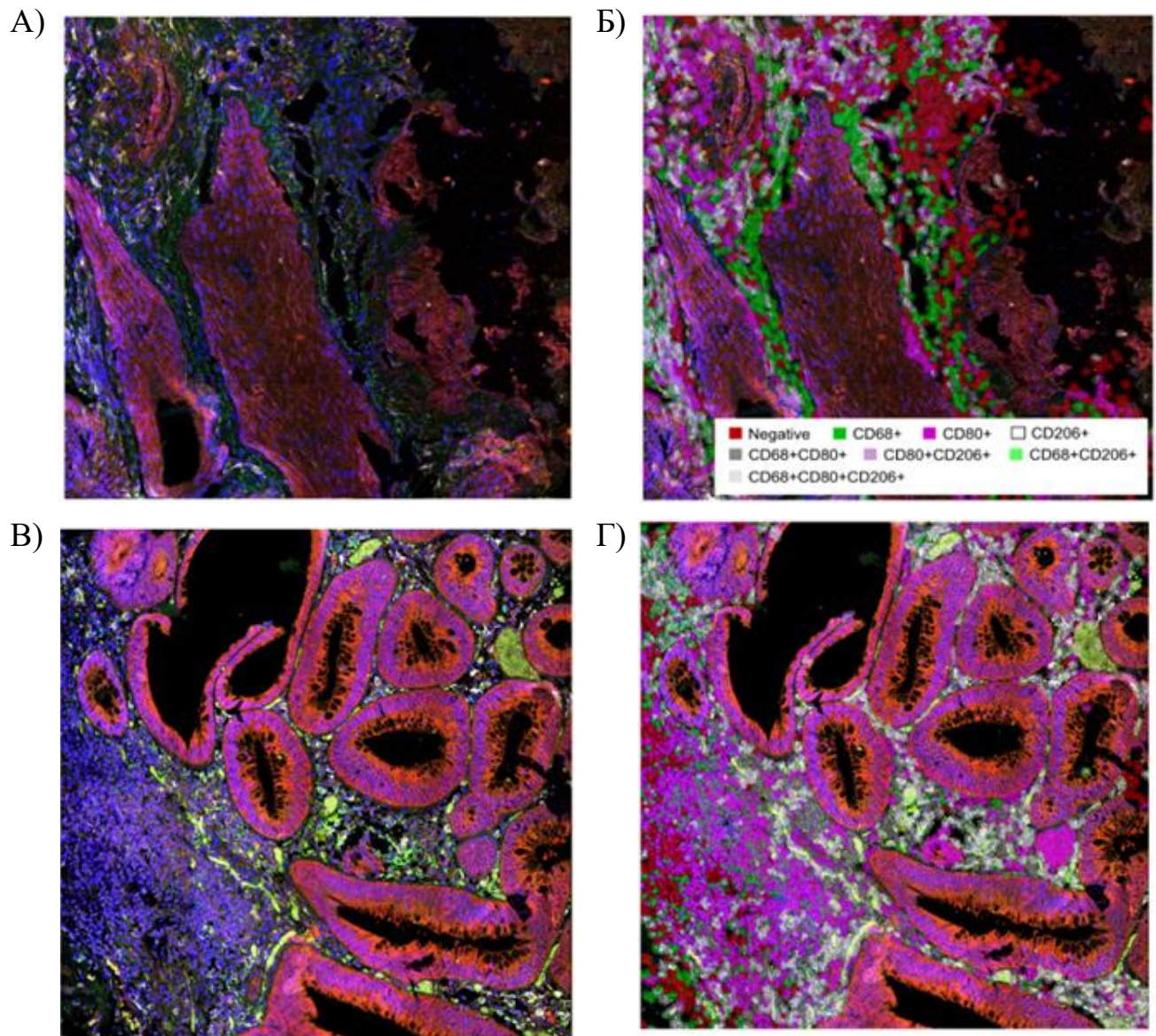


Рисунок 5 – Исключение опухолевой составляющей микроокружения из количественного анализа при раке толстой кишки (А, Б) и при аденоме толстой кишки (В, Г)

Примечание – А, В) суммарные изображения, полученные путем объединения последовательных сканов, соответствующих каждому исследуемому маркеру; Б, Г) изображения, полученные после исключения опухолевых клеток из анализа.

2.3.3 Определение концентрации галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической крови

Для измерения концентрации галектина-1 и галектина-3 в крови использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

Принцип метода основан на специфическом взаимодействии антигена и антитела с образованием иммунного комплекса и детекцией полученного продукта с использованием метки (фермента) с последующей спектрофотометрией.

Процедуру ИФА проводили с использованием наборов реагентов «Human Galectin-1 PicoKine ELISA Kit» и «Human Galectin-3 PicoKine ELISA Kit» по протоколу фирмы-производителя «BosterBio» (США). Для определения галектина-1 и галектина-3 в соответствующие лунки планшета добавляли стандартный раствор, контроль и образец плазмы крови в объеме 100 мкл с последующей инкубацией в течение 120 мин при комнатной температуре. После удаления жидкости в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора биотинилированных антител к галектину-1 и галектину-3. Инкубировали планшет в течение 90 мин при комнатной температуре с последующей трехкратной отмывкой промывочным буфером. После этого в лунки добавляли предварительно разведенный авидин-биотин-пероксидазный комплекс в объеме 100 мкл и инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре с последующей пятикратной отмывкой. Затем в каждую лунку вносили 90 мкл раствора тетраметилбензидина и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. По завершении инкубации для остановки реакции в пробы вносили стоп-реагент и сразу измеряли оптическую плотность содержимого ячеек планшета при длине волны 450 нм с использованием фотометра для микропланшетов «iMark» («BioRad», США). Концентрацию галектина-1 и галектина-3 определяли по калибровочной кривой. Результат выражали в нг/мл.

2.3.4 Определение концентрации EGF и VEGF в плазме периферической крови

Измерение концентрации EGF и VEGF в плазме периферической крови проводили методом ИФА (см. принцип метода в п. 2.3.3) с использованием наборов реагентов «Human EGF ELISA Kit» и «Human VEGF-A ELISA Kit» соответственно согласно протоколам фирмы-производителя «RayBio» (Китай).

Для оценки содержания EGF и VEGF в соответствующие лунки планшета добавляли стандартный раствор, контроль и образец в объеме 100 мкл с последующей инкубацией в течение 150 мин при комнатной температуре, осторожно перемешивая на шейкере. После удаления жидкости в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора биотинилированных антител к EGF и VEGF соответственно. Инкубировали планшет в течение 60 мин при комнатной температуре, осторожно перемешивая на шейкере с последующей четырехкратной отмывкой промывочным буфером. После этого в лунки добавляли предварительно разведенный раствор конъюгата HRP-стрептавидина в объеме 100 мкл и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре, перемешивая на шейкере, с последующей четырехкратной отмывкой. Затем в каждую лунку вносили 100 мкл раствора тетраметилбензидина и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. По завершении инкубации для остановки реакции в пробы вносили 50 мкл стоп-реагента и сразу измеряли оптическую плотность содержимого ячеек планшета при длине волны 450 нм с использованием фотометра для микропланшетов «iMark» («BioRad», США). Концентрацию EGF и VEGF определяли по калибровочной кривой. Результат выражали в нг/мл.

2.3.5 Оценка субпопуляционного состава моноцитов в периферической крови

Подсчет численности отдельных субпопуляций моноцитов крови выполняли методом проточной цитофлуориметрии.

В основе метода лежит окрашивание суспензии клеток флуоресцентными моноклональными антителами, которые при помещении в дисперсионную среду в лучах лазера способны испускать свет. Последний фокусируется, раскладывается на компоненты, улавливается детекторами прибора и преобразуется в сигналы, подвергаемые анализу.

На первом этапе пробоподготовки выполняли лизис эритроцитов по инструкции производителя («BD Bioscience», США). К 100 мкл цельной крови добавляли лизирующий раствор, разведенный дистиллированной водой в соотношении 1:10. После 20-минутной инкубации при комнатной температуре пробу центрифугировали 5 мин при 300 g и удаляли надосадок. После лизиса эритроцитов к 100 мкл полученной клеточной суспензии добавляли специфические моноклональные антитела: 20 мкл для CD14-FITC и 4 мкл для CD16-PE («BD Bioscience», США) с последующей инкубацией при температуре +4 °C в защищенном от света месте. Далее клетки отмывали раствором Cell Wash и центрифугировали в течение 5 минут при 300 g. После удаления надосадка в суспензию вносили «Stain Buffer» («Becton Dickinson», США) и приступали к исследованию проб. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре «Accuri C6» («BD Bioscience», США), снабженном аргоновым лазером ($\lambda = 488$ нм) и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного обеспечения «BD Cell Quest for MacOS® X». Определение каждой субпопуляции моноцитов производили, исходя из способности клеток экспрессировать на поверхностной мембране CD14 и CD16. Согласно данным литературы, CD14⁺CD16⁺⁺ моноциты считали неклассическими, CD14⁺CD16⁻ – классическими и CD14⁺⁺CD16⁺ – промежуточными. Результаты выражали в процентах, принимая за 100 % популяцию CD14⁺ клеток.

2.3.6 Исследование содержания десквамированных эндотелиоцитов в периферической крови

Подсчет числа десквамированных эндотелиальных клеток ($CD45^-CD146^+$) осуществляли методом проточной лазерной двухцветной цитофлуориметрии (см. принцип метода в п. 2.3.5) с применением антител к $CD45$, меченных фикоэритрином, и $CD146$, меченных изотиоцианатом, в соответствии с инструкцией производителя (BD Bioscience, США).

Содержание десквамированных эндотелиальных клеток в крови оценивали путем пересчета на общее количество лейкоцитов в крови ($CD45$ – общий лейкоцитарный маркер). Соотносили количество $CD45^+$ лейкоцитов, подсчитанных методом проточной цитофлуориметрии, с общим числом лейкоцитов в крови ($\times 10^9/\text{л}$) по формуле (1):

$$X = \frac{m \times \text{ОКЛ}}{n} \quad (1)$$

где X – количество десквамированных эндотелиальных клеток ($CD45^-CD146^+$) в 1 л крови ($\times 10^9/\text{л}$);

m – количество десквамированных эндотелиальных клеток ($CD45^-CD146^+$), подсчитанных на проточном цитофлуориметре (ед.);

n – общее количество лейкоцитов ($CD45^+$), подсчитанных на проточном цитофлуориметре (ед.);

ОКЛ – общее количество лейкоцитов в 1 л крови ($\times 10^9/\text{л}$), подсчитанное с помощью гематологического анализатора ABXPentra 80 («Horiba ABX», Франция).

Результаты анализа содержания десквамированных эндотелиоцитов в крови выражали в $\times 10^5/\text{л}$.

2.3.7 Статистический анализ результатов

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 $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе представлены результаты исследования взаимосвязи галектинов 1-го и 3-го типов с фенотипическим профилем моноцитов периферической крови и макрофагов опухолевой ткани, а также факторами неоангиогенеза при раке толстой кишки (РТК). Проанализированы особенности субпопуляционного состава гемических моноцитов и опухолеассоциированных макрофагов в зависимости от содержания галектинов-1,3 (внутри опухоли и крови), концентрации проангиогенных факторов (VEGF и EGF) в крови и экспрессии комплементарных им рецепторов в опухоли, численности десквамированных эндотелиальных клеток и клинико-морфологических характеристик опухолевого процесса.

При исследовании общего количества лейкоцитов и моноцитов в периферической крови (в абсолютных числах (абс.) и %) у пациентов с РТК и здоровых доноров были продемонстрированы сопоставимые значения данных параметров (таблица 3).

Таблица 3 – Общее количество лейкоцитов и моноцитов в периферической крови у больных раком толстой кишки ($M \pm SD$)

Показатель	Пациенты с РТК	Здоровые добровольцы
Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	$7,605 \pm 3,1$	$7,743 \pm 3,11$
	p = 0,899	
Моноциты (%)	$0,709 \pm 0,534$	$0,596 \pm 0,143$
Моноциты, $\times 10^9/\text{л}$	$5,391 \pm 1,655$	$4,614 \pm 0,444$
	p = 0,461	
Примечание – p – уровень статистической значимости различий.		

3.1 Экспрессия галектинов 1 и 3 в ткани опухоли у больных раком толстой кишки

У пациентов с колоректальным раком (РТК) методом иммуногистохимического анализа с последующей количественной оценкой была исследована экспрессия галектинов-1 и -3 в опухолевой ткани, результаты которой выражались в виде процентного содержания позитивных клеток. Количественный анализ продемонстрировал, что доля галектин-1-позитивных опухолевых клеток в группе РТК превышала аналогичный показатель у пациентов с аденоматозными образованиями толстой кишки в 3,0 раза. В противоположность этому, оценка относительного количества галектин-3-экспрессирующих клеток не выявила статистически значимых различий между группами больных с РТК и аденомами толстой кишки (АТК), показав сопоставимые значения (таблица 4).

Таблица 4 – Относительное содержание галектин-1- и галектин-3-позитивных опухолевых клеток у больных раком толстой кишки, Me (Q1; Q3)

Опухолевые клетки	Пациенты с РТК	Пациенты с АТК
Галектин-1 ⁺ (%)	33,5 (27,0; 55,0)	11,0 (5,0; 21,0)
	p < 0,001	
Галектин-3 ⁺ (%)	17,5 (7,0; 21,0)	15,0 (7,0; 21,0)
	p = 0,089	
Примечание – p – уровень статистической значимости различий.		

3.2 Концентрация галектинов 1 и 3 в периферической крови у больных раком толстой кишки

Галектины 1 и 3 могут вырабатываться как здоровыми клетками различных тканей организма – иммунокомпетентными, эндотелиоцитами, эпителиальными клетками, нейронами [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 данные продемонстрировали, что уровень галектина-1 в плазме периферической крови у пациентов с колоректальным раком составлял 16,5 нг/мл. Данный показатель статистически значимо ($U = 0,0$; $p < 0,001$) превышал значения контрольной группы (группы здоровых доноров) в 2,5 раза (рисунок 6).

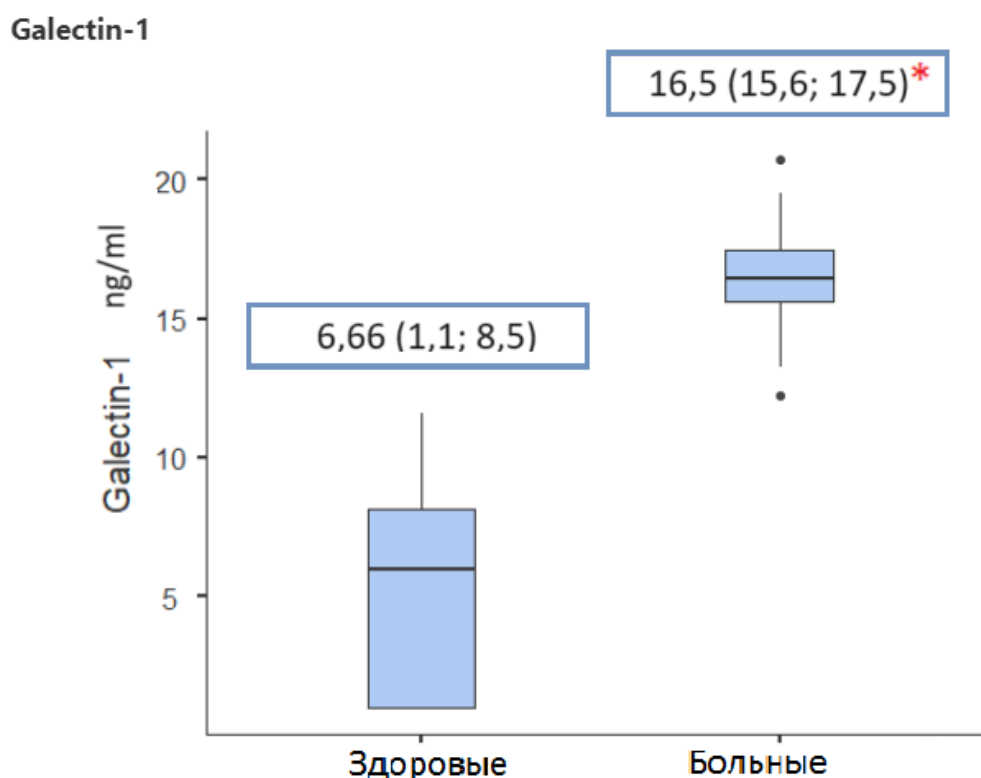


Рисунок 6 – Концентрация галектина-1 в плазме крови у больных раком толстой кишки

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

Сравнительный анализ уровня галектина-3 в периферической крови между пациентами с колоректальным раком и здоровыми донорами выявил статистически достоверные различия: концентрация данного белка в группе больных РТК составила 3,6 (2,5; 6,8) нг/мл, что в 5,7 раза ($U = 1,0$; $p < 0,01$) превышало показатель контрольной группы – 0,63 (0,50; 0,78) нг/мл (рисунок 7).

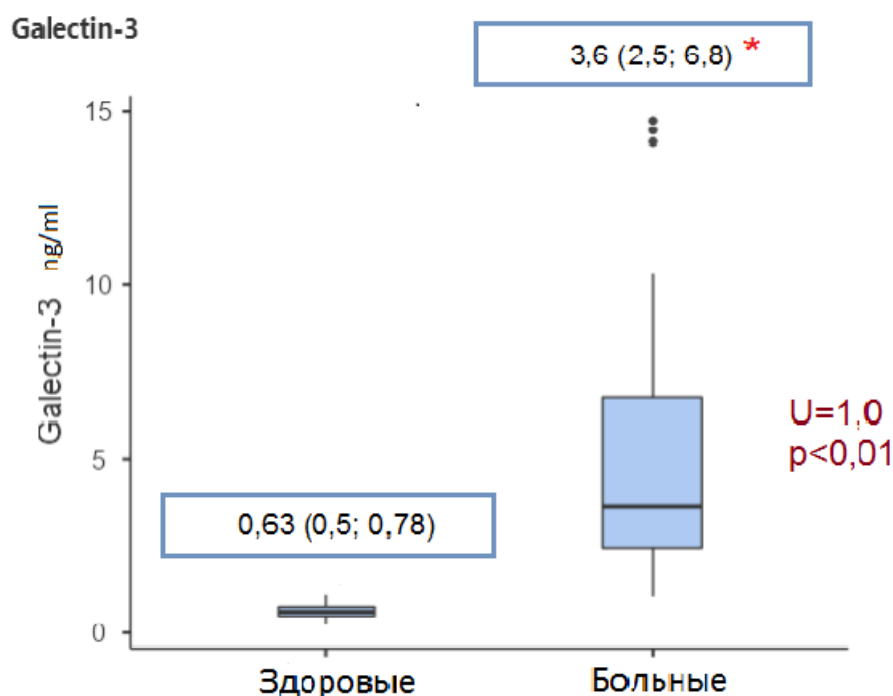


Рисунок 7 – Концентрация галектина-3 в плазме крови у больных раком толстой кишки

У пациентов с колоректальным раком была обнаружена высокая положительная корреляция ($\rho = 0,843$; $p < 0,001$) между содержанием галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической 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.

3.3 Экспрессия VEGFR и EGFR в ткани опухоли у больных раком толстой кишки

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; 28,5) %, у больных РТК также не отличалось от аналогичного показателя при АТК (11,0 (6,0; 16,0) %).

Сравнительная оценка содержания VEGFR⁺ и EGFR⁺ клеток в опухолевой ткани показала наличие тенденции к увеличению их относительного содержания при РТК относительно случаев доброкачественных опухолей толстой кишки (таблица 5).

Таблица 5 – Относительное содержание EGFR- и VEGFR-позитивных опухолевых клеток в ткани больных раком толстой кишки, Me (Q1; Q2)

Опухолевые клетки	Пациенты с РТК	Пациенты с АТК
EGFR ⁺ (%)	17,0 (5,75; 28,5)	11,0 (6,0; 16,0)
	p = 0,290	
VEGFR ⁺ (%)	10,0 (6,5; 18,3)	8,0 (6,0; 10,0)
	p = 0,168	
Примечание – p – уровень статистической значимости различий.		

3.4 Концентрация EGF и VEGF в периферической крови у больных раком толстой кишки

В нашем исследовании у больных РТК и здоровых доноров было проанализировано содержание эпидермального ростового фактора EGF и сосудистого эндотелиального ростового фактора VEGF в плазме периферической крови.

Установлено, что плазменная концентрация VEGF у пациентов с РТК на 22,1 % превышала аналогичный параметр у здоровых добровольцев (U-критерий Манна-Уитни U = 90,0; p = 0,027) (таблица 6).

Таблица 6 – 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.		

Сравнительный анализ плотности распределения VEGFR+ и EGFR+ клеточных популяций в опухолевой ткани выявил тенденцию к статистически незначимому увеличению их количества у пациентов с колоректальным раком по сравнению с больными, имеющими доброкачественные новообразования кишечника (таблица 6).

3.5 Иммунофенотипы макрофагов в опухолевой ткани у больных раком толстой кишки

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.

У пациентов с РТК нам не удалось установить статистически значимых различий процентного содержания CD68⁺CD80⁺ макрофагов по сравнению с аналогичным параметром у пациентов с АТК. Содержание в опухолевой ткани M2d-макрофагов с иммунофенотипом CD68⁺CD206⁺ у больных РТК оказалось равным 3,21 (2,01; 4,79) %, что было в 1,9 раза ниже соответствующего параметра у пациентов с АТК (6,10 (3,97; 7,71) %) (таблица 7).

Таблица 7 – Иммунофенотипы макрофагов в ткани опухоли у больных раком толстой кишки, Ме (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.		

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 7).

Пример изображения, полученного при выполнении иммунофлюоресцентного анализа, представлен на рисунке 8.

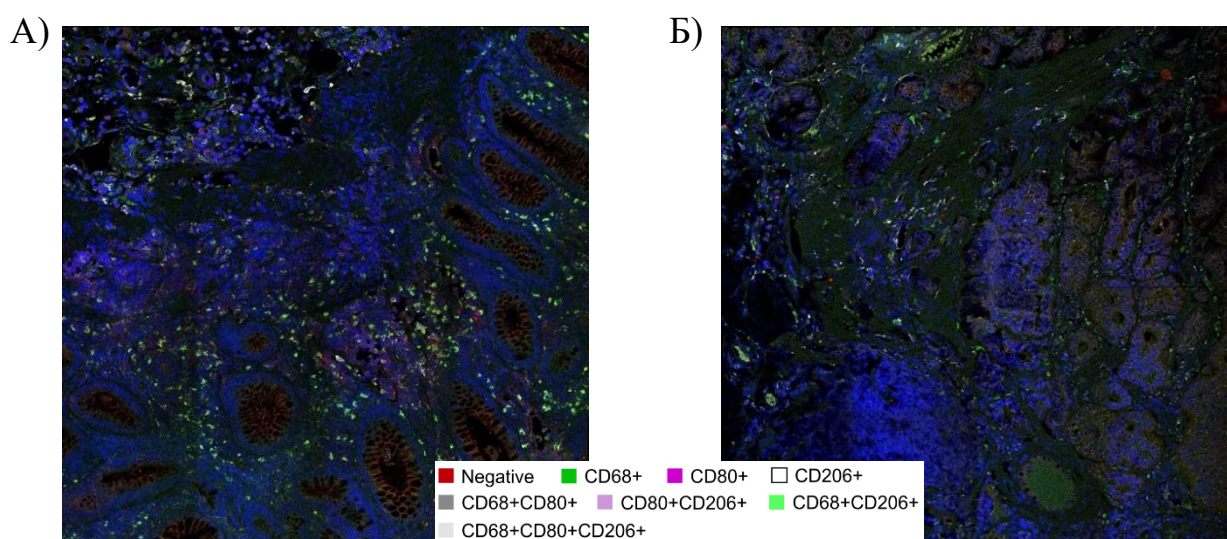


Рисунок 8 – Образец иммунофлюоресцентного окрашивания парафинового среза

Примечание – А) при исследовании ткани аденомы толстой кишки: относительное количество макрофагов M2d (CD68⁺CD206⁺) – 3,97 %, M1 (CD68⁺CD80⁺) – 5,4 %; Б) при исследовании ткани аденокарциномы: относительное количество макрофагов M2d (CD68⁺CD206⁺) – 6,0 %, M1 (CD68⁺CD80⁺) – 0,60 %.

3.6 Субпопуляционный состав моноцитов периферической крови у больных раком толстой кишки

В соответствии с общепринятой фенотипической классификацией, моноциты периферической крови были стратифицированы на три субпопуляции: классические ($CD14^{++}CD16^{-}$), промежуточные ($CD14^{++}CD16^{+}$) и неклассические ($CD14^{+}CD16^{++}$). Показано, что классические и промежуточные моноциты характеризуются провоспалительными свойствами, а неклассические – обеспечивают патрулирование и репарацию эндотелия [Sindrila A. et al., 2011].

По результатам проведенного нами анализа выявлено достоверное различие в численности как классических, так и промежуточных, неклассических моноцитов крови у обследованных лиц (таблица 8) при том, что общее количество лейкоцитов и моноцитов (абсолютное и относительное) в периферической крови у больных РТК и здоровых доноров было сопоставимым.

Таблица 8 – Соотношение субпопуляций моноцитов в периферической крови у больных раком толстой кишки, ($M \pm SD$)

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

Примечательно, что у здоровых добровольцев мы зарегистрировали соотношение отдельных субпопуляций моноцитов в периферической крови, аналогичное описываемому в современной литературе [Калашникова А.А. и соавт., 2018]. Среднее значение относительного содержания классических моноцитов с

фенотипом $CD14^{++}CD16^{-}$ в норме составило 88,2 % с показателем стандартного отклонения (standard deviation, SD) 5,6 %. Промежуточные $CD14^{++}CD16^{+}$ моноциты в контрольной группе представляли популяцию с наименьшей численностью, равную $2,9 \pm 3,5$ %, а неклассические моноциты составили $4,1 \pm 3,2$ %.

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 ($8,7 \pm 3,9$ %), а неклассических в 3,8 раза ($15,7 \pm 5,5$ %) превышало соответствующие значения в контрольной группе. Процентное содержание $CD14^{++}CD16^{+}$ и $CD14^{+}CD16^{++}$ моноцитов в периферической крови при РТК и АТК оказалось сопоставимым.

Таким образом, в периферической крови у больных РТК превалировала субпопуляция $CD16^{+}$ -позитивных моноцитов (промежуточных и неклассических), которая, по-видимому, способна секретировать факторы роста.

В ходе исследования нами был выполнен также однофакторный дисперсионный анализ для сравнения изученных параметров между тремя группами обследованных лиц. Результаты анализа продемонстрировали статистически значимые межгрупповые различия, в отношении каждой субпопуляции моноцитов р-критерий составил менее 0,05. Для уточнения групп, между которыми были выявлены различия, исследуемые параметры сравнивались попарно с помощью критерия Ньюмана-Кеулса.

В результате попарного сравнения мы установили, что у пациентов с доброкачественными и злокачественными новообразованиями толстой кишки отмечается дисбаланс субпопуляционного состава моноцитов по пути доминирования подмножества $CD16^{+}$ клеток. Различий отдельных субпопуляций моноцитов в крови у пациентов с АТК и РТК выявлено не было.

Зарегистрированные изменения характеризовались высоким уровнем значимости. Результаты попарного сравнения представлены на рисунке 9.

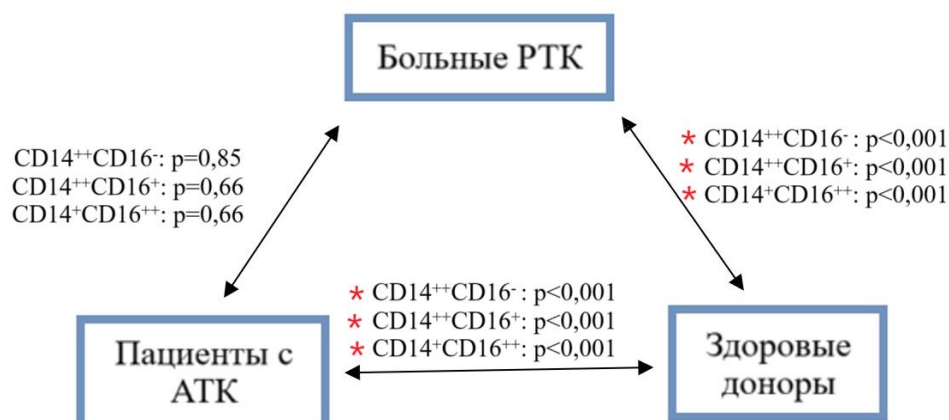


Рисунок 9 – Результат попарного сравнения относительной численности субпопуляций моноцитов в периферической крови в группах обследованных лиц

При изучении взаимосвязей между численностью субпопуляций моноцитов с другими факторами отмечено, что увеличение числа неклассических $CD14^{+}CD16^{++}$ моноцитов имело прямую заметную взаимосвязь с уровнем галектина-3 в плазме крови ($\rho = 0,573$; $p = 0,010$). Аналогичная связь прослеживалась и в отношении численности промежуточных $CD14^{++}CD16^{+}$ моноцитов: отмечалась прямая заметная её корреляция с концентрацией галектина-1 ($r_s = 0,618$) и галектина-3 ($r_s = 0,617$) в плазме крови.

Полученные данные позволяют выдвинуть предположение о том, что при колоректальном раке галектины-1 и -3 могут модулировать баланс между субпопуляциями моноцитов периферической крови: неклассическими ($CD14^{+}CD16^{++}$), промежуточными ($CD14^{++}CD16^{+}$) и классическими ($CD14^{++}CD16^{-}$), и, вероятно, влияют на формирование M1/M2d-экспрессионного профиля опухолеассоциированных макрофагов.

3.7 Содержание десквамированных CD45-CD146⁺ эндотелиоцитов в периферической крови у больных раком толстой кишки

Десквамированные эндотелиальные клетки (ДЭК) могут выступать в качестве маркера эндотелиальной дисфункции, неизбежно сопровождающей опухолевый процесс [Гончаров и соавт., 2020].

В рамках настоящего исследования была проведена оценка абсолютного количества циркулирующих эндотелиальных клеток в периферической крови у пациентов с колоректальным раком и лиц контрольной группы.

Статистический анализ продемонстрировал достоверное увеличение (в 8,2 раза; $U = 31,0$; $p < 0,001$) абсолютного количества десквамированных CD45⁻CD146⁺ эндотелиоцитов в крови у больных РТК по сравнению с группой здоровых доноров (таблица 9).

Таблица 9 – Количество ДЭК в периферической крови у больных раком толстой кишки, Me (Q1; Q3)

Десквамированные эндотелиоциты	Пациенты с РТК (n = 21)	Здоровые доноры (n = 10)
CD45 ⁻ CD146 ⁺ (ед.×10 ⁵ /л)	183,0 (76,0; 724,0)	22,30 (38,50;60,90)
p = 0,001		
Примечание – p – уровень статистической значимости различий.		

Увеличение численности десквамированных эндотелиальных клеток в периферическом крови у больных РТК может свидетельствовать о наличии эндотелиальной дисфункции при злокачественных новообразованиях.

3.8 Связь содержания галектинов 1 и 3 в плазме крови и опухолевой ткани с ростовыми факторами и дисфункцией эндотелия у больных раком толстой кишки

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].

С целью выявления взаимосвязи между изученными галектинами и факторами неоангиогенеза нами был выполнен корреляционный анализ с вычислением коэффициента корреляции Спирмена (ρ).

Так, у больных РТК была обнаружена прямая корреляционная связь умеренной силы между содержанием галектин-1⁺ клеток в опухоли и процентным содержанием клеток, экспрессирующих EGFR ($\rho = 0,404$; $p = 0,038$) (таблица 10).

Таблица 10 – Взаимосвязь внутриопухолевых галектинов 1 и 3 с экспрессией рецепторов EGFR и VEGFR в опухолевой ткани у больных раком толстой кишки

Опухолевые клетки	VEGFR ⁺ (%)	EGFR ⁺ (%)	Галектин-3 ⁺ (%)
EGFR ⁺ (%)	$\rho = 0,108$ $p = 0,649$	–	–
Галектин-3 ⁺ (%)	$\rho = 0,315$ $p = 0,176$	$\rho = 0,368$ $p = 0,109$	–
Галектин-1 ⁺ (%)	$\rho = 0,04$ $p = 0,846$	$\rho = 0,404$ $p = 0,038$	$\rho = 0,319$ $p = 0,169$
Примечание – ρ – коэффициент корреляции Спирмена; p – уровень статистической значимости выявленной корреляции. Жирным шрифтом выделена статистически значимая корреляция.			

Вместе с тем, 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 (таблица 11).

Таблица 11 – Взаимосвязь исследованных показателей периферической крови и опухолевой ткани у больных раком толстой кишки

Показатель	VEGF в крови (нг/мл)	EGF в крови (нг/мл)	Галектин-3 в крови (нг/мл)
EGF в крови (нг/мл)	$\rho = 0,031$ $p = 0,897$	—	—
Галектин-3 в крови, (нг/мл)	$\rho = 0,310$ $p = 0,033$	$\rho = 0,168$ $p = 0,163$	—
Галектин-1 в крови, (нг/мл)	$\rho = 0,311$ $p = 0,032$	$\rho = 0,211$ $p = 0,109$	$\rho = 0,083$ $p = 0,008$
Галектин-3 ⁺ -клетки опухоли (%)	$\rho = -0,429$ $p = 0,066$	$\rho = 0,394$ $p = 0,042$	$\rho = -0,075$ $p = 0,760$
Галектин-1 ⁺ -клетки опухоли (%)	$\rho = -0,246$ $p = 0,309$	$\rho = 0,301$ $p = 0,210$	$\rho = 0,413$ $p = 0,078$
Примечание – ρ – коэффициент корреляции Спирмена; p – уровень статистической значимости выявленной корреляции. Жирным шрифтом выделены статистически значимые корреляции.			

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, что требует дальнейшего изучения, в том числе, в эксперименте *in vitro*.

Анализируя взаимосвязь эндотелиальной дисфункции с экспрессией галектинов-1,3 у больных РТК, нами была показана прямая умеренная связь ($p = 0,307$; $p = 0,034$) между количеством $CD45^+CD146^+$ эндотелиоцитов и концентрацией VEGF в периферической крови. У пациентов данной группы обнаруживались также положительные заметные корреляции связь между абсолютным содержанием $CD45^+CD146^+$ эндотелиоцитов и содержанием галектина-1 и галектина-3 в плазме крови ($p = 0,650$ и $p = 0,622$ соответственно ($p < 0,001$) (рисунок 10).

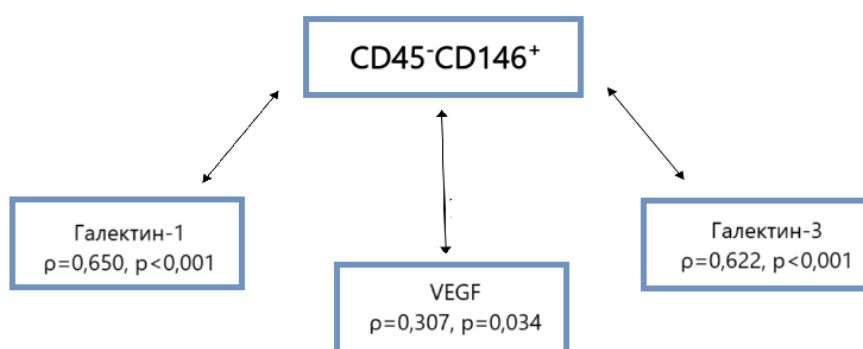


Рисунок 10 – Взаимосвязь между содержанием десквамированных эндотелиоцитов, галектинов-1,3 и VEGF в крови у больных раком толстой кишки

Учитывая факт того, что некоторые авторы склонны разделять рак толстой кишки на группы в зависимости от локализации опухоли – рак ободочной кишки (C18 по классификации МКБ-10), рак ректосигмоидного перехода (C19), рак прямой кишки (C20) [Jafarov S. et al., 2018], приводя в качестве аргумента данные о соответствующих различиях течения и биологии данных опухолей, была выполнена оценка различий при соответствующем делении выборки на подгруппы: I подгруппа – пациенты с верифицированным диагнозом C20, II подгруппа включала пациентов с C18 и C19. По результатам выполненного сравнения содержания ростовых факторов, ДЭК и галектинов в крови между подгруппами больных РТК статистически значимых различий по выявлено не было (Таблица 12).

Таблица 12 – Сравнение содержания ростовых факторов, ДЭК и галектинов в периферической крови у больных раком толстой кишки в зависимости от локализации опухоли – C18, C19 (рак ободочной кишки и ректосигмоидного перехода) и C20 (рак прямой кишки)

	C18, C19 (N=14) (Me (Q1; Q3))	C20 (N=9) (Me (Q1; Q3))	p
EGF	60,4 (50,5; 70,4)	36,6 (30,2; 60,1)	0,061
VEGF	168 (165; 223)	150 (121; 168)	0,183
CD45 ⁻ CD146 ⁺	250 (83; 530)	152 (64; 724)	1,000
Галектин-1	16,1 (15,1; 16,9)	16,6 (16,0; 18,1)	0,370
Галектин-3	3,28 (2,56; 9,9)	4,9 (4,12; 10,3)	0,403
Примечание – p – уровень статистической значимости различий.			

3.9 Связь содержания галектинов 1 и 3 в плазме крови и опухолевой ткани с показателями фенотипического дисбаланса моноцитов крови и макрофагов опухоли у больных раком толстой кишки

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 ($\rho = 0,557$; $p < 0,01$) и галектина-3 ($\rho = 0,780$; $p < 0,01$) 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 ($\rho = 0,618$) и галектина-3 ($\rho = 0,617$; $p < 0,01$) у пациентов данной группы.

Анализ взаимосвязей M1/M2d-экспрессионного профиля опухоль-ассоциированных 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 экспрессией галектина-3 в опухолевой ткани, в плазме крови и относительной численностью M2d-макрофагов (таблица 13). Данная тенденция, вероятно, объясняется участием галектинов в дифференцировке и активации макрофагов по M2-пути при РТК.

Таблица 13 – Связь M1/M2d-экспрессионного профиля опухоль-ассоциированных макрофагов и содержания галектинов 1 и 3 в ткани опухоли и в плазме крови у больных раком толстой кишки

Показатель	M1-макрофаги	M2d-макрофаги
Галектин-1 (нг/мл) в крови	$\rho = 0,127$ $p = 0,561$	$\rho = -0,256$ $p = 0,238$
Галектин-3 (нг/мл) в крови	$\rho = 0,326$ $p = 0,128$	$\rho = -0,410$ $p = 0,046$
Галектин-1 (%) в ткани	$\rho = -0,184$ $p = 0,399$	$\rho = 0,122$ $p = 0,580$
Галектин-3 (%) в ткани	$\rho = -0,350$ $p = 0,101$	$\rho = 0,426$ $p = 0,042$
Примечание – ρ – коэффициент Спирмена; p – уровень статистической значимости выявленной корреляции. Жирным шрифтом выделены статистически значимые корреляции.		

Для уменьшения размерности данных и выявления латентных структур, между изученными переменными и определения основных факторов, объясняющих вариативность исходных данных, в диссертационном исследовании мы использовали факторный анализ методом главных компонент. С целью оценки пригодности выборки для факторного анализа была выполнена проверка значений с помощью критерия Кайзера-Мейера-Олкина (КМО). 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 взаимосвязей между переменными, тем самым обосновывая применение факторного анализа.

Для определения оптимального количества извлекаемых факторов был построен график scree plot. Согласно критерию Кайзера (собственные значения >1) осуществлён выбор трёх главных компонент, так как точка излома располагается после значения «3» на шкале чисел собственных значений (рисунок 11). Из этого следует, что оптимальное количество вычисляемых факторов, объясняющих наибольшие значения дисперсии – три.

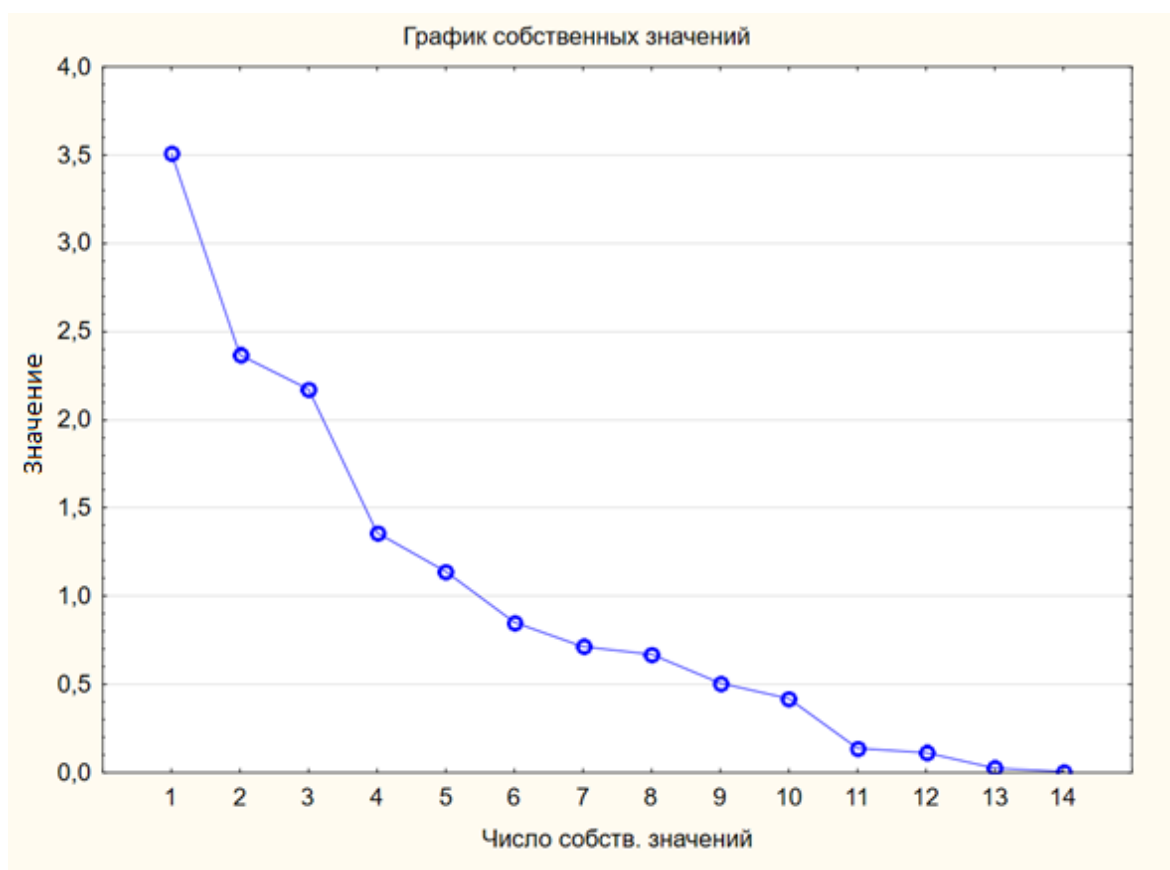


Рисунок 11 – График собственных значений scree plot

Примечание – по оси абсцисс – номера определяемых факторов, по оси ординат – их соответствующие собственные значения.

На этапе извлечения факторов мы выделили три фактора, объясняющих 56 % дисперсии (таблица 14).

Таблица 14 – Значения дисперсии извлеченных факторов

Показатель	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3
Процент от дисперсии	25,09%	16,90%	15,52%
VEGF	–0,435291	–0,234867	–0,155326
EGF	–0,286011	–0,082553	–0,429519
CD14 ⁺⁺ CD16 [–]	–0,634061	0,309695	–0,562572
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	0,103158	–0,526085	–0,525509
CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	0,609999	0,142166	0,326970
Галектин-1 в крови	0,225381	–0,860069	–0,059272
Галектин-3 в крови	0,704344	–0,465431	–0,050377
CD45 [–] CD146 ⁺	0,382941	–0,201608	0,191960
VEGFR	–0,452078	–0,699020	–0,178801
EGFR	–0,412494	–0,172216	0,361370
M1	0,365549	–0,140307	–0,796442
M2d	–0,510146	0,365841	0,591655
Галектин-1 в ткани	0,225381	–0,297020	–0,041944
Галектин-3 в ткани	0,704344	–0,393451	0,271616
Примечание – жирным шрифтом выделены статистически значимые вычисленные значения факторов			

Проведенный факторный анализ позволяет заключить, что 25,09 % общей вариативности стандартизованных показателей в исследованной группе определяется фактором, включающим параметры тканевой и плазменной концентрации галектина-3, что подчеркивает его системное значение в патогенезе заболевания. Второй фактор, обуславливающий 16,9 % дисперсии, был сформирован единственным параметром – плазменным галектином-1, что показывает независимое влияние данного параметра относительно других определяемых нами переменных и также отражает его вклад в общую дисперсию. Третий фактор зависел только от процентного содержания M1-макрофагов в ткани опухоли, что демонстрирует роль «противовоспалительного» микроокружения в изучаемом контексте. Общая дисперсия, детерминированная факторами 1, 2 и 3,

составила 57,51 %. Данный показатель типичен для биологических систем, в то время как оставшаяся доля дисперсии может быть связана с различными другими, неучтенными, факторами и случайной вариабельностью.

Таким образом, основная часть дисперсии значений в изученной выборке зависела в большей степени от содержания и 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.

3.10 Связь исследуемых параметров с клиническим распространением опухоли и степенью злокачественности у больных раком толстой кишки

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), наличие или отсутствие метастазов в лимфоузлах малого таза, а также факт наличия отдаленных метастазов в паренхиматозных органах. В зависимости от степени дифференцированности клеток опухоли все злокачественные новообразования были разделены на две группы. 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.

В проведенном исследовании гистологическая верификация у пациентов с колоректальным раком выявила следующие варианты опухолей: высокодифференцированная аденокарцинома была диагностирована у 7 больных, умеренно-дифференцированная аденокарцинома – у 14 пациентов, а низкодифференцированная аденокарцинома – у 2 человек. Таким образом, опухоли с низкой степенью злокачественности были верифицированы у 7 пациентов с РТК (30,4 %).

Данные о распространенности опухоли и глубине ее инвазии были получены из медицинских карт пациентов и обозначены с помощью индекса Т (по классификации TNM 8-го пересмотра). Степень вовлечения регионарных лимфоузлов обозначали индексом N, а наличие/отсутствие гематогенных (отдаленных) метастазов – с помощью индекса М. Для выявления различий изучаемых параметров у больных РТК с разной степенью распространения опухоли был применен однофакторный дисперсионный анализ (таблица 15).

Таблица 15 – Связь исследованных параметров у больных раком толстой кишки с распространенностью опухоли

Показатель	Т	N	М	Клиническая стадия
VEGF в крови	F = 0,55 p = 0,58	H = 1,35 p = 0,51	U = 26,50 p = 0,37	F = 0,62 p = 0,61
EGF в крови	F = 0,46 p = 0,64	H = 3,90 p = 0,14	U = 34,50 p = 0,81	F = 1,51 p = 0,24
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	F = 0,95 p = 0,40	H = 1,29 p = 0,52	U = 30,00 p = 0,54	F = 0,12 p = 0,95
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	F = 1,29 p = 0,30	H = 30,02 p = 0,99	U = 34,50 p = 0,81	F = 0,58 p = 0,64
CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	F = 0,37 p = 0,70	H = 1,77 p = 0,41	U = 35,00 p = 0,84	F = 0,02 p = 0,99
Галектин-1 в крови	F = 1,14 p = 0,34	H = 1,04 p = 0,59	U = 30,50 p = 0,57	F = 0,06 p = 0,98
Галектин-3 в крови	F = 2,72 p = 0,09	H = 0,73 p = 0,69	U = 26,00 p = 0,93	F = 0,85 p = 0,48

Продолжение таблицы 15

CD45 ⁻ CD146 ⁺	F = 0,85 p = 0,44	H = 2,07 p = 0,35	U = 29,50 p = 0,52	F = 0,24 p = 0,87
VEGFR	F = 1,15 p = 0,34	H = 2,58 p = 0,28	U = 33,00 p = 0,72	F = 0,32 p = 0,81
EGFR	F = 2,40 p = 0,12	H = 1,94 p = 0,38	U = 37,50 p = 1,00	F = 0,06 p = 0,98
M1	F = 0,94 p = 0,41	H = 3,44 p = 0,18	U = 33,00 p = 0,72	F = 0,33 p = 0,80
M2d	F = 0,27 p = 0,77	H = 1,67 p = 0,43	U = 17,00 p = 0,09	F = 0,80 p = 0,51
Галектин-1 в ткани	F = 3,54 p = 0,05	H = 1,56 p = 0,46	U = 32,50 p = 0,69	F = 0,54 p = 0,66
Галектин-3 в ткани	F = 3,12 p = 0,07	H = 2,79 p = 0,25	U = 34,50 p = 0,81	F = 0,70 p = 0,57
Примечание – F – значение критерия однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA); H – критерий Крускала-Уоллиса; U – критерий Манна-Уитни; p – уровень статистической значимости.				

По результатам проведенного анализа у больных РТК нам не удалось обнаружить статистически значимой взаимосвязи между содержанием галектинов-1,3, ростовых факторов (EGF и VEGF), десквамированных эндотелиоцитов крови и наличием регионарных и/или гематогенных метастазов, а также степенью дифференцированности опухоли.

При анализе корреляции исследованных параметров с гистологическими особенностями новообразований было установлено, что у пациентов с колоректальным раком наибольшая численность CD16⁺⁺ моноцитов наблюдалась в группе с низкодифференцированными опухолями, характеризующимися высокой степенью злокачественности и более агрессивным клиническим течением ($p = 0,447$, $p = 0,032$). Это, вероятно, обусловлено способностью неклассических моноцитов секретировать цитокины и поддерживать воспаление. В качестве реципрокного изменения нами была зарегистрирована отрицательная корреляционная связь между численностью классических CD14⁺⁺CD16⁻ моноцитов

и степенью дифференцированности опухоли ($\rho = -0,469$; $p = 0,010$) (таблица 16). В отношении других плазменных и тканевых параметров значимых взаимосвязей со степенью злокачественности и дифференцированности опухоли у пациентов с РТК установлено не было.

Таблица 16 – Связь исследованных параметров со степенью дифференцированности опухоли у больных раком толстой кишки

Плазменные факторы			Тканевые факторы		
VEGF в крови	$\rho = -0,155$	$p = 0,479$	VEGFR	$\rho = -0,311$	$p = 0,148$
EGF в крови	$\rho = -0,04$	$p = 0,831$	EGFR	$\rho = 0,107$	$p = 0,624$
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	$\rho = -0,469$	$p = 0,010$	M1	$\rho = 0,093$	$p = 0,670$
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	$\rho = 0,054$	$p = 0,803$	M2d	$\rho = 0,261$	$p = 0,227$
CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	$\rho = 0,447$	$p = 0,032$	Галектин-1 в крови	$\rho = -0,474$	$p = 0,052$
Галектин-1 в крови	$\rho = -0,044$	$p = 0,841$	Галектин-3 в крови	$\rho = -0,325$	$p = 0,129$
Галектин-3 в крови	$\rho = 0,187$	$p = 0,391$	-	-	-
CD45 ⁻ CD146 ⁺	$\rho = -0,064$	$p = 0,768$	-	-	-
Примечание – ρ – коэффициент Спирмена; p – уровень статистической значимости выявленной взаимосвязи. Жирным шрифтом выделены статистически значимые корреляции.					

В целом, отсутствие взаимосвязи между содержанием галектинов-1,3, ростовых факторов (EGF, VEGF) и десквамированных эндотелиальных клеток в крови с клинико-морфологическими параметрами опухоли при РТК могут быть связаны с однородностью группы обследованных нами пациентов – в исследовании преобладали больные преимущественно со II и III клиническими стадиями. Выявление случаев РТК на I стадии крайне редкое обстоятельство, тогда как пациенты с IV клинической стадией (с отдаленными метастазами) с наличием жизнеугрожающих осложнений не включались в исследование ввиду выраженного коморбидного фона.

В целом, полученные нами корреляции и зависимости можно представить в виде схемы (рисунок 12).

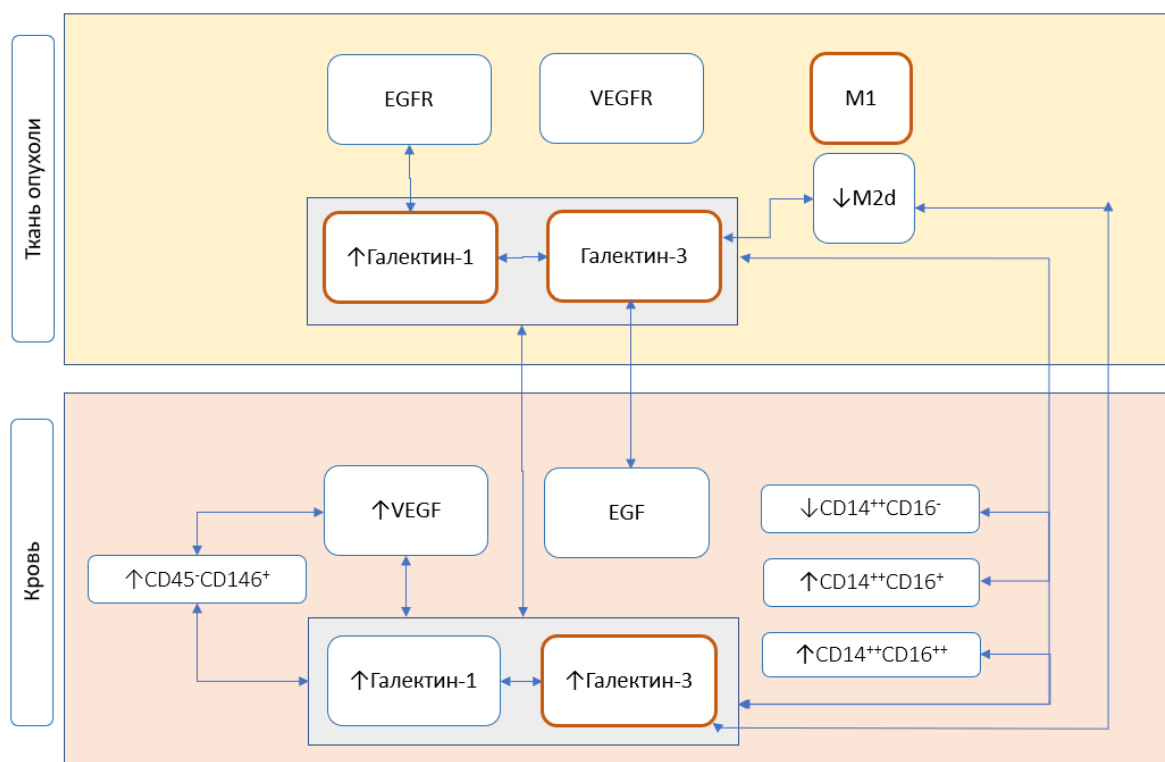


Рисунок 12 – Схема положительных корреляций между исследованными параметрами в патогенезе рака толстой кишки

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

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Актуальность проблемы рака толстой кишки (РТК) и увеличение выявляемости данного заболевания среди молодых людей демонстрируют значимость изучения фундаментальных особенностей и закономерностей его развития. Одним из важнейших условий обеспечения роста злокачественной опухоли и ее распространения является регуляция опухолевого микроокружения. Последнее реализуется посредством синтеза злокачественно трансформированными клетками различных сигнальных молекул, которые играют важную роль в механизмах опухолевой прогрессии и ускользания неоплазии от иммунного контроля. В их число входят галектины, оказывающие 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; Blaževičs O. et al., 2016; Wu K.-L., 2024].

Галектины 1 и 3 являются бета-галактозид-связывающими белками, которые могут вырабатываться как «здоровыми клетками» иммунитета, эндотелиоцитами, эпителиальными клетками, сенсорными нейронами [Johannes L. et al., 2023], так и опухолевыми клетками [Якушина В.В. и соавт., 2012]. При различных злокачественных опухолях исследователи констатируют повышение в крови концентрации различных лектинов: галектинов 9 и 12 – при лейкозах; галектинов 1 и 3 – при неходжкинских лимфомах, хроническом миелолейкозе и миеломе; галектина-7 – при неходжкинских лимфомах [Martinez-Bosch N., 2018; Козич Ж. и соавт., 2020]. По данным ряда авторов, злокачественные заболевания, в частности рак толстой кишки, характеризуются гиперэкспрессией галектинов 1-го и 3-го в ассоциации с быстрой прогрессией опухоли [Hittelet A. et al., 2003; Uhlén M. et al., 2005; Watanabe M. et al., 2008; Козич Ж.М. и соавт., 2020].

В нашем исследовании было обнаружено увеличение относительного количества галектин-1-позитивных клеток в опухолевой ткани у больных РТК в

сравнении с таковой у пациентов с аденомами толстой кишки (АТК). Концентрация галектина-1 и галектина-3 в плазме крови также существенно превышала соответствующие показатели у здоровых добровольцев. Полученные нами результаты согласуются со сведениями литературы, демонстрирующими, что источниками секреции галектинов-1 и -3 в опухоли являются как неопластические клетки, так и популяции клеток стромы: фибробласты, нейтрофилы, макрофаги, а также клетки иммунной системы – дендритные клетки и Т-лимфоциты [Méndez-Huergo S.P. et al., 2017; Chou F. et al., 2018].

Внутриклеточным компартментом синтеза галектинов являются свободные рибосомы в цитозоле клетки. Вновь синтезированные молекулы лектинов способны перемещаться во внеклеточное пространство и далее секретироваться в кровь. Точный механизм их перемещения до конца не ясен, однако галектины могут в течение нескольких минут путем эндоцитоза поступать обратно в клетку, регулируя тем самым распределение как растворимых, так и связанных гликоконъюгатов [Johannes L. et al., 2018]. По сведениям V. Furtak et al. (2001), галектин-3 опосредует эндоцитоз β 1-интегринов, что приводит к реорганизации цитоскелета клеток и способствует метастазированию опухоли [Furtak V. et al., 2001]. В цитозоле клетки галектины также связываются с факторами сигнальной трансдукции. Примером такого взаимодействия является участие галектина-1 в связывании компонентов сплайсосомного комплекса в ядре. Галектин-1-опосредованное усиление сплайсинга белков RAS и β -катенина имеет важное значение, так как данные сигнальные молекулы являются ключевыми белками в процессе опухолевой трансформации клеток эпителия толстой кишки [Fu-Tong L. et al., 2002; Elad-Sfadia G. et al., 2004; Fritsch K., 2016]. По мнению ряда авторов, галектин-1 может откладываться во внеклеточном матриксе и выступать в роли независимого предиктора рецидива болезни [Krakhmal N. Et al., 2015], в свою очередь, галектин-3 (цитозольный и внеклеточный) модулирует клеточную адгезию [Kim S.-J. et al., 2020].

Некоторые исследователи указывают на ассоциацию гиперэкспрессии галектинов с опухолевой прогрессией и негативным прогнозом заболевания [Chou F.-C. et al., 2018; Kushlinsky N. et al., 2023]. В нашем исследовании высокая концентрация галектинов-1,3 в периферической крови и избыточное содержание галектин-1-позитивных клеток в опухолевой ткани у больных РТК не зависели от клинической стадии заболевания и степени дифференцированности опухоли. Данный результат может быть следствием низкой специфичности и высокой распространенности галектинов в организме, что подтверждают исследователи, занимающиеся изучением данных белков [Козич Ж.М. и соавт., 2020]. В то же время, результат выполненного нами однофакторного анализ продемонстрировал, что фактором, обуславливающим 25 % дисперсии, явился галектин-3 (его содержание как в периферической крови, так и в опухоли), а вторым фактором, обуславливающим 16,9 % дисперсии оказался галектин-1 (его содержание в плазме крови). Таким образом подтверждена значимость галектинов 1 и 3 в патогенезе опухолевого процесса, что отражает общие представления авторов о данных белках.

Связь галектина-1 и гипоксии в контексте развития опухоли в современной литературе не описана. Имеются отдельные публикации, указывающие на значение гипоксии как ключевого индуктора гиперпродукции галектина-1 в клетках посредством связывания HIF-1 α с элементами промоторной области гена *LGALS1*, ответственного за синтез данного лектина [Yamamoto T., 2021]. Так как галектины-1,3, участвующие в механизмах опухолевого процесса, являются универсальными для клеток, возможна реализация сходных эффектов и в других тканях, что требует детального и более углубленного изучения.

В современной литературе описана иммунорегуляторная функция галектинов, которые способны распознавать CD-рецепторы на лейкоцитах и модулировать их поляризацию, созревание, активацию, дифференцировку и апоптоз [Iqbal A. et al., 2011; Rabinovich G. et al., 2016], тем самым принимая участие в регуляции функций врожденного и адаптивного иммунитета [Cooper D.

et al., 2008; Iqbal A. et al., 2011]. Высокая концентрация галектина-1 в периферической крови опосредует активацию механизмов иммуносупрессии [Kolobovnikova Yu. et al., 2021; Vasilyeva O. et al., 2022]. Есть немногочисленные исследования, указывающие на то, что галектин-1 способствует M2-поляризации макрофагов, регулируя метаболизм аргинина и снижая выработку оксида азота [Correa S. et al., 2003; Васильева О.А. и соавт., 2012], а также угнетению миграции нейтрофилов в очаг воспаления [Cooper D. et al., 2008]. По сведениям B.N. Stillman et al. (2006), высокая концентрация галектинов 1 и 3 в периферической крови ассоциирована с активацией иммуносупрессорных Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) и индукцией апоптоза CD4⁺ Т-лимфоцитов [Stillman B.N. et al., 2006]. В свою очередь, опухоль-ассоциированные макрофаги, локализующиеся преимущественно в участках гипоксии, демонстрируют гиперэкспрессию галектина-3, что способствует активации транскрипционного фактора NF-κB, и, как следствие, индукции опухолевого роста и метастазирования [Wang L., 2020]. В целом, многие авторы сходятся во мнении о том, что галектины 1-го и 3-го типов являются факторами хемотаксиса для моноцитов, вновь привлекаемых в опухолевый очаг. Тем самым формируется порочный круг, что способствует прогрессии новообразования [Якушина В.Д. и соавт., 2012; Капитанова К.С. и соавт., 2019].

Следует отметить, что обобщенная характеристика макрофагов, предполагающая разделение данных клеток на полярные субпопуляции – M1 и M2 в большей степени соответствует условиям *in vitro* и не отражает доказанную на сегодняшний день гетерогенность популяции макрофагов *in vivo*. Маркеры, определяющие M1 и M2 иммунофенотипы макрофагов, могут быть одновременно представлены на одной клетке. Так, макрофаги кожных ран человека, наряду с цитокинами, характерными для субпопуляции M1, синтезируют IL (interleukine – интерлейкин) 10, а также экспрессируют на мембране кластеры CD206, CD163, CD36 и рецептор к IL-4 [Sindrilaru A. et al., 2011]. Описана возможность прямой и обратной трансформации иммунофенотипов M1 и M2 при изменении спектра

секретируемых цитокинов и эффероцитоза – процесса «захоронения мертвых клеток», то есть удаления апоптотически погибших клеток путем фагоцитоза [Gong D. et al., 2012; Bill R. et al., 2023]. В литературе описана возможность макрофагов трансформироваться из M1-фенотипа в M2. Возможна и обратная трансформация M2-макрофагов в M1 при ожирении [Gong D et al., 2012; Bill R. et al., 2023]. По сведениям Н.Н. Сарбаевой и соавт. (2016), выделение двух полярных субпопуляций макрофагов M1 и M2 не в полной мере характеризует разнообразие иммунофенотипов макрофагов ввиду их пластичности и способности к дифференцировке из одного фенотипа в другой [Сарбаева Н.Н. и соавт., 2016]. Макрофаги с фенотипом M2 подразделяют на M2a-, M2b-, M2c- и M2d-субпопуляции в зависимости от набора поверхностных маркеров, секретируемых цитокинов и выполняемых функций. По данным литературы, макрофаги, экспрессирующие CD68 и CD206 (M2d-фенотип), участвуют в поддержании опухолевого роста, ангиогенеза и перестройки внеклеточного матрикса [Капитанова К.С. и соавт., 2019], что описывает их как макрофаги с проопухолевым потенциалом.

В нашем исследовании мы проанализировали относительное содержание и соотношение макрофагов с иммунофенотипами M1 и M2d (клеток с проопухолевым потенциалом) в опухолевой ткани при РТК по сравнению с их численностью у пациентов с АТК. Данные результаты получены нами впервые. Аналогичные исследования в современной литературе не представлены, поскольку в большинстве работ авторы оценивают иммунофенотип опухолеассоциированных макрофагов в сравнении с образцами здоровых тканей, и анализируют процентное содержание обобщенной M2-субпопуляции.

По результатам исследования, у пациентов с РТК обнаруживалась тенденция к увеличению процентного количества M1-активированных макрофагов в ткани опухоли по сравнению с таковым у больных АТК. Полученный результат, по-видимому, обусловлен вкладом воспалительного процесса в патогенез злокачественного роста и развитие опухоли. Известно, что воспаление может как

предшествовать формированию 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 источником про- и противотуморогенных, и провоспалительных цитокинов [Грачев А.Н. и соавт., 2018]. При доброкачественном процессе (аденоме) толстой кишки нами был установлен, напротив, дисбаланс соотношения M1/M2d-макрофагов по пути доминирования M2d-субпопуляции, что, по мнению многих авторов, характерно в большей степени для злокачественных новообразований [Baran B. et al., 2009; Barrionuevo P. et al., 2007; Wu K. et al., 2020].

Известно, что пул опухоль-ассоциированных макрофагов, иммуносупрессорных клеток миелоидного происхождения, иммуногенных и толерогенных дендритных клеток пополняется за счет моноцитов, имеющих костномозговое происхождение и мигрирующих в ткани [Богданова И.М. и соавт., 2019]. При этом влияние опухоли на моноциты может проявляться не только непосредственно в опухолевом очаге, но и 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 [Патышева М.Р. и соавт., 2019]. Роль лейкоцитоза и моноцитоза в патогенезе онкологических заболеваний и прогнозировании исхода их течения остается неясной, а увеличение числа лейкоцитов в периферической крови не является обязательным симптомом, сопровождающим злокачественный процесс [Weng M. et al., 2023].

В нашем исследовании общее количество лейкоцитов, относительное и абсолютное содержание моноцитов в периферической крови у пациентов с РТК и здоровых доноров оказалось сопоставимым. Согласно результатам I. Abukhiran et al. (2020), в условиях гиперсекреции гранулоцитарного колониестимулирующего

фактора (G-CSF) при опухолевой патологии далеко не всегда удается выявить связь между его концентрацией и численностью лейкоцитов в крови, так как в регуляции кроветворения принимают участие множество других цитокинов. В то же время, лейкоцитоз, по мнению автора, является фактором негативного прогноза заболевания [Abukhiran I. et al., 2020].

На сегодняшний день многие исследователи предполагают, что свойства тканевых макрофагов могут быть обусловлены особенностями моноцитов крови, хотя роль гемических моноцитов в формировании иммунофенотипов макрофагов до сих пор не определена [Gong D. et al., 2012; Патышева М. и соавт., 2019]. Процесс дифференцировки макрофагов зависит как от дистантного, так и от контактного взаимодействия с компонентами микроокружения, опосредованного факторами роста, PAMP (pathogen-associated molecular pattern, патоген-ассоциированный молекулярный паттерн), продуктами жизнедеятельности опухолевых клеток, внеклеточным матриксом и др. [Капитанова К.С. и соавт., 2019]. Известно, что галектин-1 является индуктором хемотаксиса моноцитов и может модулировать экспрессию их рецептора FcγRI, связывающегося с патогеном и обеспечивающего фагоцитоз, а также молекул МНС (major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости) класса II, выполняющих функцию презентации антигена на поверхности антигенпрезентирующей клетки [Barrionuevo P. et al., 2007].

В данном исследовании мы предположили возможное влияние галектина-1 на субпопуляционный состав моноцитов – предшественников макрофагов опухолевого микроокружения. Согласно полученным результатам, у больных с РТК в крови относительное содержание классических моноцитов с фенотипом $CD14^{++}CD16^{-}$ оказалось сниженным при одновременном повышении численности гемических моноцитов с альтернативными иммунофенотипами (неклассическим и переходным). Полученные нами данные не противоречат сведениям литературы, согласно которым, формирование $CD14^{++}CD16^{-}$ моноцитов является результатом дифференцировки костномозгового миелоидного предшественника и, помимо

фагоцитоза, индукции воспаления, синтеза провоспалительных цитокинов и оксида азота, данная субпопуляция моноцитов осуществляет противоопухолевую функцию. По нашим данным, численность субпопуляции классических моноцитов крови оказалась сниженной как у больных с реализовавшимся РТК, так и с аденомами толстой кишки.

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].

Установленная нами положительная взаимосвязь между высоким содержанием галектина-1 и галектина-3 (внутри опухоли и в крови) и увеличением числа неклассических $CD14^+CD16^{++}$ и промежуточных $CD14^{++}CD16^+$ моноцитов в крови свидетельствует о возможном влиянии данных лектинов на перераспределение моноцитарных субпопуляций с увеличением доли $CD16^+$ -позитивных клеток. Одновременно у пациентов, страдающих раком толстой кишки, регистрировалась обратная взаимосвязь между концентрацией классических моноцитов ($CD14^{++}CD16^-$) в крови и степенью дифференцированности опухоли ($\rho = -0,469$, $p = 0,010$).

Результаты нашего исследования не противоречат данным, демонстрирующим способность галектинов 1 и 3 оказывать влияние на поляризацию макрофагов моноцитарного происхождения по альтернативному проопухолевому M2-пути [Васильева О.А. и соавт., 2012; Kianoush F. et al., 2017]. Наряду с этим, в литературе описано, что макрофаги, дифференцированные в направлении иммунофенотипа M2, сами активно экспрессируют галектин-1 и галектин-3, тогда как классические M1-макрофаги, напротив, характеризуются низким уровнем экспрессии данных лектинов [Novak R et al., 2012; Kianoush F. et al., 2017].

Отсутствие корреляционных связей между содержанием внутриопухолевых и циркулирующих галектинов-1,3 с изменением M1/M2d-экспрессионного профиля опухоль-ассоциированных макрофагов у больных РТК, с одной стороны, свидетельствует об отсутствии значимого дистантного и локального влияний галактозид-связывающих белков на процессы созревания и функциональной специализации тканевых макрофагов. С другой стороны, это может быть связано с 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 составе опухолевого микроокружения. Определенные сложности в изучении функций и классификации макрофагов накладывает также то, что методы количественной оценки этих клеток не стандартизированы, протоколы иммунофлуоресценции во многих исследованиях значительно различаются [Jayasingam S. et al., 2020]. Исследователи применяют различные способы отбора проб, методы их фиксации, разную толщину биоптатов, критерии оценки и анализа изображений. Для изучения субпопуляционного состава макрофагов научные лаборатории используют различные сочетания маркеров [Dunstan R et al., 2011] ввиду отсутствия высокоспецифичных факторов, характерных только для макрофагов. Поверхностные молекулы (CD68, CD206, CD80) по отдельности могут быть представлены на клетках многих тканей различного происхождения. Наиболее ярким примером является общий маркер макрофагов – CD68, экспрессия которого детектируется на фибробластах, остеокластах, а также клетках эндотелиального и опухолевого происхождения [Da S. et al., 2016]. CD206, характерный для макрофагов, также выявляется на глиальных клетках и в структурах лимфатических сосудов [Fan W. et al., 2019]. В свою очередь белок CD80 присутствует на поверхности антигенпрезентирующих клеток, Т-лимфоцитов и некоторых популяций опухолевых клеток [Чурина Е.Г., 2021]. Для уменьшения субъективного компонента при исследовании отдельных субпопуляций клеток в ткани опухоли применяется программное обеспечение,

позволяющее автоматизировать подсчет клеток или исключить опухолевую составляющую из анализа, с идентификацией клеток околоопухолевого микроокружения. В нашем исследовании было использовано программное обеспечение QuPath (США).

Помимо вышеописанных функций, галектин-1 и галектин-3 являются хемоаттрактантами для эндотелиальных клеток и стимулируют неоваскуляризацию опухоли [Nangia-Makker P. et al., 2000, Thijssen V. L., 2021]. Одним из механизмов, посредством которого галектины регулируют неоангиогенез, является индукция синтеза ростовых факторов – сосудистого эндотелиального (VEGF – vascular endothelial growth factor) и эпидермального (EGF – epidermal growth factor).

Усиление выработки ростовых факторов составляет звено патогенеза солидных опухолей, в процессе развития которых формируется порочный круг, начинающийся с увеличения массы опухоли вследствие деления трансформированного клона клеток. В результате несоответствия скорости роста опухолевого узла и развития сосудистой сети, неупорядоченности и извитости сосудистого русла, высокой проницаемости и неполноценности стенок новых сосудов, отсутствия деления сосудов на артериолы и венулы, перicyтов, а также наличия тупиковых ответвлений неизбежно происходит появление участков гипоксии в опухолевом узле. Известно, что РТК сопровождается повышением содержания в опухоли гипоксией-индуцибельного фактора (HIF – hypoxia-inducible factor) 1 *альфа*, который усиливает экспрессию VEGF и галектинов-1, 3 [Oliveira J. et al., 2015; Birbrair A., 2020]. В свою очередь, выработка опухолевыми клетками галектинов 1 и 3 приводит к формированию порочного круга в патогенезе опухолевого заболевания (рисунок 13).

По результатам выполненного исследования, у больных РТК концентрация сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF в плазме периферической крови превышала аналогичный показатель у здоровых доноров.

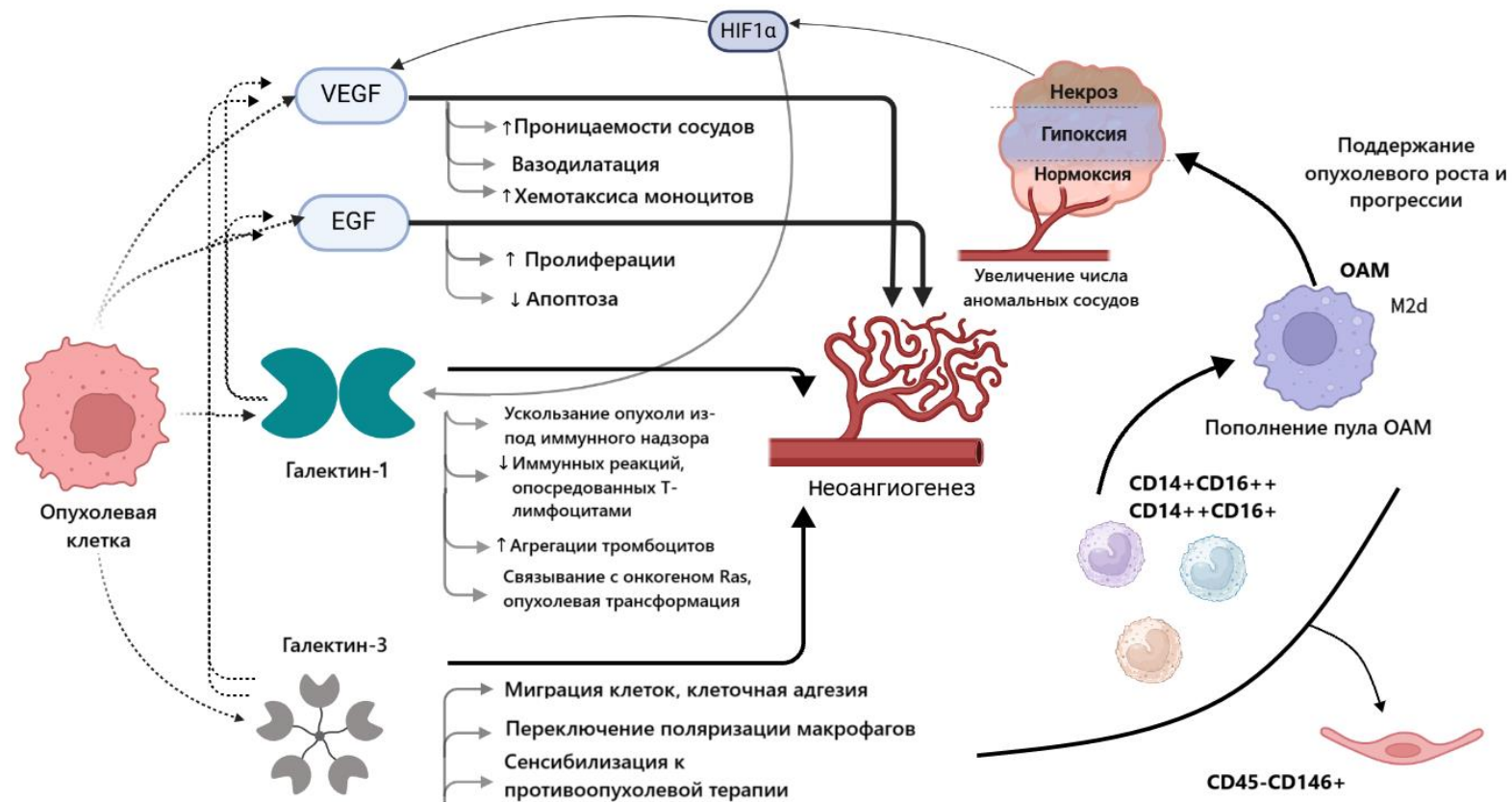


Рисунок 13 – Формирование «порочного круга» в патогенезе опухолевой патологии (по результатам А.А. Корчагиной и соавт. (2013), Н.Л. Светозарского и соавт. (2015), М.П. Топузовой и соавт. (2018), С.Т. Олжаева и соавт., (2022), F. Bertolini et al. (2006))

Примечание – $CD45^+CD146^+$ – десквамированные эндотелиоциты, M2d – макрофаги опухолевого микроокружения с «проопухолевым» фенотипом, ОАМ – опухоль-ассоциированные макрофаги.

Известно, что VEGF стимулирует васкулогенез путем привлечения клеток-предшественниц эндотелиоцитов и гемопоэтических клеток из костного мозга, и увеличивает проницаемость сосудистой стенки, что создает благоприятные условия для экстравазации опухолевых клеток и метастазирования [Dignat-George F. et al., 2004], поддержания роста опухоли и усугубления гипоксии.

Последняя является фактором агрессивного течения заболевания и невосприимчивости опухоли к противоопухолевому лечению – как лекарственному, так и лучевому, а также негативно влияет на синтез белков, ответственных за апоптоз [Tatsuyoshi F. et al., 2014] и, как было упомянуто, является фактором индукции образования новых сосудов.

Следствием опухолевого неоангиогенеза является образование сосудистой сети с высокой плотностью и нарушенной архитектоникой сосудов, а в случае опухолей толстой кишки – и явлением сосудистой мимикрии, когда стенка микроскопических сосудов частично представлена самими опухолевыми клетками. Такая мозаичность, незрелость строения опухолевых сосудов способствует увеличению транспорта метаболитов к опухоли и облегчает процесс метастазирования [Чиж Г.А. и соавт., 2019].

Многие механизмы, посредством которых галектин-1 оказывает проангиогенное действие в опухоли, связаны с разными семействами рецепторов ростовых факторов. Так, галектин-1 может вступать во взаимодействие с нейропилином (NRP – neuropilin) 1, одним из корецепторов для VEGF, и приводить к активации экспрессии рецептора VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) с последующей стимуляцией миграции эндотелиальных клеток [Hsieh S. et al., 2008]. Кроме этого, галектин-1 способен связываться со специфическим рецептором на эндотелиоцитах и запускать каскад реакций, результатом которых является повышенная проницаемость сосудов, вазодилатация, стимуляция неоангиогенеза и хемотаксиса моноцитов [Светозарский Н. и соавт., 2015]. В свою очередь, D. Croci et al. (2014) описали способность галектина-1 напрямую связываться с VEGFR2 и запускать его активацию в отсутствие VEGF, что приводит к росту опухолевого узла, устойчивого к анти-VEGF-терапии [Croci D. et

al., 2014]. При одновременном действии галектинов 1 и 3 отмечено усиление проангиогенного эффекта за счет активации VEGFR1, что, вероятно, связано с нарушением эндоцитоза этих рецепторов [D'Haene N. et al., 2013]. Галектины могут также способствовать росту новых сосудов, модулируя высвобождение VEGF из тромбоцитов [Etulain J. et al., 2014]. Помимо VEGF-опосредованной индукции ангиогенеза в литературе описана галектин-1-зависимая активация эндотелиальных клеток лектином, непосредственно секретируемым опухолью, что подтверждается в экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro* [Thijssen V. et al., 2006].

Еще один механизм, лежащий в основе способности галектина-1 стимулировать ангиогенез, предполагает опосредованную передачу сигнала через трансмембранную киназу IRE1 α (инозитол-зависимый фермент 1 α), что приводит к контролю функции белка-шаперона ORP (oxygen-regulated protein)-150, регулирующего процесс созревания VEGF [Ozawa K. et al., 2001; Le Mercier M. et al., 2009]. Сочетанное действие галектинов 1-го и 3-го типов на ангиогенез реализуется за счет активации экспрессии VEGFR и угнетения интернализации этих рецепторов на клетках [Tatsuyoshi F. et al., 2014]. Предположительно, механизм действия галектинов обусловлен посреднической ролью между секрецией ростового фактора и экспрессией соответствующего рецептора, вследствие чего происходит модуляция эффектов такого взаимодействия [Чиж Г.А. и соавт., 2019].

Неотъемлемым элементом регуляции клеточных функций в физиологических условиях и при онкологической патологии является эпидермальный фактор роста (EGF, epidermal growth factor – эпидермальный фактор роста). В норме EGF вырабатывается клетками гладкой мускулатуры и эндотелия, макрофагами и элементами эпителиальной ткани разной локализации. При связывании EGF с комплементарным рецептором данный фактор стимулирует три основных сигнальных каскада, которые лежат в основе его онкогенного потенциала. Первый PI3K-Akt 3 каскад, связанный с подавлением апоптоза через

активацию белка Akt, является наиболее часто активируемым сигнальным механизмом при злокачественных новообразованиях [Дронова Т.А. и соавт., 2021]. Второй сигнальный каскад ассоциирован с запуском последовательности компонентов клеточного цикла. Третий путь осуществляется посредством фосфорилирования фосфолипазы C1 и изменения структуры актина, что является также необходимым для реализации клеточного цикла [Шаназаров Н.А. и соавт., 2009].

Рецептор EGF (являясь тирозинкиназой) при взаимодействии с лигандом активирует экспрессию транскрипционных факторов, а следовательно, синтез ДНК, способствуя тем самым усилению пролиферативной активности опухолевых клеток [Niyaz M. et al., 2015]. Модуляторами EGF- и VEGF-опосредованного взаимодействия опухолевых клеток и клеток микроокружения могут быть галектины 1-го и 3-го типов. Показано, что галектин-3 способен регулировать процесс трансформации, пролиферации и дифференциации опухолевых клеток [Huang Y. et al., 2021].

По результатам нашего исследования, концентрация EGF в периферической крови у пациентов с РТК и здоровых доноров оказалась сопоставимой. Несомненно, выраженность проопухолевых эффектов, реализуемых ростовыми факторами VEGF и EGF, определяется не только концентрацией этих медиаторов в периферической крови, но и экспрессией соответствующих рецепторов на мембране злокачественно трансформированных клеток. Интенсификация экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), по мнению ведущих авторов, является прогностическим фактором, связанным с ухудшением исхода заболевания, частыми рецидивами и недостаточной эффективностью терапевтических вмешательств [Galizia G. et al., 2007].

При изучении относительного содержания опухолевых VEGFR⁺ и EGFR⁺ клеток у больных РТК нами была отмечена лишь тенденция к его увеличению по сравнению с количеством рецептор-экспрессирующих клеток при доброкачественных опухолях толстой кишки. Это свидетельствует о том, что

помимо непосредственного участия ростовых факторов и их рецепторов в индукции опухолевого роста, немаловажная роль отводится компонентам опухолевого микроокружения.

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).

Повышенные концентрации галектинов-1 и -3 в периферической крови, а также увеличенное количество галектин-1-позитивных клеток в опухолевой ткани у пациентов с колоректальным раком (РТК) коррелировали с высоким уровнем VEGF в плазме, что свидетельствует о возможной положительной взаимосвязи между изученными параметрами. Полученные результаты обосновывают способность галектина-1 и галектина-3 проявлять синергизм в реализации VEGF- и EGF-зависимого злокачественного потенциала опухоли. В литературе представлены немногочисленные данные, согласующиеся с результатами нашего исследования. По сведениям A.I. Markowska (2011), добавление рекомбинантного галектина-3 в культуру опухолевых клеток приводило к усилению их миграции и увеличению экспрессии EGFR. Обратный эффект авторы регистрировали при таргетном блокировании рецептора EGFR и галектина-3 [Markowska A. et al., 2011]. 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]. По сведениям C. Boscher и I. Nabi (2013), галектин-3 модулирует рецепцию EGFR путем ограничения подвижности рецептора в плазматической мембране и в синергизме с кавеолином-1 способствует ремоделированию интегрин-зависимого матрикса и миграции клеток [Boscher C., Nabi I. et al., 2013].

Как уже упоминалось ранее, исследование относительного содержания VEGFR⁺ и EGFR⁺ клеток в биоптатах злокачественных опухолей и аденом толстой

кишки позволило выявить лишь тенденцию к увеличению данных параметров при РТК. Этот факт может свидетельствовать о том, что EGFR- и VEGFR-опосредованная регуляция опухолевого роста может осуществляться не столько за счет плотности рецепторов к ростовым факторам, сколько ввиду увеличения в периферической крови концентрации их лигандов и других молекул, способных модулировать эффекты такого взаимодействия.

В нашем исследовании у больных РТК продемонстрирована также прямая зависимость между концентрацией EGF в крови и экспрессией EGFR в опухоли с содержанием опухолевых галектин-3- и галектин-1-экспрессирующих клеток. Данный результат не противоречит результатам исследований других авторов и дополняет представления о роли галектинов в механизмах EGFR- и VEGFR-зависимой индукции опухолевого неоангиогенеза.

В дополнение к синтезу биологически активных молекул клетками опухоли, уже упомянутые VEGF, EGF, могут синтезироваться клетками опухолевого микроокружения и участвовать в активации проангиогенных сигнальных путей [Acharia S. et al., 2024]. HIF-1 α активирует эндотелиоциты в близлежащих сосудах и привлекает их костномозговых предшественников. Сосуды в опухоли, в отличие от нормальных сосудов, характеризуются рядом особенностей, а именно: наличием межклеточных щелей между клетками эндотелия, отсутствием перицитов и, в ряде случаев, собственной стенки (стенка сформирована клетками опухоли), наличием слепых ответвлений и повреждений, ее «окончатостью» и извитым ходом без деления на артериолы и венулы [Matsumoto T., 2001; Zhang R. et al., 2024]. Подобная незрелость и функциональная неполноценность опухолевых сосудов обуславливают их склонность к явлениям эндотелиальной дисфункции (ЭД).

Данные современной литературы, демонстрирующие роль ЭД в патогенезе злокачественных опухолей немногочисленны, при этом исследователи сходятся во мнении о том, что наличие опухолевого процесса сопровождается появлением признаков дисфункции эндотелия и актуальностью выявления ее маркеров в периферической крови. Исследователи описывают показатели дисфункции

эндотелия у больных раком желудка, раком головки поджелудочной железы и при гепатоцеллюлярном раке [Олжаев С.Т. и соавт., 2022]. Появление признаков ЭД, по мнению авторов, связано с повышенным риском операционных осложнений и ухудшением общего прогноза заболевания. По сведениям J. Salluh et al. (2009) и S. Madoiwa (2009), негативная роль ЭД обусловлена ее участием в реализации системного воспалительного ответа, образовании тромбов и полиорганной недостаточности [Madoiwa S., 2009; Salluh J. et al., 2009]. В норме численность десквамированных зрелых эндотелиальных клеток в периферической крови невелика, и, при появлении в периферическом кровотоке, эти клетки быстро удаляются элементами ретикуло-эндотелиальной системы [Fadini G., 2010].

В результате нашего исследования у больных РТК было установлено повышение численности десквамированных эндотелиоцитов в периферической крови, по сравнению с таковой у здоровых доноров. Это подтверждает наличие ЭД 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.

Следствием дизрегуляторного опухолевого неоангиогенеза является образование сосудистой сети с высокой плотностью и неправильной архитектоникой, а в случае РТК – и явлением сосудистой мимикрии, когда стенка микроскопических сосудов частично представлена самими опухолевыми клетками. Такая мозаичность строения опухолевых сосудов способствует увеличению транспорта питательных веществ к опухоли и, несмотря на незрелость сосудов, облегчает процесс метастазирования [Pandey P. et al., 2025].

По результатам исследования нам не удалось установить взаимосвязи между содержанием галектинов-1,3, ростовых факторов (EGF и VEGF) и эндотелиальных

клеток в крови и наличием регионарных и/или гематогенных метастазов, а также со степенью дифференцированности опухоли при РТК. 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 исключения пациентов с отдаленными метастазами (IV клиническая стадия) из-за выраженного коморбидного фона. У большинства таких пациентов была диагностирована сопутствующая патология, которая могла повлиять на результат: ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, атеросклероз, декомпенсация по основному процессу, явление кишечной непроходимости и воспаление. Вклад отдельных патогенетических факторов в механизмы развития ЭД у пациентов с онкологическими заболеваниями требует дальнейшего детального изучения.

В целом, 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 14).

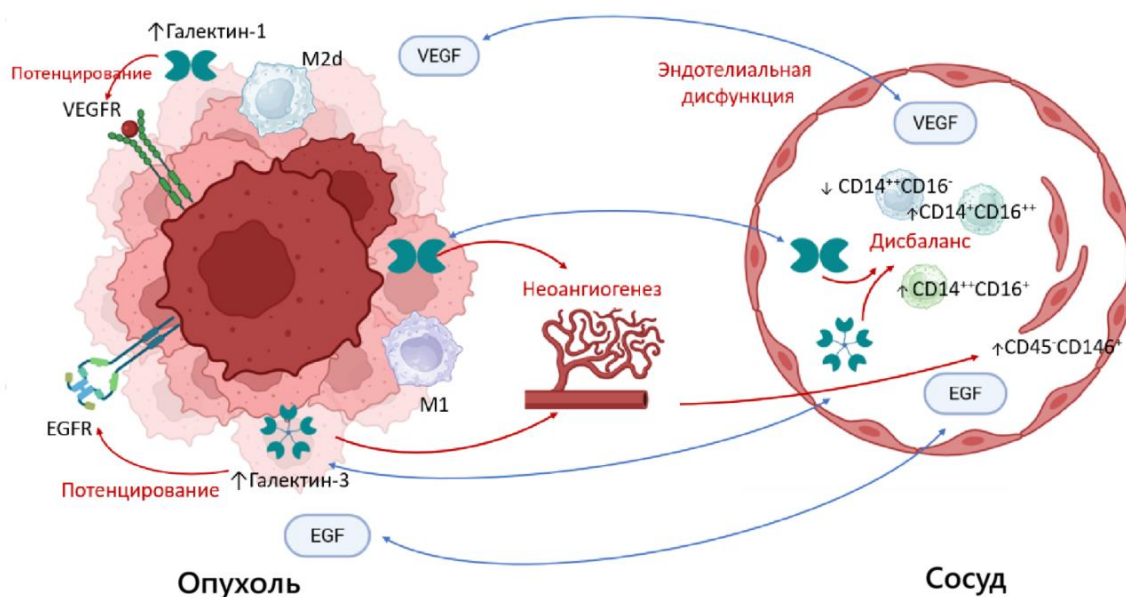


Рисунок 14 – Связь галектинов 1 и 3 с дисбалансом субпопуляций моноцитов/макрофагов и факторов ангиогенеза при раке толстой кишки (по данным литературы (А.А. Корчагиной и соавт. (2013), Н.Л. Светозарского и соавт. (2015), М.П. Топузовой и соавт. (2018), С.Т. Олжаева и соавт., (2022), F. Bertolini et al. (2006)) и результатам собственных исследований

Примечание – Синие стрелки – секрция молекул VEGF, EGF и галектинов в ткани опухоли и 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 неоангиогенеза 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 опухоль-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 СОКРАЩЕНИЙ

АТК – аденома толстой кишки

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗНО – злокачественное новообразование

КАР – рак, ассоциированный с колитом

ННКРР – наследственный неполипозный колоректальный рак

ОКЛ – общее количество лейкоцитов

РТК – рак толстой кишки

РЭС – ретикуло-эндотелиальная система

ФНО – фактор некроза опухоли

ЭД – эндотелиальная дисфункция

APC (adenomatous polyposis coli) – аденоматозный полипоз кишки

bFGF (fibroblasts growth factor) – фактор роста фибробластов

BRAF (B-rafproto-oncogene) – ген-протоонкоген BRAF

CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

EGF (epidermal growth factor) – эпидермальный фактор роста

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

EPC (endothelial progenitor cell) – эндотелиальная прогениторная клетка

Eph-B – эфрин В

Her (human epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста человека

HGF (hepatocyte growth factor) – фактор роста гепатоцитов

HIF (hypoxia inducible factor) – гипоксия-индуцибельный фактор

ICAM (intracellular adhesion molecule) – молекула межклеточной адгезии

IFN (interferone) – интерферон

IL (interleukine) – интерлейкин

IRE (inositol requiring enzyme) – инозитол-зависимый фермент

JAG1 – белок-лиганд рецептора Notch (CD339)

KRAS (Kirsten rat sarcoma virus) – ген-протоонкоген KRAS

LFA (Lymphocyte-associated antigen)-1 – лимфоцит ассоциированный антиген-1

M1 (CD68⁺CD80⁺) – макрофаг с иммунофенотипом M1, содержащий на поверхности молекулы CD68 и CD80

M2d (CD68⁺CD206⁺) – макрофаг с иммунофенотипом M2, содержащий на поверхности молекулы CD68 и CD206

MAC (macrophage antigen)-1 – макрофагальный антиген-1

MCH (main histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости

MMPs (matrix metalloproteinase) – матриксные металлопротеиназы

MMR (mismatch repair) – репарация неспаренных оснований

MSI (microsatellite instability) – микросателлитная нестабильность

NRP (neuropilin) – нейропилин

ORP (oxygen regulated protein) – кислород-регулируемый белок-шаперон

PAMP (pathogen-associated molecular pattern) – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн

PDGF (platelet-derived growth factor) – тромбоцитарный фактор роста

TAM (tumor-associated macrophages) – опухоль-ассоциированные макрофаги

TME (tumor microenvironment) – опухолевое микроокружение

TGF (tumor growth factor) – фактор роста опухоли

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ субпопуляций моноцитов при сердечно-сосудистой, ожоговой и иной патологии (классификация 2010 г.) / В. М. Земсков, А. Ш. Ревитшвили, М. Н. Козлова [и др.]. – DOI 10.21518/ms2023-002 // Медицинский совет. – 2023. – Т. 17, № 4. – С. 154–163.
2. Ангиогенез (литературный обзор) / И. С. Васильев, С. А. Васильев, И. А. Абушкин [и др.] // Человек. Спорт. Медицина. – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 36–45.
3. Воспаление и рак толстой кишки. Молекулярно-иммунологические механизмы / О. И. Кит, Е. А. Никипелова, А. В. Шапошников [и др.] // Вопросы онкологии. – 2018. – Т. 64, № 1. – С. 34–40.
4. Галектин-1: роль в формировании особенностей врожденного и приобретенного иммунитета / В. Д. Якушина, О. А. Васильева, Н. В. Рязанцева [и др.] // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1-2. – С. 21–32.
5. Галектин-3 и структурно-функциональные параметры левого желудочка при ишемической болезни сердца в сочетании с хронической болезнью почек / С. С. Фатеев, В. Н. Оранжевская, В. К. Федулов [и др.]. – DOI 10.15829/1728-8800-2024-3729 // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2024. – Т. 23, № 1. – С. 24–33.
6. Динамика циркулирующих эндотелиальных клеток у пациентов с острым инфарктом миокарда / Ю. В. Вахрушева, А. С. Мосеева, О. А. Миролубова, И. А. Хлопина // Российский кардиологический журнал. – 2015. – Т. 20, № 4S1. – С. 26. – URL: <https://russjcardiol.elpub.ru/jour/article/view/1723/1404> (дата обращения: 28.02.2025).
7. Зимницкая, О. В. Особенности эндотелиальной дисфункции при гипертонической болезни / О. В. Зимницкая, М. М. Петрова // Медицинский алфавит. – 2019. – Т. 1, № 3(378). – С. 29–33.

8. Калашникова, А. А. Субпопуляции моноцитов у здоровых лиц и у пациентов с сепсисом / А. А. Калашникова, Т. М. Ворошилова, Л. В. Чиненова, Н. И. Давыдова, Н. М. Калинина // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20, № 6. – С. 815–824.
9. Ключевая роль опухоль-ассоциированных макрофагов в прогрессировании и метастазировании опухолей / И. М. Богданова, М. Н. Болтовская, А. Л. Рахмилевич, К. А. Артемьева // Иммунология. – 2019. – Т. 40, № 4. – С. 41–47.
10. Коваленко, Л. В. Васкулоэндотелиальный фактор роста и десквамированные эндотелиальные клетки у пациентов с ожирением / Л. В. Коваленко, Е. А. Белова // Вестник Новгородского государственного университета. – 2014. – № 78. – С. 125-128.
11. Козич, Ж. М. Опухолевая прогрессия и роль галектинов / Ж. М. Козич, Л. А. Смирнова, В. Н. Мартинков // Медицинские новости. – 2020. – № 11. – С. 3-7.
12. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии / Н. В. Чердынцева, И. В. Митрофанова, М. А. Булдаков [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 16, № 4. – С. 61-74.
13. Макрофаги M1/M2: происхождение, фенотип, способы получения, взаимодействие с естественными киллерами и трофобластом / А. С. Жгулева, М. С. Зементова, С. А. Сельков, Д. И. Соколов // Медицинская иммунология. – 2024. – Т. 26, № 3. – С. 425-448.
14. Макрофаги, ассоциированные с опухолью: современное состояние исследований и перспективы клинического использования / А. Н. Грачев, Д. В. Самойлова, М. А. Рашидова [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2018. – Т. 5, № 4. – С. 20-28.
15. Малютина, Н. Н. Десквамированные эндотелиоциты и оксид азота как маркеры дисфункции и повреждения эндотелия при остеоартрозе у работниц

физического труда / Н. Н. Малютина, М. С. Невзорова // Уральский медицинский журнал. – 2012. – № 10(102). – С. 69-71.

16. Маркеры эндотелиальных клеток в норме и при патологии / Н. В. Гончаров, П. И. Попова, П. П. Авдонин [и др.] // Биологические мембраны. – 2020. – Т. 37, № 1. – С. 3-21.

17. Меркулов, Г. А. Курс патологогистологической техники / Г. А. Меркулов. – 5-е изд., испр. и доп. – Ленинград : Медицина. Ленингр. отд-ние, 1969. – 423 с.

18. Моноциты крови в поддержании баланса деструктивных и репаративных процессов в сосудистом эндотелии при ишемической кардиомиопатии / Чумакова С. П., Уразова О. И., Денисенко О. А. [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – №3. – С. 84-93.

19. Моноциты при злокачественных новообразованиях: перспективы и точки приложения для диагностики и терапии / М. Р. Патышева, М. Н. Стахеева, И. В. Ларионова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 60-75.

20. Непряхин Г.Г. Некоторые простые способы окраски гистологических срезов // Казанский медицинский журнал. - 1964. - Т. 45. - №2. - С. 90-91.

21. Олжаев, С. Т. Эндотелиальная дисфункция у больных раком желудка: зависимость от стадии новообразования / С. Т. Олжаев, К. Р. Карибаев // Вестник Новгородского государственного университета. – 2017. – № 8 (106). – С. 32-36.

22. PI3K/AKT/MTOR: вклад в формирование фенотипа опухоли, чувствительного к тамоксифену / Т. А. Дронова, Н. Н. Бабышкина, Н. В. Матвиенко [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 16–23.

23. Перспективы использования наночастиц для репрограммирования опухолевых макрофагов в иммунотерапии злокачественных новообразований / К. С. Капитанова, В. А. Наumenко, А. С. Гаранина [и др.] // Биохимия. – 2019. – Т. 84, № 7. – С. 934-952.

24. Полиморфизм гена LGALS1 не связан с содержанием галектина-1 в опухолевой ткани и крови у больных раком толстой кишки / О. И. Уразова, Г. В. Рейнгардт, Ю. В. Колобовникова [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2024. – Т. 52, № 3. – С. 170-177.

25. Сарбаева, Н. Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами / Н. Н. Сарбаева, Ю. В. Пономарева, М. Н. Милякова // Гены и клетки. – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 9-17.

26. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – М. : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. – 262 с. – ISBN 978-5- 85502-297-1.

27. Состояние функции сосудистого эндотелия при инфекционной патологии различной этиологии / И. Л. Локтионова, М. В. Покровский, В. А. Рагулина [и др.] // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – № 4 (123), Вып. 17/1. – С. 20-31.

28. Субпопуляции моноцитов у здоровых лиц и у пациентов с сепсисом / А. А. Калашникова, Т. М. Ворошилова, Л. В. Чиненова [и др.]. – DOI 10.15789/1563-0625-2018-6-815-824 // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20, № 6. – С. 815–824.

29. Фрейдлин, И. С. Клетки иммунной системы III-V : учебное пособие для вузов / И. С. Фрейдлин, А. А. Тотолян. – Санкт-Петербург : Наука, 2001. – 390 с. – (Серия учебных пособий ; Т. III-V). – ISBN 5-02-026159-9.

30. Частота эндотелиальной дисфункции и повышения жесткости сосудов у больных солидными злокачественными новообразованиями / О. В. Андреева, Н. Н. Семенов, Д. Ю. Щекочихин [и др.]. – DOI 10.18786/2072-0505-2022-50-022 // Альманах клинической медицины. – 2022. – Т. 50, № 2. – С. 103–110.

31. Чиж, Г. А. Современные возможности прогнозирования метастазирования злокачественных новообразований. Маркеры метастазирования / Г. А. Чиж // Forcipe. – 2019. – Т. 2, № 1. – С. 31-41.

32. Шаназаров, Н. А. Роль эпидермального фактора роста и его рецептора в канцерогенезе: молекулярные механизмы их действия / Н. А. Шаназаров, А. Х. Сабиров, С. М. Сироткина // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 85-90.

33. A clinicopathological and molecular analysis of 200 traditional serrated adenomas / M. L. Bettington, N. I. Walker, Ch. Rosty [et al.] // *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* – 2015. – Vol. 28, No 3. – P. 414–427.

34. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients / M. Zhang, Y. He, X. Sun [et al.]. – DOI 10.1186/1757-2215-7-19 // *Journal of Ovarian Research.* – 2014. – Vol. 7. – URL: <https://ovarianresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-2215-7-19> (access date: 28.02.2025).

35. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics / M. Uhlén, E. Björling, C. Agaton [et al.] // *Molecular & cellular proteomics : MCP.* – 2005. – Vol. 4, No 12. – P. 1920–1932.

36. 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 / P. Barrionuevo, M. Beigier-Bompadre, J. M. Ilarregui [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950).* – 2007. – Vol. 178, No 1. – P. 436–445.

37. Acharya, S. S. Havoc in harmony: Unravelling the intricacies of angiogenesis orchestrated by the tumor microenvironment / S. S. Acharya, C. N. Kundu. – DOI 10.1016/j.ctrv.2024.102749 // *Cancer Treatment Reviews.* – 2024. – Vol. 127. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030573722400077X?via%3Dihub> (access date: 28.02.2025).

38. An application of the 2-nitrobenzenesulfenyl method to proteomic profiling of human colorectal carcinoma: A novel approach for biomarker discovery / M. Watanabe,

I. Takemasa, N. Kawaguchi [et al.] // *Proteomics. Clinical applications.* – 2008. – Vol. 2, No 6. – P. 925–935.

39. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice / A. Sindrilaru, T. Peters, S. Wieschalka [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2011. – Vol. 121, No 3. – P. 985–997.

40. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors / S. Hendry, R. Salgado, T. Gevaert [et al.] // *Advances in Anatomic Pathology.* – 2017. – Vol. 24, No 6. – P. 311–335.

41. Birbrair, A. Tumor Microenvironment. Molecular Players - Part A / eds A. Birbrair. – Cham : Springer, 2020. – 175 c. – (Advances in Experimental Medicine and Biology ; Vol. 1259). – ISBN 978-3-030-43095-5.

42. Blood monocytes stimulate migration of human pancreatic carcinoma cells in vitro: the role of tumour necrosis factor - alpha / B. Baran, I. Bechyne, M. Siedlar [et al.] // *European Journal of Cell Biology.* – 2009. – Vol. 88, No 12. – P. 743–752.

43. Boscher, C. Galectin-3- and phospho-caveolin-1-dependent outside-in integrin signaling mediates the EGF motogenic response in mammary cancer cells / C. Boscher, I. R. Nabi // *Molecular Biology of the Cell.* – 2013. – Vol. 24, No 13. – P. 2134–2145.

44. Cairns, R. A. Regulation of cancer cell metabolism / R. A. Cairns, I. S. Harris, T. W. Mak // *Nature Reviews. Cancer.* – 2011. – Vol. 11, No 2. – P. 85–95.

45. Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms / N. V. Krakhmal, M. V. Zavyalova, E. V. Denisov [et al.]. – DOI 10.3389/fonc.2020.566511 // *Acta Naturae.* – 2015. – Vol. 7, No 2. – P. 17-28.

46. Cassetta, L. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer / L. Cassetta, J. W. Pollard // Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. – 2018. – Vol. 17, No 12. – P. 887–904.

47. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker / D. A. Chistiakov, M. C. Killingsworth, V. A. Myasoedova [et al.] // Laboratory investigation. – 2017. – Vol. 97, No 1. – P. 4-13.

48. CD80 expression is upregulated by TP53 activation in human cancer epithelial cells / M. Scarpa, C. Marchiori, M. Scarpa, I. Castagliuolo. – DOI 10.1080/2162402X.2021.1907912 // Oncoimmunology. – 2021. – Vol. 10, No 1. – URL: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2021.1907912?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrsref.org (access date: 28.02.2025).

49. CD80 Expression on Tumor Cells Alters Tumor Microenvironment and Efficacy of Cancer Immunotherapy by CTLA-4 Blockade / J. Vackova, I. Polakova, S. D. Johari, M. Smahel. – DOI 10.3390/cancers13081935 // Cancers. – 2021. – Vol. 13, No 8. – URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/8/1935> (access date: 28.02.2025).

50. Characterization of the expression and clinical features of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in esophageal carcinoma / M. Niyaz, J. Anwer, H. Liu [et al.] // Oncology Letters. – 2015. – Vol. 10, No 6. – P. 3696–3704.

51. Circulating endothelial cells and other angiogenesis factors in pancreatic carcinoma patients receiving gemcitabine chemotherapy / S. Kondo, H. Ueno, J. Hashimoto [et al.]. – DOI 10.1186/1471-2407-12-268 // BMC Cancer. – 2012. – Vol. 12. – URL: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-268> (access date: 28.02.2025).

52. Circulating endothelial cells: realities and promises in vascular disorders / F. Dignat-George, J. Sampol, G. Lip, A. D. Blann // Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis. – 2003. – Vol. 33, No 5-6. – P. 495–499.

53. Citri, A. EGF-ERBB signalling: towards the systems level / A. Citri, Y. Yarden // *Molecular Cell Biology*. – 2006. – Vol. 7, No 7. – P. 505–516.

54. Colorectal cancer statistics, 2023 / R. L. Siegel, N. S. Wagle, A. Cercek [et al.] // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2023. – Vol. 73, No 3. – P. 233–254.

55. Control of angiogenesis by galectins involves the release of platelet-derived proangiogenic factors / J. Etulain, S. Negrotto, M. V. Tribulatti [et al.] // *PloS One*. – 2014. – Vol. 9, No 4. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0096402> (access date: 28.02.2025).

56. Cooper, D. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow / D. Cooper, L. Norling, M. Perretti // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2008. – Vol. 83, No 6. – P. 1459–1466.

57. Endogenous galectin-1 and acute inflammation: emerging notion of a galectin-9 pro-resolving effect / A. J. Iqbal, A. L. Sampaio, F. Maione [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2011. – Vol. 178, No 3. – P. 1201–1209.

58. Eosinophil-expressed galectin-3 regulates cell trafficking and migration / X. N. Ge, S. G. Ha, F-T. Liu [et al.]. – DOI 10.3389/fphar.2013.00037 // *Frontiers in Pharmacology*. – 2013. – Vol. 4. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2013.00037/full> (access date: 28.02.2025).

59. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression is associated with a worse prognosis in gastric cancer patients undergoing curative surgery / G. Galizia, E. Lieto, M. Orditura [et al.] // *World Journal of Surgery*. – 2007. – Vol. 31, No 7. – P. 1458–1468.

60. Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis / J. S. de Jong, P. J. van Diest, P. van der Valk, J. P. Baak // *The Journal of Pathology*. – 1998. – Vol. 184, No 1. – P. 53-57.

61. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome

in gastric cancer patients / E. Lieto, F. Ferraraccio, M. Orditura [et al.] // *Annals of Surgical Oncology*. – 2008. – Vol. 15, No 1. – P. 69-79.

62. Fodde, R. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer / R. Fodde, R. Smits, H. Clevers // *Nature Reviews. Cancer*. – 2001. – Vol. 1, No 1. – P. 55-67.

63. Folkman, J. Angiogenesis / J. Folkman // *Annual Review of Medicine*. – 2006. – Vol. 57. – P. 1-18.

64. Galectin 1 proangiogenic and promigratory effects in the Hs683 oligodendroglioma model are partly mediated through the control of BEX2 expression / M. Le Mercier, S. Fortin, V. Mathieu [et al.] // *Neoplasia*. – 2009. – Vol. 11, No 5. – P. 485–496.

65. Galectin-1 dimers can scaffold Raf-effectors to increase H-ras nanoclustering / O. Blaževičs, Y. G Mideksa, M. Šolman [et al.]. – DOI 10.1038/srep24165 // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – URL: <https://www.nature.com/articles/srep24165> (access date: 28.02.2025).

66. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy / V. L. Thijssen, R. Postel, R. J. Brandwijk [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, No 43. – P. 15975–15980.

67. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells / S. H. Hsieh, N. W. Ying, M. H. Wu [et al.] // *Oncogene*. – 2008. – Vol. 27, No 26. – P. 3746–3753.

68. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death / B. N. Stillman, D. K. Hsu, M. Pang [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2006. – Vol. 176, No 2. – P. 778–789.

69. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity / G. Elad-Sfadia, R. Haklai, E. Balan, Y. Kloog // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, No 33. – P. 34922–34930.

70. Galectin-3 in angiogenesis and metastasis / T. Funasaka, A. Raz, P. Nangia-Makker // *Glycobiology*. – 2014. – Vol. 24, No 10. – P. 886–891.

71. Galectin-3 induces cell migration via a calcium-sensitive MAPK/ERK1/2 pathway / X. Gao, V. Balan, G. Tai, A. Raz // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5, No 8. – P. 2077–2084.

72. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis / P. Nangia-Makker, Y. Honjo, R. Sarvis [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2000. – Vol. 156, No 3. – P. 899–909.

73. Galectin-3 interacts with components of the nuclear ribonucleoprotein complex / K. Fritsch, M. Mernberger, A. Nist [et al.]. – DOI 10.1186/s12885-016-2546-0 // *BMC Cancer*. – 2016. – Vol. 16. – URL: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2546-0> (access date: 28.02.2025).

74. Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells / V. Furtak, F. Hatcher, J. Ochieng // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2001. – Vol. 289, No 4. – P. 845–850.

75. Galectins as modulators of receptor tyrosine kinases signaling in health and disease / N. Porębska, M. Poźniak, M. Matynia [et al.] // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2021. – Vol. 60. – P. 89–106.

76. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // *CA: a cancer journal for clinicians*. – 2021. – Vol. 71, No 3. – P. 209–249.

77. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors / D. O. Croci, J. P. Cerliani, T. Dalotto-Moreno [et al.] // *Cell*. – 2014. – Vol. 156, No 4. – P. 744–758.

78. Gordon-Alonso, M. Extracellular galectins as controllers of cytokines in hematological cancer / M. Gordon-Alonso, A. M. Bruger, P. van der Bruggen // *Blood*. – 2018. – Vol. 132, No 5. – P. 484–491.

79. Grady, W. M. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer / W. M. Grady, S. D. Markowitz // *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. – 2002. – Vol. 3. – P. 101–128.

80. High preoperative white blood cell count determines poor prognosis and is associated with an immunosuppressive microenvironment in colorectal cancer / M. Weng, W. Zhao, Y. Yue [et al.]. – DOI 10.3389/fonc.2022.943423 // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – Vol. 12. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.943423/full> (access date: 28.02.2025).

81. Identification of CD206 as a potential biomarker of cancer stem-like cells and therapeutic agent in liver cancer / W. Fan, X. Yang, F. Huang [et al.] // *Oncology Letters*. – 2019. – Vol. 18, No 3. – P. 3218– 3226.

82. Idos, G. Lynch Syndrome : [Initial Posting: February 5, 2004; Last Update: February 4, 2021] / G. Idos, L. Valle ; eds M. P. Adam, J. Feldman , G. M. Mirzaa [et al.] // *GeneReviews®*. – Seattle (WA) : University of Washington, Seattle, 1993-2025. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/> (access date: 28.02.2025).

83. Increased plasma levels of galectin-1 in pancreatic cancer: potential use as biomarker / N. Martinez-Bosch, L. E. Barranco, C. A. Orozco [et al.] // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9, No 68. – P. 32984–32996.

84. Infiltration of CD8⁺ T cells into tumor cell clusters in triple-negative breast cancer / X. Li, T. Gruosso, D. Zuo [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2019. – Vol. 116, No 9. – P. 3678–3687.

85. Jafarov S., Link K.H. Colon and rectal cancer are different tumor entities according to epidemiology, carcinogenesis, molecular- and tumor biology, primary and secondary prevention^ preclinical evidence. *Siberian journal of oncology*. 2018;17(4):88-98. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2018-17-4-88-98>.

86. Johannes, L. Galectins at a glance / L. Johannes, R. Jacob, H. Leffler. – DOI 10.1242/jcs.208884 // *Journal of Cell Science*. – 2018. – Vol. 131, No 9. – URL:

<https://journals.biologists.com/jcs/article/131/9/jcs208884/57083/Galectins-at-a-glance> (access date: 28.02.2025).

87. Kim, S. J. Non-classical role of Galectin-3 in cancer progression: translocation to nucleus by carbohydrate-recognition independent manner / S. J. Kim, K. H. Chun. – DOI 10.5483/BMBRep.2020.53.4.020 // BMB Reports. – 2020. – Vol. 53, No 4. – P. 173–180.

88. Liu, F. T. Intracellular functions of galectins / F. T. Liu, R. J. Patterson, J. L. Wang // Biochimica Et Biophysica Acta. – 2002. – Vol. 1572, No 2-3. – P. 263–273.

89. Locati, M. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity / M. Locati, G. Curtale, A. Mantovani // Annual Review of Pathology. – 2020. – Vol. 15. – P. 123–147.

90. Madoiwa, S. [Cancer and thrombosis] / S. Madoiwa // Gan to Kagaku Ryoho = Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy. – 2009. – Vol. 36, No 11. – P. 1781–1787. – Статья на японском языке.

91. Markowska, A. I. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response / A. I. Markowska, F. T. Liu, N. Panjwani // The Journal of Experimental Medicine. – 2010. – Vol. 207, No 9. – P. 1981–1993.

92. Matsumoto, T. VEGF receptor signal transduction / T. Matsumoto, L. Claesson-Welsh. – DOI 10.1126/stke.2001.112.re21 // Science's STKE: signal transduction knowledge environment. – 2001. – Vol. 2001, No 112. – URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/stke.2001.112.re21> (access date: 28.02.2025).

93. Mechanisms of angiogenesis in tumour / R. Zhang, Y. Yao, H. Gao, X. Hu. – DOI 10.3389/fonc.2024.1359069 // Frontiers in Oncology. – 2024. – Vol. 14. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2024.1359069/full> (access date: 28.02.2025).

94. Mendelsohn, J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer / J. Mendelsohn, J. Baselga // Journal of Clinical Oncology: official Journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2003. – Vol. 21, No 14. – P. 2787–2799.

95. Mitsudomi, T. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer / T. Mitsudomi, Y. Yatabe // *The FEBS Journal*. – 2010. – Vol. 277, No 2. – P. 301-308.

96. Nabi, I. R. The galectin lattice at a glance / I. R. Nabi, J. Shankar, J. W. Dennis // *Journal of Cell Science*. – 2015. – Vol. 128, No 13. – P. 2213–2219.

97. Novak, R. Galectin-1 and galectin-3 expression profiles in classically and alternatively activated human macrophages / R. Novak, S. Dabelic, J. Dumic. – 2012. – Vol. 1820, No 9. – P. 1383–1390.

98. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages / S. G. Correa, C. E. Sotomayor, M. P. Aoki [et al.] // *Glycobiology*. – 2003. – Vol. 13, No 2. – P. 119–128.

99. Pavlova, N. N. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism / N. N. Pavlova, C. B. Thompson // *Cell Metabolism*. – 2016. – Vol. 23, No 1. – P. 27–47.

100. Peltomäki, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer / P. Peltomäki // *Journal of Clinical Oncology: official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2003. – Vol. 21, No 6. – P. 1174–1179.

101. Pinho, S. S. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications / S. S. Pinho, C. A. Reis // *Nature Reviews Cancer*. – 2015. – Vol. 15, No 9. – P. 540–555.

102. Rabinovich, G. A. Shaping the Immune Landscape in Cancer by Galectin-Driven Regulatory Pathways / G. A. Rabinovich, J. R. Conejo-García // *Journal of Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 428, No 16. – P. 3266–3281.

103. Rabinovich, G. A. Turning «sweet» on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation / G. A. Rabinovich, M. A. Toscano // *Nature Reviews. Immunology*. – 2009. – Vol. 9, No 5. – P. 338–352.

104. Rational design of potent and selective EGFR tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents / S. Ghosh, X. P. Liu, Y. Zheng, F. M. Uckun // *Current Cancer Drug Targets*. – 2001. – Vol. 1, No 2. – P. 129–140.

105. Recent progress on vascular endothelial growth factor receptor inhibitors with dual targeting capabilities for tumor therapy / Y. Liu, Y. Li, Y. Wang [et al.]. – DOI 10.1186/s13045-022-01310-7 // Journal of Hematology & Oncology. – 2022. – Vol. 15, No 1. – URL: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-022-01310-7> (access date: 28.02.2025).

106. Recent Update of Natural Compounds as HIF-1 α Inhibitors in Colorectal Carcinoma / P. Pandey, S. Lakhanpal, D. Mahmood и др. // Drug Design, Development and Therapy. – 2025. – Т. 19. – С. 2017-2034.

107. Redefining Tumor-Associated Macrophage Subpopulations and Functions in the Tumor Microenvironment / K. Wu., K. Lin, X. Li [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2020.01731 // Frontiers in immunology. – 2020. – Vol. 11. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.01731/full> (access date: 28.02.2025).

108. Regulation of RAW264.7 macrophage polarization on smooth and rough surface topographies by galectin-3 / F. Kianoush, M. Nematollahi, J. D. Waterfield, D. M. Brunette. – DOI 10.1002/jbm.a.36107 // Journal of Biomedical Materials Research. Part A. – 2017. – Vol. 105, No 9. – P. 2499–2509.

109. Regulation of tumor angiogenesis by oxygen-regulated protein 150, an inducible endoplasmic reticulum chaperone / K. Ozawa, Y. Tsukamoto, O. Hori [et al.] // Cancer Research. – 2001. – Vol. 61, No 10. – P. 4206–4213.

110. Risks of colorectal and other cancers after endometrial cancer for women with Lynch syndrome / A. K. Win, N. M. Lindor, I. Winship [et al.] // Journal of the National Cancer Institute. – 2013. – Vol. 105, No 4. – P. 274–279.

111. Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy / F. C. Chou, H. Y. Chen, C. C. Kuo, H. K. Sytwu. – DOI 10.3390/ijms19020430 // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19, No 2. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/2/430> (access date: 28.02.2025).

112. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis / V. Riabov, A. Gudima, N. Wang [et al.]. – DOI

10.3389/fphys.2014.00075 // *Frontiers in Physiology*. – 2014. – Vol. 5. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2014.00075/full> (access date: 28.02.2025).

113. Ruvolo, P. P. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment / P. P. Ruvolo // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2016. – Vol. 1863, No 3. – P. 427–437.

114. Salluh, J. I. Antiphospholipid antibodies and multiple organ failure in critically ill cancer patients / J. I. Salluh, M. Soares, E. De Meis // *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. – 2009. – Vol. 64, No 2. – P. 79–82.

115. Singh, B. EGF receptor ligands: recent advances [version 1; peer review: 3 approved] / B. Singh, G. Carpenter, R. J. Coffey. – DOI 10.12688/f1000research.9025.1 // *F1000Research*. – 2016. – Vol. 5. – URL: <https://f1000research.com/articles/5-2270/v1?transcendId=ef49a3f1-d8c1-47d6-88fc-50e41130631f&s3BucketUrl=https%3A%2F%2Ff1000research.s3.amazonaws.com>nKey=GTM-PCBS9JK&transcendEnv=cm&submissionUrl=%2Ffor-authors%2Fpublish-your-research&otid=1bc074d1-3db4-47ed-9f80-df1a4a3f2ab4&immUserUrl=https%3A%2F%2Ff1r-proxy.f1krdev.com%2Feditor%2Fmember%2Fshow%2F> (access date: 28.02.2025).

116. Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression / M. R. Girotti, M. Salatino, T. Dalotto-Moreno, G. A. Rabinovich. – DOI 10.1084/jem.20182041 // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2020. – Vol. 217, No 2. – URL: <https://rupress.org/jem/article/217/2/e20182041/133540/Sweetening-the-hallmarks-of-cancer-Galectins-as> (access date: 28.02.2025).

117. Tanaka, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies / T. Tanaka. – DOI 10.4103/1477-3163.49014 // *Journal of Carcinogenesis*. – 2009. – Vol. 8, No 1. – URL: <https://carcinogenesis.com/textasp2009/8/1/5/49014> (access date: 28.02.2025).

118. Targeting tumor-associated macrophages: Critical players in tumor progression and therapeutic strategies (Review) / P. Su, O. Li, K. Ke [et al.]. – DOI

10.3892/ijo.2024.5648 // International Journal of Oncology. – 2024. – Vol. 64, No 6. – URL: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2024.5648> (access date: 28.02.2025).

119. TGF β signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation / D. Gong, W. Shi, S. Yi [et al.]. – DOI 10.1186/1471-2172-13-31 // BMC Immunology. – 2012. – Vol. 13. – URL: <https://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2172-13-31> (access date: 28.02.2025).

120. The Impact of the Tumor Microenvironment on Macrophage Polarization in Cancer Metastatic Progression / H. Wang, M. M. H. Yung, H. Y. S. Ngan [et al.]. – DOI 10.3390/ijms22126560 // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, No 12. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/12/6560> (access date: 28.02.2025).

121. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification / F. Bertolini, Y. Shaked, P. Mancuso, R. S. Kerbel // Nature Reviews. Cancer. – 2006. – Vol. 6, No 11. – P. 835–845.

122. The role of macrophage subtypes and exosomes in immunomodulation / A. T. Gharavi, N. A. Hanjani, E. Movahed, M. Doroudian. – DOI 10.1186/s11658-022-00384-y // Cellular & Molecular Biology Letters. – 2022. – Vol. 27. – URL: <https://cmbi.biomedcentral.com/articles/10.1186/s11658-022-00384-y> (access date: 28.02.2025).

123. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis / A. S. Jaipersad, G. Y. Lip, S. Silverman, E. Shantsila // Journal of the American College of Cardiology. – 2014. – Vol. 63, No 1. – P. 1-11.

124. The use of immunohistochemistry for biomarker assessment--can it compete with other technologies? / R. W. Dunstan, K. A. Wharton Jr, C. Quigley, A. Lowe // Toxicologic Pathology. – 2011. – Vol. 39, No 6. – P. 988–1002. – Erratum in: Toxicologic Pathology. 2012. Vol. 40, No 1. P. 127.

125. Thiemann, S. Galectins and Immune Responses—Just How Do They Do Those Things They Do? / S. Thiemann, L. G. Baum [et al.] // *Annual review of immunology*. – 2016. – Vol. 34. – P. 243–264.
126. Thijssen, V. L. Galectins in Endothelial Cell Biology and Angiogenesis: The Basics / V. L. Thijssen. – DOI 10.3390/biom11091386 // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, No 9. – URL: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/9/1386> (access date: 28.02.2025).
127. Thijssen, V. L. J. L. Vascular galectins in tumor angiogenesis and cancer immunity / V. L. J. L. Thijssen. – DOI 10.1007/s00281-024-01014-9 // *Seminars in Immunopathology*. – 2024. – Vol. 46, No 1-2. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-024-01014-9> (access date: 28.02.2025).
128. Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10 Synergistically Regulate Humoral Immunity via Modulating Metabolic Signals / T. Komai, M. Inoue, T. Okamura [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2018.01364 // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.01364/full> (access date: 28.02.2025).
129. Tumor-Associated Macrophages as Treatment Targets in Oncology / A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci [et al.] // *Nature reviews. Clinical oncology*. – 2017. – Vol. 14, No 7. – P. 399–416.
130. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers / I. Larionova, G. Tuguzbaeva, A. Ponomaryova [et al.]. – DOI 10.3389/fonc.2020.566511 // *Frontiers in oncology*. – 2020. – Vol. 10. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.566511/full> (access date: 28.02.2025).
131. Tumor-derived Exosomal ENO2 Modulates Polarization of Tumor-associated Macrophages through Reprogramming Glycolysis to Promote Progression of Diffuse Large B-cell Lymphoma / R. Shao, C. Liu, R. Xue [et al.] // *International Journal of Biological Sciences*. – 2024. – Vol. 20, No 3. – P. 848–863.

132. Tumor-associated macrophages heterogeneity drives resistance to clinical therapy / S. Guo, X. Chen, C. Guo, W. Wang. – DOI 10.1017/erm.2022.8 // Expert Reviews in Molecular Medicine. – 2022. – Vol. 24. – URL: <https://www.cambridge.org/core/journals/expert-reviews-in-molecular-medicine/article/tumourassociated-macrophages-heterogeneity-drives-resistance-to-clinical-therapy/B30AEBFC090C3C2F0DD2D8EB9539A8A6> (access date: 28.02.2025).

133. Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration / A. Hittelet, H. Legendre, N. Nagy [et al.] // International Journal of Cancer. – 2003. – Vol. 103, No 3. – P. 370–379.

134. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis / C. S. Melincovici, A. B. Boşca, S. Şuşman // Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie. – 2018. – Vol. 59, No 2. – P. 455–467.

135. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis / N. D'Haene, S. Sauvage, C. Maris [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0067029 // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, No 6. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0067029> (access date: 28.02.2025). – Erratum in: PLoS One. 2023. Vol. 18, No 12.

136. Xiao, Y. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer / Y. Xiao, D. Yu. – DOI 10.1016/j.pharmthera.2020.107753 // Pharmacology & Therapeutics. – 2021. – Vol. 221. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725820302849?via%3Dihub> (access date: 28.02.2025).

137. $\gamma\delta$ T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR- $\alpha\beta$ + / CD19+ lymphocytes / I. Airoidi, A. Bertaina, I. Prigione [et al.] // Blood. – 2015. – Vol. 125, No 15. – P. 2349–2358. – Erratum in: Blood. 2016. Vol. 127, No 12. P. 1620.