

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

На правах рукописи

Полетика Вадим Сергеевич

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

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

д-р мед. наук, профессор,
член-корреспондент РАН
О.И. Уразова

д-р мед. наук
Ю.В. Колобовникова

Томск – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Рак толстого кишечника: этиология и патогенез	13
1.2 Основные механизмы противоопухолевого иммунитета	17
1.3 Роль галектинов в регуляции иммунитета	20
1.4 Роль галектинов типа 1 и 3 в механизмах противоопухолевого иммунитета	26
1.5 Экспрессия галектинов типа 1 и 3 при опухолевых заболеваниях	30
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1 Клиническая характеристика обследованных пациентов	34
2.2 Материал исследования	37
2.3 Методы исследования	38
2.3.1 Оценка экспрессии галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани толстого кишечника	38
2.3.2 Иммунофенотипирование лимфоцитов крови	39
2.3.3 Выделение и культивирование мононуклеарных лейкоцитов периферической крови	41
2.3.4 Определение содержания галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической крови	42
2.3.5 Определение содержания цитокинов в супернатантах суспензионной культуры мононуклеарных лейкоцитов крови	43
2.3.6 Статистический анализ результатов	45
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46

3.1	Экспрессия галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника	46
3.2	Содержание галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической крови у больных раком толстого кишечника	49
3.3	Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов крови у больных раком толстого кишечника	51
3.4	Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови у больных раком толстого кишечника	53
3.5	Взаимосвязь содержания галектинов-1,3 в крови с особенностями субпопуляционного состава и цитокин-секреторной активности CD4 ⁺ Т-лимфоцитов у больных раком толстого кишечника	56
3.6	Взаимосвязь экспрессии галектинов-1,3 и показателей дисрегуляции адаптивного иммунитета с клинико-морфологическими параметрами опухоли у больных раком толстого кишечника	58
Глава 4.	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	67
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
	ВЫВОДЫ	86
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	87
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	89

ВВЕДЕНИЕ

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

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

Ключевым проявлением опухоль-индуцированной дисрегуляции иммунных реакций и супрессии механизмов противоопухолевого иммунитета при злокачественных новообразованиях является нарушение баланса субпопуляций адаптивных CD4⁺ Т-лимфоцитов с регуляторной активностью [Vesely M.D. et al., 2011; Tosolini M. et al., 2011; Spurrell E.L. et al., 2014; Xia A. et al., 2019]. Известно, что центральными клетками-регуляторами иммунного ответа, вовлеченными в патогенез опухолевого процесса, являются Т-лимфоциты-хелперы (Th – T-helpers) типа 1 (Th1) и Treg – Т-регуляторные лимфоциты с иммуносупрессорной активностью. Их регуляторные эффекты опосредованы молекулами – рецепторами и цитокинами, синтез которых, в свою очередь, контролируется внутриклеточными белками, модулирующими транскрипцию специфических участков ДНК. В целом, указанные белки (транскрипционные факторы) функционируют как регуляторы экспрессии генов и дифференцировки иммунных клеток. Так, дифференцировочный транскрипционный фактор Th1-клеток – T-bet индуцирует экспрессию гена и синтез IFN (interferon – интерферон) γ . IFN γ опосредует элиминацию злокачественных клеток путем увеличения цитотоксического потенциала лимфоцитов и стимуляции антиген-презентирующих клеток, в том числе их ферментативной и секреторной активности [Ling A. et al., 2016; En Tay R. et al., 2020]. В свою очередь, Treg-клетки за счет контактного ингибирования, а также регулируемой транскрипционным фактором Foxp3 секреции иммуносупрессорных цитокинов – IL (interleukin – интерлейкин) 10 и TGF (transforming growth factor – трансформирующий фактор роста) β , подавляют реакции врожденного и адаптивного (гуморального и клеточного) иммунитета. TGF β является фактором конверсии наивных Т-хелперов в Treg-клетки [Tosolini M. et al., 2011; Li C. et al., 2020].

Важное значение в потенцировании реакций Th1-иммунного ответа и патогенезе противоопухолевой защиты отводится Th17-лимфоцитам, дифференцировка которых регулируется фактором транскрипции RORC2, активирующим образование клетками маркерного провоспалительного цитокина IL-17A. Посредством IL-17A Т-лимфоциты-хелперы типа 17 участвуют в

деструкции опухоли и элиминации опухолевых клеток, привлекая в очаг новообразования CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) и нейтрофилы [Amicarella F. et al., 2017; Chang S.H., 2019].

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

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

Участие галектинов (типов 1 и 3) в регуляции противоопухолевого иммунитета активно обсуждается в научном сообществе [Rabinovich G.A. et al., 2016; Chou F. et al., 2018; Navarro P. et al., 2020]. На *in vitro* моделях меланомы и лимфомы Ходжкина продемонстрирована способность галектина-1, продуцируемого злокачественными клетками, избирательно подавлять Th1-

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

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

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

Задачи исследования:

1. Оценить экспрессию галектина-1 и галектина-3 в клетках опухоли и концентрацию галектинов 1 и 3 в плазме периферической крови у больных раком толстого кишечника.
2. На основе анализа нарушений субпопуляционного состава адаптивных CD4⁺ Т-лимфоцитов-хелперов крови Th1, Th17, Treg и их цитокин-секреторной активности определить патогенетические факторы иммунной дисрегуляции у пациентов с раком толстого кишечника.
3. Проанализировать связь плазменной концентрации галектинов 1 и 3 с нарушениями субпопуляционного состава и цитокин-секреторной активности

регуляторных Т-лимфоцитов крови ($CD4^+T\text{-bet}^+$ Th1, $CD4^+RORC2^+$ Th17, $CD4^+Foxp3^+$ Treg) при раке толстого кишечника.

4. Дать комплексную оценку галектин-1,3-зависимой дисрегуляции иммунитета во взаимосвязи со степенью дифференцированности и распространения (инвазии) первичной опухоли, наличием метастазов у больных раком толстого кишечника.

Научная новизна. Впервые при раке толстого кишечника проведено комплексное исследование галектин-1- и галектин-3-зависимых механизмов дисрегуляции адаптивного иммунитета во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами опухолевого процесса. Установлено, что количество клеток, экспрессирующих галектин-1 и галектин-3, в опухолевой ткани у больных с аденокарциномой толстого кишечника выше, чем при аденомах соответствующей локализации. Патогенетическими факторами иммунной дисрегуляции при раке толстого кишечника являются снижение числа и секреторной активности Th1- и Th17-клеток крови и одновременная активация Treg-лимфоцитов с иммуносупрессорными свойствами. Показано, что у больных колоректальным раком нарушения субпопуляционного состава и цитокин-секреторной функции регуляторных $CD4^+$ Т-лимфоцитов крови ($CD4^+T\text{-bet}^+$ Th1, $CD4^+RORC2^+$ Th17, $CD4^+Foxp3^+$ Treg) коррелируют с увеличением концентрации галектинов 1 и 3 в периферической крови.

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

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

Результаты исследования используются на кафедре патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России в учебном процессе по дисциплинам «Патофизиология, клиническая патофизиология» (для специальностей 31.05.01

Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия при подготовке обучающихся по программам специалитета; темы «Патофизиология тканевого роста» и «Патофизиология иммунитета. Иммунодефициты») и «Патологическая физиология» (для подготовки кадров высшей квалификации по направлению 30.06.01 Фундаментальная медицина; темы «Патофизиология тканевого роста» и «Роль иммунной системы в патологии»).

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

Положения, выносимые на защиту:

1. Иммунная дисрегуляция при раке толстого кишечника развивается вследствие дефицита регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+T\text{-bet}^+$, $CD4^+RORC2^+$ и *in vitro* гипосекреции IL-17A при увеличении числа и TGF β 1-секреторной активности супрессорных $CD4^+Foxp3^+$ Treg-клеток.
2. Патогенетические факторы иммунной дисрегуляции при раке толстого кишечника связаны с увеличением концентрации галектина-1 и галектина-3 в плазме крови. Определяется прямое соотношение между концентрацией галектина-

1 в крови и количеством галектин-1-позитивных клеток в ткани злокачественного новообразования.

3. Галектин-1,3-зависимые нарушения субпопуляционного состава и цитокин-секреторной функции иммунорегуляторных Т-лимфоцитов и гиперэкспрессия галектинов 1 и 3 в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника сочетаются с низкой дифференцированностью и высокой степенью инвазии первичной опухоли, наличием регионарных и отдаленных метастазов.

4. Повышение содержания галектинов 1 и 3 в крови и опухолевой ткани и проявления дисрегуляции адаптивного иммунитета наиболее выражены при высокой степени злокачественности опухоли толстого кишечника.

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

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

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

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов

и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 16 рисунками и 10 таблицами. Библиографический указатель включает 189 источников, из них 8 отечественных и 181 иностранных авторов.

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

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Рак толстого кишечника: этиология и патогенез

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, рак толстого кишечника занимает одну из лидирующих позиций по показателям распространённости и смертности среди злокачественных новообразований, являясь четвертым по встречаемости и вторым по летальности в человеческой популяции. В 2018 году доля пациентов с впервые выявленным колоректальным раком составила 6,1%, а число летальных исходов в статистике онкологической смертности достигло 9,2% [Bray F. et al., 2018]. Данные показатели существенно варьируют в зависимости от половой принадлежности пациентов (параметры выявляемости и летальности среди женщин примерно на 25% ниже таковых среди мужчин) и географического расположения регионов (наиболее высокие показатели регистрируются в развитых странах, включая Северную Америку и Европу).

В России злокачественные новообразования толстого кишечника по распространенности занимают пятое место у мужчин (6,6%) и четвертое место среди лиц женского пола (7,2%), по показателю смертности – пятое и второе места соответственно. В Томской области по частоте встречаемости колоректальный рак у мужчин находится на четвертом месте, а у женщин – на третьем [Каприн А.Д. и соавт., 2018].

Аналогично многим другим солидным опухолям, рак толстого кишечника превалирует в возрастной группе старше 50 лет, на долю которой приходится около 90% всех выявляемых случаев заболевания. Вместе с тем, в экономически развитых и развивающихся странах растёт заболеваемость среди лиц младше 50 лет, что преимущественно связывают с вестернизацией диеты (потребление пищи, богатой калориями и бедной нутриентами), снижением физической активности, распространением вредных привычек, а также злоупотреблением антибиотиками [Hofseth L.J. et al., 2020].

Злокачественные новообразования толстого кишечника развиваются под влиянием комбинации средовых и генетических факторов. Приблизительно в 60-65% случаев колоректальный рак имеет спорадическую природу (возникает в отсутствие семейного анамнеза и врожденных мутаций, увеличивающих риск развития данного новообразования) и развивается в результате накопления генетических и эпигенетических aberrаций, возникающих под влиянием факторов внешней среды [Jasperson K. W. et al., 2010]. В оставшихся 35-40% случаев у пациентов выявляется наследственный компонент, среди которых у 5-10% пациентов имеются врожденные онкологические синдромы, а именно, синдром Линча (наследственный неполипозный колоректальный рак) и семейный аденоматозный полипоз [Jasperson K.W. et al., 2010].

Согласно данным Всемирного фонда по исследованию рака (2018), к основным факторам риска развития рака толстого кишечника относятся: ожирение, низкая физическая активность, особенности диеты (чрезмерное потребление красного мяса, низкий уровень клетчатки и кальция), злоупотребление алкоголем [World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Expert Report 2018. Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer] и курение [Liang P.S. et al., 2009]. Так, при ожирении преобладание висцеральной жировой ткани, адипоциты которой продуцируют большее количество провоспалительных цитокинов и значительно меньше – адипонектина [Bruun J.M. et al., 2005; Samaras K. et al., 2010], опосредует развитие хронического системного воспаления и инсулинорезистентности, а также способствует увеличению секреции инсулиноподобного фактора роста (insulin-like growth factor – IGF) 1 [Calle E.E. et al., 2004], что создает благоприятные условия для чрезмерной пролиферации клеток кишечного эпителия и их злокачественной трансформации. Взаимосвязь между употреблением красного мяса, приготовленного при высокой температуре, и риском развития колоректального рака обусловлена содержащимися в нем канцерогенными веществами (гемовое железо, нитрозные соединения, ионизированные жирные кислоты, гетероциклические амины и полициклические ароматические углеводороды), образующимися в процессе

приготовления [Cascella M. et al., 2018; Gamage S.M.K. et al., 2018]. В свою очередь, употребление достаточного количества продуктов, содержащих клетчатку, напротив, снижает вероятность возникновения рака толстого кишечника, что объясняется улучшением моторной функции кишечника, а также поддержанием нормального состава кишечной микрофлоры, что препятствует злокачественной трансформации эпителиоцитов [Keum N. et al., 2019].

В свою очередь, предрасполагающими факторами в развитии и прогрессии колоректального рака могут быть изменения в генотипе: а) количественные и структурные хромосомные aberrации; б) отдельные эпигенетические модификации, в частности гиперметилирование *CG*-повторов промоторных участков генов-супрессоров (таких как *MLH1*, *MINT1*, *MINT2* и *MINT3*); в) микросателлитная нестабильность (microsatellite instability – MSI), заключающаяся в случайных изменениях длин коротких tandemных нуклеотидных повторов ДНК – микросателлитов [Keum N. et al., 2019]. Перечисленные выше молекулярные изменения в особенности характерны для спорадических случаев колоректального рака, частота встречаемости которых составляет 85, 20 и 15% соответственно [Carethers J.M. et al., 2015].

Спорадические злокачественные новообразования толстого кишечника в подавляющем большинстве случаев развиваются из аденоматозных и зубчатых полипов [Conteduca V. et al., 2013]. При аденоматозном (наиболее распространенном) варианте из-за постепенного накопления генетических и эпигенетических изменений новообразование проходит последовательно стадии малой и крупной аденомы, и аденокарциномы. Ключевым событием в данном процессе являются инактивирующие мутации гена *APC* (adenomatous polyposis coli), приводящие к гиперактивации сигнального Wnt/ β -катенин-пути и дисрегуляции клеточной пролиферации [Dow L.E. et al., 2015]. Последующие мутации онкогена *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) стимулируют рост аденомы, а инактивация гена *TP53* способствует ее злокачественной трансформации [Armaghany T. et al., 2012]. Особенностью патогенеза колоректального рака, развивающегося из зубчатых полипов, является рано

возникающая мутация онкогена *BRAF* (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase), появление которой необходимо для индукции неконтролируемой пролиферации клеток в процессе образования гиперпластического полипа [Kedrin D. et al., 2015].

Альтернативный механизм трансформации клеток при раке толстого кишечника обусловлен мутагенным эффектом хронического воспаления. По данным Т. Jess et al. (2012), у лиц с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника, в особенности с неспецифическим язвенным колитом, риск развития колоректального рака в 2,4 раза выше, чем в среднем по популяции [Jess T. et al., 2012]. Начальным этапом развития рака толстого кишечника является появление дисплазии кишечного эпителия, постепенно трансформирующейся в карциному *in situ* [Itzkowitz S.H. et al., 2004]. По мнению авторов, отличительной особенностью в этом случае является ранняя инактивация гена *TP53*, в то время как мутации гена *APC* регистрируются редко, преимущественно на поздних стадиях опухолевой прогрессии [Itzkowitz S.H. et al., 2004].

Наряду с накоплением опухолевыми клетками генетических и эпигенетических изменений, возникающих под действием мутагенных факторов, центральную роль в патогенезе злокачественных новообразований играет взаимодействие опухоли с иммунной системой макроорганизма. Известно, что на начальных этапах канцерогенеза трансформированные клетки уязвимы к туморицидному действию иммунокомпетентных клеток, которые по-прежнему способны распознавать и отвечать на опухолевые антигены. Однако по мере опухолевой прогрессии и накопления драйверных мутаций, образующихся вследствие естественного отбора, клетки опухоли приобретают способность ускользать из-под иммунологического надзора, а позднее – активно подавлять направленный против них иммунный ответ [Fridman W.H., 2018]. В зависимости от вида новообразования проявления опухоль-индуцированной иммуносупрессии могут различаться.

При колоректальном раке опухолевое микроокружение характеризуется особо выраженными иммуносупрессорными свойствами, что связано с

необходимостью поддержания толерантности слизистой оболочки толстого кишечника к пищевым и бактериальным антигенам [Markman J.L. et al., 2015]. Ключевым проявлением опухоль-индуцированной иммуносупрессии при раке толстого кишечника является дисбаланс Т-лимфоцитов с регуляторной активностью, изменение их функциональной активности, а также снижение способности иммунокомпетентных клеток подавлять рост и развитие опухоли [Vesely M.D. et al., 2011; Tosolini M. et al., 2011; Spurrell E.L. et al., 2014].

1.2 Основные механизмы противоопухолевого иммунитета

Центральную роль в патогенезе злокачественных новообразований играет опухолевое микроокружение, включающее мезенхимальные клетки (фибробласты, адипоциты и т. д.), кровеносные и лимфатические сосуды, иммунокомпетентные клетки и элементы внеклеточного матрикса. Внутриопухолевые резидентные и рекрутированные клетки миелоидного и лимфоидного происхождения в зависимости от фенотипа и функциональной активности способны как стимулировать, так и подавлять рост и прогрессию опухоли, а также регулировать ответ злокачественных клеток на противоопухолевую терапию.

Необходимым условием для инициации противоопухолевого иммунного ответа является представление опухолевых антигенов Т-лимфоцитам, осуществляемое дендритными клетками и макрофагами. Антиген-специфическая активация лимфоцитов (клеточного звена иммунитета) сопровождается клональной экспансией $CD4^+$ Т-лимфоцитов-хелперов (Th) и $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), которые способны индуцировать гибель злокачественных клеток.

Известно, что эффективность противоопухолевой резистентности макроорганизма определяется балансом популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с регуляторной активностью [Facciabene A. et al., 2012]. Так, важное значение имеют Т-лимфоциты-хелперы типа 1 (Th1), ключевым цитокином которых является интерферон (interferon – IFN) γ . Он способен индуцировать экспрессию молекул

главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex – МНС) на мембране опухолевых клеток, усиливая тем самым иммуногенность опухоли [Martini M. et al., 2010], а также активировать популяцию провоспалительных макрофагов (M1) [Haabeth O.A.W., 2011], что опосредует развитие воспалительной реакции, направленной на элиминацию злокачественных клеток. Кроме этого, IFN γ способен усиливать цитотоксическую активность НК-клеток и ЦТЛ [Balkwill F.R. et al., 2011], угнетать пролиферацию (путем увеличения экспрессии белков p21 и p27), индуцировать апоптоз опухолевых клеток [Chawla-Sarkar M. et al., 2003], а также подавлять опухоль-ассоциированный неоангиогенез [Qin Z. et al., 2003]. Вместе с тем, в условиях хронического опухоль-ассоциированного воспаления, длительная секреция IFN γ клетками опухолевого микроокружения может потенцировать злокачественную трансформацию клеток, а также усиливать их пролиферацию [Mojic M. et al., 2018]. Конститутивная продукция IFN γ в очаге новообразования может способствовать ускользанию опухоли от иммунного ответа за счет стимуляции экспрессии клетками супрессорных молекул PD (programmed cell death protein) – 1 и CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) [Mojic M. et al., 2018].

В механизмах противоопухолевого иммунного ответа неоднозначна роль еще одной субпопуляции Т-лимфоцитов-хелперов типа 17, что связано с характерной для этих клеток пластичностью. В зависимости от цитокинового микроокружения, а именно концентрации трансформирующего фактора роста (TGF) β , интерлейкина (IL) 6, IL-12, IL-21 и IL-23, CD4⁺ Th17-лимфоциты способны изменять свой фенотип в направлении Th1-лимфоцитов или Т-регуляторных клеток, что сопровождается продукцией соответствующих цитокинов [Guery L. et al., 2015]. Показано, что CD4⁺ Th17-лимфоциты, секретирующие провоспалительный цитокин IL-17A, могут оказывать разнонаправленное влияние на рост опухолевых клеток: с одной стороны, они повышают рекрутирование в очаг опухоли туморицидных CD8⁺ ЦТЛ и нейтрофилов, а с другой, – индуцируют опухолевый неоангиогенез и формирование метастазов [De Simone V. et al., 2013; Amicarella F. et al., 2017]. Кроме этого, IL-17A способен активировать продукцию макрофагами

провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF (tumor necrosis factor) α [Murugaiyan G. et al., 2009].

Среди Т-лимфоцитов с регуляторной активностью различают также Treg-клетки (Т-регуляторные клетки), опосредующие снижение эффективности противоопухолевого иммунитета. Путем контактного ингибирования иммунокомпетентных клеток (посредством мембранных молекул PD-1 и CTLA-4), а также секреции иммуносупрессорных цитокинов IL-10 и TGF β , Treg способны подавлять противоопухолевый иммунитет, способствуя тем самым росту опухоли [Bonertz A. et al., 2009; Tosolini M. et al., 2011]. По данным литературы, про- и противоопухолевые эффекты TGF β зависят от условий микроокружения, а также включения других внутриклеточных сигнальных каскадов [Seoane J. et al., 2017]. По данным L. Bartholin et al. (2013), TGF β играет ключевую роль в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки, адгезии и клеточной гибели, что наделяет его свойством подавлять злокачественную трансформацию эпителиальных клеток и тормозить прогрессию опухоли [Bartholin L. et al., 2013]. В то же время, высокая степень генетической нестабильности, возрастающая по мере накопления генетических и эпигенетических изменений в процессе опухолевой прогрессии, в ряде случаев позволяет злокачественным клеткам не только избегать противоопухолевого влияния TGF β , но и, напротив, обращать его «себе на пользу» [Seoane J. et al., 2006]. В исследованиях J. Massague. (2008) показана способность TGF β индуцировать рост, инвазию и метастазирование опухолей, стимулировать опухолевый неоангиогенез, а также подавлять развитие противоопухолевого иммунного ответа [Massague J., 2008]. Кроме этого, TGF β способен ингибировать продукцию хемокинов CXCL (C-X-C motif chemokine ligand) 12, CXCL1 и CXCL5, регулирующих рекрутирование в ткань опухоли клеток с провоспалительными свойствами [Yang L. et al., 2008].

На сегодняшний день известен целый ряд механизмов, позволяющих трансформированным клеткам модулировать направленный против них иммунный ответ. Одним из таких механизмов является продукция клетками самой опухоли и

элементами опухолевого микроокружения белков – галектинов [van den Brûle F. et al., 2002; Vladioiu M. et al., 2014; Chetry M. et al., 2018].

1.3 Роль галектинов в регуляции иммунитета

Галектины: определение, строение и функции

Углевод-белковые взаимодействия, происходящие внутриклеточно и на поверхности клеточных мембран, играют центральную роль во многих физиологических и патологических процессах: участвуют в регуляции роста и дифференцировки клеток, межклеточных взаимодействиях, вовлечены в реакции иммунитета, злокачественную трансформацию, прогрессию опухолей и др. [Ghazarian H. et al., 2011]. Белки, специфически взаимодействующие с гликозилированными участками гликопротеинов и гликолипидов, благодаря наличию углевод-распознающего домена (carbohydrate-recognition domain – CRD), получили название лектинов [Sharon N. et al., 2004].

Галектины – семейство лектиновых белков, общим свойством которых является наличие аффинитета к бета-галактозид-содержащим гликанам, включающим N-ацетиллактозамин [Rabinovich G.A. et al., 2007]. Все представители семейства галектинов имеют в своем составе как минимум один CRD и, в зависимости от особенностей доменной организации, делятся на *прототипные*, содержащие один CRD (галектин-1, -2, -5, 10, -11, -13, -14 и -15); *тандемные*, включающие два гомологичных CRD, соединенных линкерным участком (галектин-6, -8, -9 и -13); и *химерные*, состоящие из одного углевод-распознающего домена, соединённого с участком тандемных повторов (галектин-3) [Liu F. et al., 2005; Johannes L. et al., 2018] (Рисунок 1а). При этом, несмотря на наличие общей консервативной последовательности, ответственной за связывание гликанов, CRDs отдельных галектинов различаются по составу аминокислотных последовательностей вне участка связывания, что придает специфичность галектин-гликановым взаимодействиям [Di Lella S. et al., 2011].

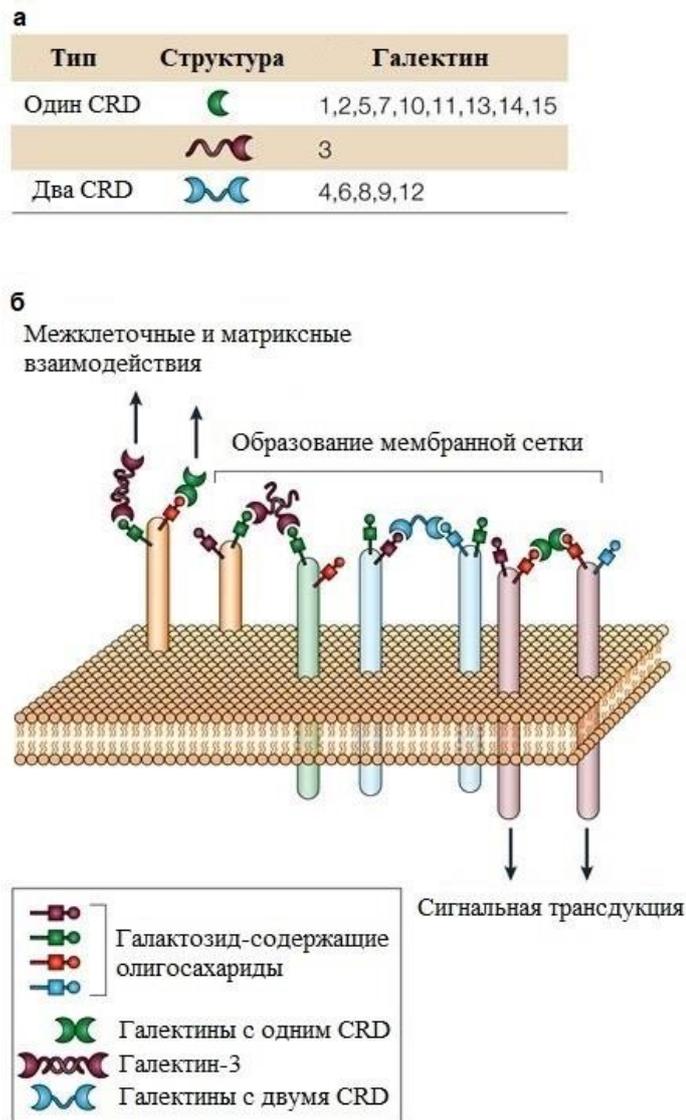


Рисунок 1 – Классификация (а) и механизмы внеклеточного действия (б) галектинов [Liu F. et al., 2005]

Экспрессия галектинов обнаруживается практически во всех клетках организма, и особенно характерна для эпителиальной ткани и клеток иммунной системы. Синтез данных белков происходит в цитозоле, откуда они могут секретироваться во внеклеточное пространство. Механизмы секреции галектинов не до конца ясны, однако предполагается, что она происходит неклассическим путем, без участия аппарата Гольджи [Johannes L. et al., 2018]. В литературе

представлены данные о возможности секреции галектинов при участии мембранных везикул – экзосом [Welton J.L. et al., 2010; Fei F. et al., 2015].

Данный класс белков характеризуется широким спектром вне- и внутриклеточных функций, включая участие в регуляции процессов клеточного деления и апоптоза, адгезии, миграции и др. [Rabinovich G.A. et al., 2002]. Отличительным свойством галектинов является их способность к олигомеризации, что делает возможным перекрестное связывание нескольких углеводных участков, представленных на гликопротеинах клеточной поверхности [Thiemann S. et al., 2016].

Галектины способны взаимодействовать с многочисленными гликопротеиновыми молекулами, такими как рецепторы факторов роста и цитокинов, молекулы адгезии и интегрины. Галектины опосредуют перекрестное связывание перечисленных гликан-содержащих структур на поверхности клетки и организацию их в мембранные «сетки», таким образом регулируют распределение рецепторов на поверхности мембраны и препятствуют их эндоцитозу [Fortuna-Costa A. et al., 2014] (Рисунок 1б). Галектин-зависимая кластеризация мембранных рецепторов может изменять клеточный ответ на действие цитокинов и факторов роста [Fortuna-Costa A. et al., 2014]. Галектины также регулируют процессы клеточной адгезии, образование гомотипических и гетеротипических межклеточных контактов, а также взаимодействие клеток с элементами межклеточного матрикса [Yang R. et al., 2008].

Регуляторное влияние галектинов на иммунокомпетентные клетки

Лектин-гликановые взаимодействия играют важную роль в регуляции функций иммунокомпетентных клеток. Описана способность галектина-4 *in vivo* стимулировать продукцию Т-лимфоцитами провоспалительного цитокина IL-6, и тем самым повышать интенсивность воспалительной реакции [Hokama A. et al., 2004]. Галектин-8 также участвует в регуляции воспаления путем модуляции адгезии нейтрофильных гранулоцитов к внеклеточному матриксу [Nishi N. et al.,

2003]. В свою очередь, галектин-9 проявляет преимущественно иммуносупрессорные свойства за счет активации апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов [Kashio Y. et al., 2003] и, напротив, подавления секреции цитокинов Th1- и Th17-лимфоцитами [Zhu C. et al., 2005; Seki M. et al., 2008].

Среди представителей семейства галектинов, центральная роль в регуляции адаптивного иммунитета принадлежит галектинам 1 и 3 [Rabinovich G.A. et al., 2002]. Галектин-1 состоит из двух субъединиц, образующих димеры при взаимодействии со специфическими лигандами. Для данного белка характерна как внутри-, так и внеклеточная локализация, хотя образование лектин-гликановых связей больше присуще его секреторной форме [Camby I. et al., 2006]. Находясь вне клетки, галектин-1 взаимодействует с O- и N-гликанами в составе различных клеточных рецепторов, включая поверхностные дифференцировочные антигены (clusters of differentiation – CD), рецепторы сосудисто-эндотелиального фактора роста и др. [Sundblad V. et al., 2017].

Иммунорегуляторный эффект галектина-1 в отношении Т-лимфоцитов осуществляется при участии нескольких механизмов, основным из которых считается индукция апоптоза [Rabinovich G.A. et al., 2000]. Показано, что взаимодействие рекомбинантного галектина-1 с Т-лимфоцитами человека, осуществляемое при участии поверхностных рецепторов CD45, CD43, CD7 и CD3, сопровождается сегрегацией указанных молекул в отдельные мембранные домены, что приводит к апоптотической гибели клеток [Pace K.E. et al., 1999].

Связывание галектина-1 с Т-клеточным рецептором (T cell receptor – TCR) не только индуцирует апоптоз, но и снижает продукцию клетками IL-2, подавляя, тем самым, антиген-зависимую активацию и клональную экспансию Т-лимфоцитов [Vespa G.N. et al., 1999; Chung C.D. et al., 2000]. Кроме этого, показана способность галектина-1 ингибировать цитокин-секреторную активность Т-клеток [Toscano M.A. et al., 2006; Stowell S.R. et al., 2008].

Важно отметить, что не все Т-лимфоциты одинаково подвержены действию галектина-1. Согласно данным M. Toscano et al. (2007), иммуносупрессорные эффекты галектина-1, включая индукцию апоптоза и подавление цитокин-

секреторной активности клеток, затрагивают преимущественно Th1- и Th17-лимфоциты, в то время как Th2-клетки проявляют резистентность к данным эффектам [Toscano M.A. et al., 2007]. В эксперименте *in vivo* авторы показали, что у мышей с делецией гена галектина-1 Т-лимфоциты селезенки характеризовались более высокой продукцией IFN γ и IL-17A по сравнению с особями контрольной группы [Toscano M.A. et al., 2007]. В то же время, некоторые исследователи приравнивают галектин-1 (по его иммулотропным эффектам) к цитокинам Th2-профиля, указывая на его способность избирательно подавлять Th1-опосредованный иммунный ответ и, напротив, стимулировать пролиферацию и функциональную активность Th2-лимфоцитов [Motran C.C. et al., 2008].

Наряду с угнетением Th-1 и Th17-зависимых реакций иммунного ответа, галектин-1 способен модулировать дифференцировку и функциональную активность Treg-лимфоцитов. Стимулирующее влияние галектина-1 на дифференцировку Treg осуществляется за счет усиления экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 [Juszczynski P. et al., 2007], а также позитивной регуляции IL-10-секреторной активности Т-лимфоцитов при уменьшении выработки IFN γ [Blois S.M. et al., 2007; Stowell S.R. et al., 2008; Cedeno-Laurent F. et al., 2012]. Экзогенный галектин-1 потенцирует образование IL-10⁺ Treg из недифференцированных и уже поляризованных Т-лимфоцитов [Cedeno-Laurent F. et al., 2012], тогда как делеция гена *галектина-1 in vivo* ассоциируется со снижением количества и цитокин-секреторной функции Т-регуляторных клеток [Dalotto-Moreno T. et al., 2013]. Рекомбинантный галектин-1 индуцирует дифференцировку *in vivo* толерогенных дендритных клеток, которые в свою очередь усиливают экспансию IL-10-продуцирующих Treg-лимфоцитов [Blois S.M. et al., 2007]. По сведениям M.I. Garin et al. (2007), галектин-1 экспрессируется самими Treg-клетками, при этом *in vitro* блокирование связывающей способности галектина-1 сопровождается снижением их иммуносупрессорного потенциала [Garin M.I. et al., 2007].

Еще одним представителем семейства лектинов, проявляющих иммуносупрессорные свойства, является галектин-3, для которого характерна

также вне- и внутриклеточная локализация. Показано, что цитоплазматическая форма галектина-3 регулирует процессы клеточной дифференцировки, пролиферации, апоптоза и др. [Dong R. et al., 2018]. В свою очередь, галектин-3, секретируемый во внеклеточное пространство участвует в регуляции воспаления и фиброза, модулирует функции клеток иммунной системы [Díaz-Alvarez L. et al., 2017].

По данным литературы, роль галектина-3 в поддержании гомеостаза Т-лимфоцитов не совсем однозначна. Секретируемый во внеклеточное пространство галектин-3 может индуцировать апоптоз Th1- и Th17-лимфоцитов [Stillman B.N. et al., 2006; Wei J. et al., 2010], хотя мембранные структуры, с которыми взаимодействуют данные лектины, различны [Stowell S.R. et al., 2008]. Галектин-3, в зависимости от источника секреции и концентрации, может как стимулировать клональную экспансию Т-лимфоцитов [Hsu D.K. et al., 1996; Stowell S.R. et al., 2008], так и индуцировать Т-клеточную анергию путем диссоциации Т-клеточного рецептора и корецепторов на мембране клеток [Demotte N. et al., 2008]. Важной особенностью галектина-3 (в отличие от галектина-1) является способность индуцировать апоптоз Th2-лимфоцитов [Stillman B.N. et al., 2006], хотя совокупный эффект галектина-3 на Th2-клетки может ассоциироваться с общим преобладанием Th2-зависимых реакций иммунной системы [Hsu D.K. et al., 2009]. Примечательно, что галектин-3, экспрессируемый внутриклеточно, опосредует, напротив, устойчивость Т-лимфоцитов к апоптозу, что обусловлено взаимодействием данного лектина с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2 [Yang R.Y. et al., 1996].

До сих пор однозначно не определена функция галектина-3 в отношении Т-регуляторных клеток. По данным ряда авторов, галектин-3 индуцирует экспансию и цитокин-секреторную способность Т-регуляторных клеток [Wei J. et al., 2010]. В свою очередь, M.L. Fermino et al. (2013) показали, что эндогенный галектин-3 негативно регулирует миграционную способность и функциональную активность Treg. В экспериментальной модели лейшманиоза у мышей делеция гена *галектина-3* сопровождалась увеличением количества Treg-лимфоцитов в периферической

ткани, а также усилением Treg-зависимой продукции иммуносупрессорных цитокинов IL-10 и TGF β по сравнению с таковыми у животных контрольной группы [Fermino M.L. et al., 2013].

1.4 Роль галектинов типа 1 и 3 в механизмах противоопухолевого иммунитета

Согласно результатам *in vitro* и *in vivo* исследований, к медиаторам, способным вызывать анергию Т-лимфоцитов, специфичных к опухолевым антигенам, и индуцировать иммуносупрессию, относятся галектин-1 и галектин-3, которые экспрессируются как самими опухолевыми клетками, так и элементами опухолевого микроокружения [Méndez-Huergo S.P. et al., 2017; Chou F. et al., 2018].

Одно из первых свидетельств участия галектина-1 в формировании и регуляции противоопухолевого иммунитета было получено N. Rubenstein et al. (2004). На первом этапе своего исследования ученые подтвердили способность опухолевых клеток *in vitro* секретировать галектин-1 с иммуносупрессорными свойствами. На примере культуры клеток меланомы B16, выбранной на основании секреции данной культурой галектина-1, авторы сгенерировали панель клеточных клонов, экспрессирующих разные уровни исследуемого лектина, а затем использовали надсадок полученных клонов для культивирования мононуклеарных лейкоцитов периферической крови. Лейкоциты, культивированные в супернатанте клеток меланомы B16 с наибольшей экспрессией галектина-1, оказались более подверженными апоптозу, при этом данный эффект нивелировался добавлением в первоначальную культуру меланомы антител, нейтрализующих галектин-1 [Rubinstein N. et al., 2004]. Далее авторы использовали полученные клоны клеток меланомы B16 в эксперименте на мышах, по результатам которого продемонстрировали способность галектина-1 *in vivo* подавлять развитие специфического противоопухолевого Т-клеточного иммунитета [Rubinstein N. et al., 2004]. Позднее P. Juszczynski et al. (2007) в поисках иммуотропных эффектов галектина-1 при лимфоме Ходжкина провели

эксперимент по *in vitro* сокультивированию опухолевых клеток Рида-Штернберга, секретирующих галектин-1, с активированными Т-лимфоцитами здоровых доноров. По результатам исследования установлено, что Т-лимфоциты, культивированные с галектин-1-позитивными опухолевыми клетками, проявляли более выраженные признаки апоптоза; среди Т-лимфоцитов преобладала субпопуляция Th2-клеток в сравнении с аналогичными данными в контрольной группе [Juszczynski P. et al., 2007]. Кроме этого, секреторный галектин-1 опосредовал экспансию Т-регуляторных клеток [Juszczynski P. et al., 2007]. Похожие данные были получены в исследовании D. Tang et al (2007). По результатам сокультивирования клеток рака поджелудочной железы, продуцирующих галектин-1, с Т-лимфоцитами периферической крови, авторы установили, что опухоль-ассоциированный галектин-1 индуцирует апоптоз CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, стимулирует секрецию Th2-цитокинов (IL-4 и IL-5), подавляя при этом продукцию Th1-зависимых медиаторов (IL-2 и IFN γ) [Tang D. et al., 2007]. Наряду с этим, T. Dalotto-Moreno et al. (2013) описали *in vivo* потенцирующий эффект галектина-1, секретируемого опухолевыми клетками при раке молочной железы, в отношении дифференцировки и иммуносупрессорной активности внутриопухолевых и периферических CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т-регуляторных клеток [Dalotto-Moreno T. et al., 2013]. Способность галектина-1 индуцировать Treg при опухолевом процессе также подтверждается данными F. Cedeno-Laurent et al. (2012), согласно которым инокуляция мышам клеток меланомы с нокаутированным геном галектина-1 ассоциировалась с 8-кратным снижением внутриопухолевых IL-10⁺ Treg, а также увеличением выживаемости животных по сравнению с таковой в контрольной группе [Cedeno-Laurent F. et al., 2012].

Следует отметить, что иммуномодулирующие эффекты галектина-1 при опухолевом процессе характерны не только для его секреторной формы. Так, E. Corapi et al. (2018) установили значение иммуносупрессорного эффекта внутриклеточного галектина-1, экспрессируемого CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами, в формировании противоопухолевого иммунного ответа [Corapi E. et al., 2018]. Еще один механизм супрессорной активности галектина-1 был продемонстрирован на

модели рака головы и шеи. Авторы показали, что продуцируемый опухолью галектин-1 стимулировал экспрессию PD-L1 и галектина-9 эндотелиоцитами опухолевых сосудов, препятствуя миграции Т-лимфоцитов в очаг новообразования [Nambiar D.K. et al., 2019].

В свою очередь, иммуотропные эффекты галектина-3 при опухолевых заболеваниях описаны в современной литературе менее подробно. На модели рака толстого кишечника у мышей было показано, что внутривенное введение галектина-3 стимулирует рост первичной опухоли за счет подавления опухоль-специфичных эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов [Peng W. et al., 2008]. В то же время, согласно данным G. Radosavljevic et al. (2011), нокаут гена галектина-3 у мышей с меланомой не оказывал влияния на цитотоксический потенциал CD8⁺ клеток, однако коррелировал с увеличением плазменной концентрации IFN γ и IL-17A, и, напротив, снижением количества внутриопухолевых Treg-лимфоцитов [Radosavljevic G. et al., 2011]. Кроме этого, галектин-3 (как и галектин-1) способен влиять на эффективность инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами. M. Gordon-Alonso et al. (2017) показали, что опухоль-ассоциированный галектин-3 может связываться с гликопротеинами на поверхности околоопухолевого внеклеточного матрикса, а также взаимодействовать с гликанами на молекулах IFN γ , секретируемого элементами опухолевого микроокружения. Результатом данного взаимодействия оказалось снижение диффузии IFN γ через межклеточное вещество и подавление рекрутирования иммунокомпетентных клеток в очаг новообразования [Gordon-Alonso M. et al., 2017].

Согласно данным литературы, опухоль-ассоциированная продукция галектинов-1,3, способных изменять эффективность противоопухолевого иммунного ответа, является одной из стратегий «выживания» опухолевых клеток. Индивидуальные эффекты галектина-1 и галектина-3 на клетки иммунной системы могут различаться, что связано со значительной гетерогенностью действия галектинов *in vivo*. Вклад отдельных типов галектинов в патогенез опухолевого процесса зависит от вида новообразования и его локализации [Compagno D. et al., 2020], что связывают с особенностями гликозилирования поверхностных

глюкоконъюгатов трансформированных клеток [Ghazarian H. et al., 2011]. В то же время, направленность иммуотропных эффектов галектинов зависит от источника их секреции. По данным G. Büchel et al. (2016), галектин-1, продуцируемый Т-лимфоцитами, потенцирует рекрутирование лимфоцитов в опухоль, в то время как секреция галектина-1 клетками нейробластомы, напротив, стимулирует рост новообразования и снижает лимфоцитарную инфильтрацию [Büchel G. et al., 2016].

Еще более непонятной является роль галектинов-1,3, циркулирующих в периферической крови [Johannes L. et al., 2018]. Известно, что иммуотропные эффекты галектинов реализуется при непосредственном взаимодействии трансформированных клеток с элементами опухолевого микроокружения, обусловленном необходимостью создания высокой локальной концентрации рассматриваемых белков [Fortuna-Costa A. et al., 2014; Cousin J. et al., 2016]. В то же время, в литературе имеются сведения о способности галектинов, циркулирующих в периферической крови, участвовать в дисрегуляции иммунных механизмов и прогрессии новообразования [Yu L.G., 2010; Zhao Q. et al., 2010; Chen C. et al., 2014; Shimura T. et al., 2016]. По мнению исследователей, это связано со способностью галектинов индуцировать кластеризацию специфических рецепторов на поверхности клеток, что и приводит к увеличению активности лектинов [Yu L.G., 2010]. Согласно результатам Q. Zhao et al. (2010), циркулирующий галектин-3 усиливает агрегацию опухолевых клеток и способствует их выживанию в кровотоке при метастатическом распространении [Zhao Q. et al., 2010]. Другими авторами показано взаимодействие циркулирующих галектинов 2-го, 4-го и 8-го типов с эндотелиоцитами, что стимулирует секрецию последними G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), IL-6 и MCP (monocyte chemoattractant protein) 1, и повышает адгезию циркулирующих опухолевых клеток к эндотелию сосудов [Chen C. et al., 2014].

1.5 Экспрессия галектинов типа 1 и 3 при опухолевых заболеваниях

Среди представителей семейства галектинов, в контексте опухолевой патологии наиболее хорошо изучены галектин-1 и галектин-3 [Bartolazzi A. et al., 2018; Girotti M. et al., 2020]. Галектин-1 локализуется преимущественно на поверхности опухолевых и неопухолевых клеток, в то время как для галектина-3 наиболее характерна внутриклеточная локализация с участием его в процессах сигнальной трансдукции, а также регуляции экспрессии генов и микро-РНК [Liu F. et al., 2005].

Дисбаланс экспрессии галектинов-1,3 характерен для опухолевых клеток и элементов опухоль-ассоциированной стромы, что коррелирует со степенью агрессивности опухоли и приобретением клетками метастатического фенотипа [Ebrahim A.H. et al., 2014]. Предполагается, что развитие подобного дисбаланса в процессе опухолевой трансформации и прогрессии может быть связано с характерными для опухолевого очага гипоксией и дефицитом нутриентов [Zhao X.Y. et al., 2010; Ikemori R.Y. et al., 2014], а также влиянием клеток опухолевого микроокружения [Yamamoto-Sugitani M. et al., 2011].

Согласно данным литературы, экспрессия галектина-1 и галектина-3 коррелирует с изменением клиничко-морфологических параметров и общей выживаемости пациентов со злокачественными новообразованиями [van den Brûle F. et al., 2003; Ebrahim A.H. et al., 2014]. Увеличение экспрессии галектина-1 в ткани опухолей легких, пищеварительного тракта, яичников ассоциируется с высокой агрессивностью и поздними стадиями опухолевого процесса, а также неблагоприятным прогнозом выживаемости пациентов [Sanjuán X. et al., 1997; Endo K. et al., 2005].

В то же время, данные литературы, касающиеся прогностической значимости галектина-3 при опухолевых заболеваниях, остаются противоречивыми. Одни авторы указывают на наличие положительной корреляционной взаимосвязи экспрессии опухолевыми клетками галектина-3 со стадией заболевания и наличием метастазов (регионарных и отдаленных) [Hittelet A. et al., 2003; Endo K. et al., 2005].

Другие авторы констатируют, напротив, снижение экспрессии галектина-3 на поздних стадиях опухолевой прогрессии [Tsuboi K. et al., 2007]. Одной из причин данного противоречия может быть различие во внутриклеточной локализации галектина-3. По мнению S. Califice et al. (2004), влияние галектина-3 на пролиферативную активность, инвазивный и метастатический потенциал опухолевых клеток, а также устойчивость к апоптозу, обусловлено его преимущественной экспрессией в определенном клеточном компартменте – ядре или цитоплазме [Califice S. et al., 2004]. В подтверждение этому, X. Sanjuán et al. (1997) показали, что процесс опухолевой трансформации кишечного эпителия *ex vivo* сопровождался снижением ядерной экспрессии галектина-3 при увеличении его уровня в цитоплазме клеток опухоли [Sanjuán X. et al., 1997].

Ассоциация экспрессии опухолевыми клетками галектинов-1,3 с клиническим течением злокачественных новообразований и их исходом указывает на значимую роль данных белков в процессах канцерогенеза и опухолевой прогрессии. Многочисленные данные исследований, проведенных *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют об участии галектинов в основных этапах опухолевого процесса. Так, галектин-1 и галектин-3 стимулируют приобретение и закрепление клетками опухолевого фенотипа, а также экспансию опухолевого клона путем кооперативного взаимодействия с белками-онкогенами семейства Ras, играющими ключевую роль в злокачественной трансформации эпителиальных опухолей [Paz A. et al., 2001; Elad-Sfadia G. et al., 2004; Blaževič O. et al., 2016].

Еще одной функцией данных лектинов является регуляция апоптоза. Галектин-3 в зависимости от внутриклеточной локализации может как подавлять, так и индуцировать апоптотическую гибель клеток. При локализации галектина-3 в цитоплазме клетки он проявляет антиапоптотические свойства [Liu F. et al., 2005], в случае расположения галектина-3 внутри ядра, наблюдается, напротив, снижение устойчивости опухолевых клеток к апоптозу, подавление их пролиферативной и миграционной активности [Califice S. et al., 2004].

Помимо влияния галектинов на рост и развитие первичной опухоли, они оказывают также значительное влияние на процессы опухолевой прогрессии –

инвазию и метастазирование. В исследованиях *in vitro* было показано, что к основным механизмам, опосредующим проинвазивное и прометастатическое влияние галектинов, относятся: а) модуляция адгезионных свойств опухолевых клеток в процессе их метастатического распространения и колонизации метастатических ниш; б) стимуляция продукции клетками опухолевого микроокружения цитокинов, обладающих прометастатическим эффектом; в) регуляция активности матриксных металлопротеиназ (matrix metalloproteinases – MMPs), играющих ведущую роль в деградации внеклеточного матрикса [Cousin J. et al., 2016].

В литературе описан ещё один механизм проопухолевого действия галектинов, связанный с регуляцией неоангиогенеза – процесса образования в опухоли разветвленной сосудистой сети. Увеличение экспрессии галектина-1 и галектина-3 эндотелиоцитами опухоль-ассоциированных кровеносных сосудов регистрируется при многих злокачественных новообразованиях [Thijssen V. et al., 2008; Cousin J. et al., 2016]. Эффект галектинов может быть опосредован действием сосудисто-эндотелиального ростового фактора (vascular-endothelial growth factor – VEGF) и фактора роста фибробластов (fibroblast-growth factor – FGF) – ключевых факторов неоангиогенеза. Показано, что галектин-1, секретируемый опухолевыми клетками, стимулирует *in vivo* пролиферативную и миграционную способность эндотелиальных клеток, индуцируя кластеризацию рецепторов к VEGF (vascular-endothelial growth factor receptor – VEGFR) на их мембране [Thijssen V. et al., 2010; Croci D.O. et al., 2014]. В свою очередь, галектин-3 в кооперации с интегрином $\alpha 5\beta 3$ способен модулировать ангиогенную активность VEGF и FGF путем индукции внутриклеточных сигнальных путей, ассоциированных с данными факторами [Markowska A. et al., 2010], а также путем образования кластеров VEGFR-2 на поверхности эндотелиальных клеток, усиливая проведение внутриклеточного сигнала от данного рецептора [Markowska A. et al., 2011].

Таким образом, галектин-1 и галектин-3 реализуют свои эффекты практически на всех этапах развития и прогрессии опухоли, включая механизмы злокачественной трансформации инициированных клеток, опухолевый

неоангиогенез, инвазию и метастазирование. Сведения литературы, касающиеся участия галектинов-1,3 в регуляции противоопухолевого иммунного ответа, указывают на перспективность использования рассматриваемых лектинов в иммунотерапии рака. Однако детальные эффекты галектинов 1-го и 3-го типов в механизмах адаптивного иммунитета при опухолевых заболеваниях остаются до конца неизученными, что обосновывает дальнейшее и более углубленное изучение данного вопроса.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Клиническая характеристика обследованных пациентов

Исследование было выполнено в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии (заведующий кафедрой – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН О.И. Уразова) и Центральной научно-исследовательской лаборатории (руководитель – д-р мед. наук, профессор Е.В. Удут) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

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

Исследование выполнено с разрешения локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ №5669 от 27.11.2017 г.

У всех обследованных лиц было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Диагноз рака толстого кишечника устанавливали на основании клинико-анамнестических данных, а также результатов инструментальных методов исследования (морфологического, рентгенологического и эндоскопического).

Исследование морфологии новообразования и отнесение его к определенному гистологическому типу было выполнено в патологоанатомическом отделении ОГАУЗ «ТООД» с привлечением врачей-патологоанатомов – д-ров мед. наук И.Л. Пурлика и Г.Г. Шимончук.

Для описания анатомического распространения опухолевого поражения при раке толстого кишечника использовали международную классификацию по системе TNM (7 Edition AJCC, 2009 г.). Распространение первичной опухоли (T) соответствовало T1, T2 у 20 (24,7 %) пациентов, T3, T4 – у 61 (75,3 %) пациента.

Регионарные метастазы (N1, N2) были диагностированы у 29 (35,8 %) пациентов, отдаленные (M1) – у 12 (14,8 %) человек.

Подразделение злокачественных новообразований толстого кишечника на гистологические типы выполняли в соответствии с «Международной гистологической классификацией» (ВОЗ, 2010), по степени дифференцированности опухолевых клеток – согласно «Клинических рекомендаций 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 (25,9 %) пациента с колоректальным раком была диагностирована аденокарцинома высокой и умеренной степени дифференцированности, у 60 (74 %) больных – аденокарцинома низкой степени дифференцированности.

Взятие материала для исследования у всех пациентов осуществляли до проведения лучевой и лекарственной терапии.

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

Иммуногистохимическое исследование экспрессии опухолевыми клетками галектина-1 и галектина-3 было выполнено на гистологических препаратах опухолевой ткани толстого кишечника больных колоректальным раком (55 образцов) и пациентов с аденомой толстого кишечника (49 образцов). Для изучения концентрации галектина-1 и галектина-3 в периферической крови, а также оценки субпопуляционного состава Т-лимфоцитов крови и цитокинсекреторной активности клеток в основную группу исследования вошли 26 больных раком

толстого кишечника (14 мужчин и 12 женщин, средний возраст $62,9 \pm 6,7$ года). Группу контроля составили 17 здоровых доноров (группа здоровья II-IIIa) – 11 мужчин и 6 женщин (средний возраст $58,2 \pm 3,1$ лет). Оценку клинико-морфологических характеристик опухоли (степень дифференцированности и наличие метастазов) во взаимосвязи с экспрессией галектина-1 и галектина-3 (в опухолевой ткани и периферической крови) у больных раком толстого кишечника проводили на общей выборке пациентов (81 человек, 36 мужчин и 45 женщин, средний возраст $62,3 \pm 5,3$ лет) (Таблица 1).

Таблица 1 - Распределение обследованных лиц в соответствии с использованными методами исследования

Методы исследования	Группы обследованных лиц		
	Здоровые доноры	Пациенты с раком толстого кишечника	Пациенты с аденомами толстого кишечника
Оценка экспрессии галектинов 1 и 3 в опухолевой ткани методом иммуногистохимии	-	55	49
Определение концентрации галектинов 1 и 3 в плазме периферической крови и цитокинов (IFN γ , IL-17A и TGF β 1) в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови методом иммуноферментного анализа	17	26	-
Имунофенотипирование CD4 ⁺ Т-лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии	14	20	-
Оценка клинико-морфологических показателей опухоли (распространение первичной опухоли, степень дифференцированности, наличие метастазов)	-	81	-

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

2.2 Материал исследования

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

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

Материалом исследования также была цельная кровь и супернатанты культуральной суспензии мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови пациентов с раком толстого кишечника и здоровых доноров. Взятие крови проводили утром натощак из локтевой вены в количестве 8 мл, кровь стабилизировали ЭДТА.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Оценка экспрессии галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани толстого кишечника

Исследование экспрессии галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани выполняли на парафиновых срезах методом иммуногистохимии согласно стандартной методике [Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2004] с применением автоматического иммуногистостейнера «Bond-maX» («Leica Biosystems», Германия).

Принцип метода. В основе метода лежит реакция «антиген – антитело», позволяющая обнаружить антиген при его соединении с антителом. Для визуализации экспрессии исследуемого белка образец подвергают первоначальной обработке фиксатором – формалином, который образует метиленовые мостики между аминоклассами белков. Этап демаскирования, позволяющий открыть эпитопы антигена для связывания с антителом, проводят путем термического воздействия или обработки образца раствором кислот и щелочей, в буферах с кальциевыми хелаторами и органических растворителях. Добавление немаркированных первичных антител, связывающихся с определяемым антигеном, а также вторичных антител, меченых флуорохромами, с последующим внесением фермента и буферных растворов для его активации опосредуют накопление окрашенного продукта реакции.

Ход работы. Оценку экспрессии галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани толстого кишечника осуществляли в «горячих точках», соответствующих участкам максимальной экспрессии белка. При анализе экспрессии галектина-1 и галектина-3 определяли относительное количество положительно окрашенных опухолевых клеток (выражали в %), 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).

2.3.2 Иммунофенотипирование лимфоцитов крови

Иммунофенотипирование лимфоцитов крови проводили методом проточной многоцветной цитофлуориметрии. При подготовке образцов цельной крови к исследованию эритроциты предварительно удаляли с использованием лизирующего буфера.

Принцип метода. Клеточная суспензия, предварительно обработанная моноклональными антителами, конъюгированными с флуоресцентными метками, внутри проточного цитометра впрыскивается в поток жидкости под давлением. Согласно принципу гидродинамического фокусирования создаются условия ламинарного потока без перемешивания суспензии клеток с обтекающей их жидкостью. При прохождении клеток через проточную ячейку свет, излучаемый лазером, взаимодействует с флуорохромом и вызывает излучение параллельных волн света с одинаковой длиной волны, фазой и поляризацией. Детекция флуоресцентных сигналов включает фиксацию интенсивности рассеяния света (прямого и бокового) и интенсивности флуоресценции. Интенсивность прямого светорассеяния (FSC – forward scatter) пропорциональна размеру клетки, а бокового (SSC – side scatter) – оптической плотности цитоплазмы клетки, характеру включений и гранулярности. Интенсивность флуоресценции обусловлена излучением молекул флуорохрома и аутофлуоресценции собственных молекул клетки.

Ход работы. Удаление эритроцитов из образцов цельной крови осуществляли путем осмотического лизиса клеток в гипотонической среде согласно инструкции фирмы-производителя лизирующего раствора «FACS Lysing solution» («BD Biosciences», США).

В полученной после лизиса эритроцитов суспензии клеток определяли относительное содержание Th1 ($CD4^+T\text{-bet}^+$), Th17 ($CD4^+RORC2^+$) и Treg-лимфоцитов ($CD4^+Foxp3^+$) методом проточной лазерной цитофлуориметрии, принимая за 100 % общую популяцию лимфоцитов, определенную по уровню прямого и бокового рассеивания. Для идентификации субпопуляций лимфоцитов

использовали моноклональные антитела, меченные флуоресцентными метками: к CD4 (PerCP-Cy5.5), T-bet (Alexa Fluor 488), RORC2 (APC) и Foxp3 (PE) («BD Biosciences», США; «RnD Systems», США). Для фиксации и пермеабиллизации клеток с целью внутриядерного окрашивания применяли набор буферов «Human Foxp3 Buffer Set» (фиксирующий и пермеабиллизирующий) согласно протоколу, прилагаемому фирмой-производителем «BD Biosciences» (США). К 100 мкл полученной клеточной суспензии добавляли специфические моноклональные антитела к CD4 в объеме 5 мкл с последующей инкубацией проб в течение 20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. После этого клетки отмывали 1 раз в 2 мл окрашивающего буфера «Stain Buffer» («BD Biosciences», США), центрифугируя 10 мин при 250 g. Для фиксации клеток осадок ресуспендировали в остатке буфера и добавляли 2 мл фиксирующего буфера, после чего пробы центрифугировали 5 мин при 500 g, и отмывали клетки в 2 мл буфера «Stain Buffer» при тех же условиях. Для пермеабиллизации клеток в пробы вносили 0,5 мл пермеабиллизирующего буфера с последующей инкубацией в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. После повторной отмывки клеток в 2 мл буфера «Stain Buffer» в течение 5 мин при 500 g в пробы добавляли специфические моноклональные антитела к T-bet (5 мкл), RORC2 (10 мкл) и Foxp3 (20 мкл), инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Затем отмывали клетки 2 раза в 2 мл буфера «Stain Buffer», центрифугируя при 500 g 5 мин, и к полученному осадку добавляли 300 мкл буфера «Stain Buffer». Измерение проб выполняли на проточном цитометре «Accuri C6» («BD Biosciences», США), снабженном аргоновым лазером ($\lambda=488$ нм) и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения «BD CellQuestforMac OS® X» («BD Biosciences», США).

Образцы клеточных суспензий анализировали по шести параметрам: прямому светорассеянию (FSC), боковому светорассеянию (SSC) и четырем показателям флуоресценции, соответствующим следующим флуорохромам: Alexa Fluor 488 – 530 нм, PE – 585 нм, PerCP-Cy5.5 – 670 нм и APC – 675 нм, выявляемых на FL1-

FL4 каналах. Результаты выражали в процентах от общего числа лимфоцитов. Квадранты гейтирования устанавливали по данным неокрашенного, одиночно-окрашенных и FMO (fluorescence minus one) контролей.

2.3.3 Выделение и культивирование моноклеарных лейкоцитов периферической крови

Выделение моноклеарных лейкоцитов из периферической крови осуществляется методом градиентного центрифугирования [Boyum A., 1968].

Принцип метода. Осаждение моноклеарных лейкоцитов происходит в соответствии с их плотностью в определенном градиенте. В работе был использован градиент плотности Ficoll-Paque ($\rho=1,077$ г/мл) (ООО «Биолот», Санкт-Петербург, Россия).

Ход работы. Венозную кровь наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque ($\rho=1,077$ г/мл) в соотношении 1:2 и центрифугировали при 300 g в течение 20 мин [Гольдберг Е.Д. и др., 1992]. Плазму отбирали, а образовавшееся интерфазное кольцо моноклеарных клеток забирали пипеткой, дважды отмывали средой RPMI-1640 (ЗАО «Вектор», Россия), последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 300 g. Количество клеток в суспензии стандартизировали до 1×10^6 /мл.

Культивирование моноклеарных лейкоцитов проводили в полной питательной среде RPMI-1640 в CO₂-инкубаторе в газовой смеси, содержащей 5 % углекислого газа при температуре 37 °С в течение 48 ч. После инкубации пробирки центрифугировали 10 мин при 500 g. Супернатанты культуральной суспензии моноклеарных лейкоцитов отбирали в эппендорфы и хранили при температуре -80 °С. В дальнейшем супернатанты использовали для количественного определения цитокинов.

2.3.4 Определение содержания галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической крови

Для исследования содержания галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической крови применяли метод твердофазного иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа.

Принцип метода заключается в связывании одного из эпитопов анализируемого антигена с моноклональными антителами, иммобилизованными на твердой фазе микропланшета, с образованием комплекса «антиген – антитело». Последующее внесение детектирующих биотинилированных моноклональных антител, распознающих другой эпитоп антигена, обуславливает формирование тройного комплекса «антитело – антиген – антитело» – «сэндвича». Визуализация комплекса осуществляется в следствие добавления субстрата фермента, определяющего цветную реакцию, интенсивность которой пропорциональна концентрации исследуемого цитокина в анализируемом образце. Калибровочная кривая строится с использованием среды, которая не содержит цитокина, а также стандартных растворов исследуемых веществ с известной концентрацией. После измерения оптической плотности в анализируемой пробе по калибровочному графику проводится расчет концентрации исследуемого вещества.

Ход работы. Процедуру выполнения иммуноферментного анализа проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя «BosterBio» (США) с использованием наборов реагентов «Human Galectin-1 PicoKine ELISA Kit» и «Human Galectin-3/LGALS3 PicoKine ELISA Kit». Для оценки содержания галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической крови в соответствующие лунки планшета добавляли стандартный раствор, контроль и образец 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 соответственно. 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. 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 «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия). Концентрацию галектина-1 и галектина-3 определяли по калибровочной кривой, результат выражали в нг/мл.

2.3.5 Определение содержания цитокинов в супернатантах суспензионной культуры мононуклеарных лейкоцитов крови

Измерение концентрации цитокинов IFN γ , IL-17A и TGF β 1 в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа. Принцип метода описан в п. 2.3.4.

Ход работы. Определение концентраций IFN γ проводили в соответствии с инструкцией производителя коммерческого набора «Гамма-IFN-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). Для этого во все лунки планшета вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов. Далее в соответствующие лунки добавляли по 100 мкл каждого образца (калибровочного, контрольного и анализируемого) и инкубировали в течение 120 мин, встряхивая на шейкере при температуре 37 °C и 700 об/мин. По окончании инкубации планшет промывали пятикратно, после чего во все лунки вносили по 100 мкл биотинилированных поликлональных антител к IFN γ с последующей инкубацией в течение 60 мин при тех же условиях. После окончания второй инкубации и пятикратной промывки в лунки вносили раствор стрептавидин-пероксидазы хрена с повторной инкубацией в течение 30 мин. Вновь пятикратно промывали планшет, добавляли в лунки по 100 мкл раствора «Тетраметилбензидина плюс» (АО «Вектор-Бест», Россия) и инкубировали в

течение 25 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации в лунки вносили по 100 мкл стоп-реагента. Оптическую плотность содержимого ячеек планшета регистрировали на фотометре-анализаторе «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Измерение концентрации TGF β 1 в надосадке культуральной суспензии мононуклеарных лейкоцитов крови выполняли согласно протоколу коммерческого набора «DRG® TGF β 1 ELISA» («DRG International, Inc.», США). Предварительно разведенные растворы стандартов, контролей и анализируемых образцов вносили в соответствующие лунки планшета в объеме 100 мкл и инкубировали в течение 180 мин. На всех этапах анализа инкубация проводилась в условиях комнатной температуры, отмывка лунок планшета осуществлялась троекратно с использованием 300 мкл промывочного буфера. После отмывки в лунки вносили по 100 мкл раствора моноклональных анти-TGF β 1-антител с последующей инкубацией в течение 120 мин и отмывкой. Затем в пробы добавляли по 100 мкл раствора IgG, конъюгированных с биотином, и инкубировали 45 мин. Повторно промывали планшет и вносили раствор стрептавидин-пероксидазы в объеме 100 мкл. Инкубировали в течение 45 мин, промывали и добавляли 100 мкл раствора тетраметилбензидина. После повторной 15-минутной инкубации вносили 50 мкл стоп-реагента. Оптическую плотность содержимого ячеек планшета измеряли при длине волны 450 нм с применением фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия). Концентрацию IFN γ и TGF β 1 определяли по калибровочной кривой, результат выражали в нг/мл.

Определение содержания IL-17A в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови проводили в соответствии с инструкцией коммерческого набора «Human IL-17 PicoKine ELISA Kit» (BosterBio, США). Ход метода соответствует такому при измерении концентрации галектина-1 и галектина-3 в плазме крови, описан в п. 2.3.4.

2.3.6 Статистический анализ результатов

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences, США) и программы «Microsoft Excel» корпорации «Microsoft». Соответствия выборочных данных нормальному распределению проверяли с использованием теста Шапиро-Уилка. Так как количественные параметры в группах исследования не подчинялись закону нормального распределения, в качестве средневыборочных характеристик использовали медиану (Me) и 25-ый и 75-ый процентиля (1-ый и 3-ий квартили: Q1 и Q3). Для оценки статистической достоверности различия количественных показателей между исследуемыми выборками использовали непараметрический критерий Манна-Уитни с введением поправки Бенджамини-Хохберга. Для выявления взаимосвязей между двумя количественными показателями вычисляли ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Тесноту связи определяли по абсолютной величине коэффициента корреляции r (по шкале Чеддока): очень высокая (или очень сильная) при $r > 0,9$; высокая (или сильная) при $0,7 < r < 0,9$; заметная при $0,5 < r < 0,7$; умеренная при $0,3 < r < 0,5$; слабая при $r < 0,3$; при $r = 0$ – связи нет, при $r = 1$ – связь полная (функциональная). С целью прогнозирования вероятности бинарного события по значениям одного или нескольких количественных признаков использовали логистическую регрессию. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

3.1 Экспрессия галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника

Известно, что галектин-1 и галектин-3 могут экспрессироваться как самими опухолевыми клетками, так и элементами опухолевого микроокружения [Méndez-Nuergo S.P. et al., 2017; Chou F.C. et al., 2018]. Галектин-1 локализуется преимущественно на мембране клеток, тогда как для галектина-3 наиболее характерно внутриклеточное расположение с вовлечением данного лектина в механизмы сигнальной трансдукции и регуляции экспрессии генов [Liu F.T. et al., 2005].

В нашем исследовании проводилась оценка экспрессии галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани методом иммуногистохимии (в % позитивных клеток) у больных колоректальным раком и пациентов с аденомами толстого кишечника. В результате исследования было зарегистрировано присутствие галектина-1 и галектина-3 на мембране и в цитоплазме опухолевых клеток во всех исследуемых образцах новообразований толстого кишечника (Рисунки 2, 3).

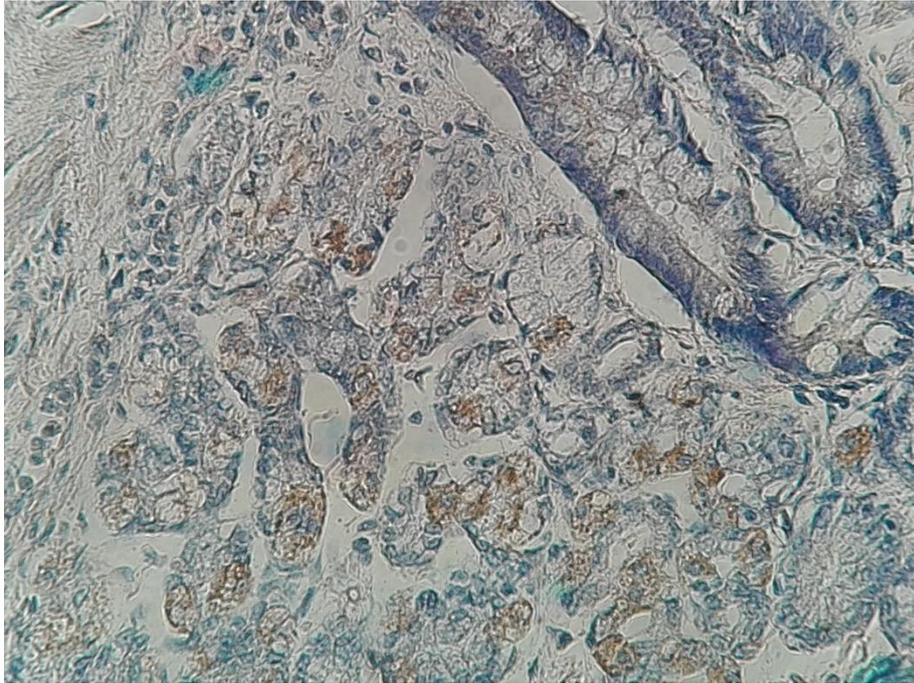


Рисунок 2 – Рак толстого кишечника. Иммуногистохимическая реакция выявления галектина-1 на мембране и в цитоплазме опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200

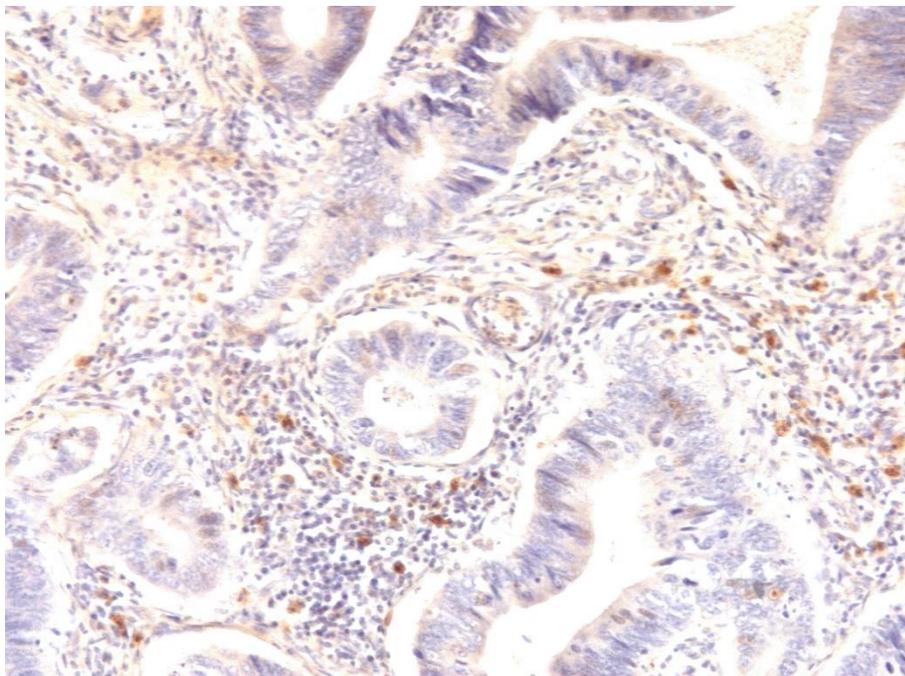


Рисунок 3 – Рак толстого кишечника. Иммуногистохимическая реакция выявления галектина-3 на мембране и в цитоплазме опухолевых клеток. Докрашено гематоксилином. Ув. 200

При этом относительное содержание злокачественно трансформированных опухолевых клеток, экспрессирующих галектин-1, у больных раком толстого кишечника оказалось равным 23 (11-41) %, что в среднем в 2,1 раза ($p=0,001$) превышало соответствующий параметр у пациентов с доброкачественными опухолями толстого кишечника (относительное количество галектин-1-позитивных опухолевых клеток было равным 11 (8-19) %) (Рисунок 4).

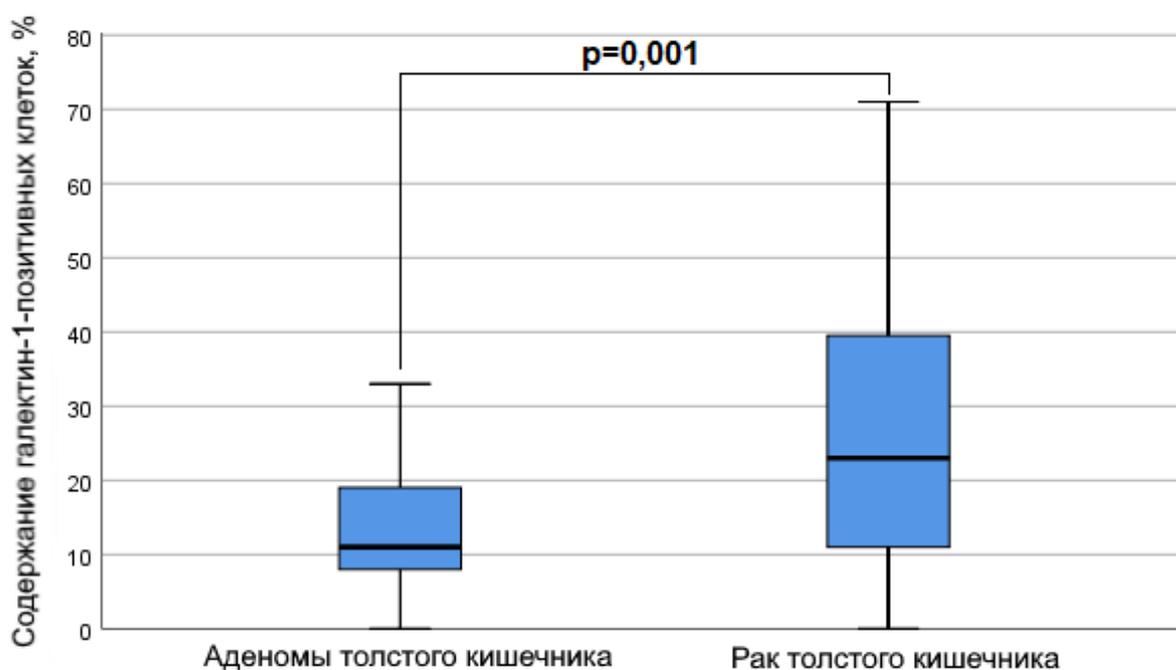


Рисунок 4 – Относительное содержание галектин-1-позитивных опухолевых клеток (%) у больных раком толстого кишечника

Аналогичная закономерность была выявлена при сравнительном анализе внутриопухолевой экспрессии галектина-3 у больных колоректальным раком и аденомами толстого кишечника. Относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих галектин-3, в злокачественных новообразованиях толстого кишечника равнялось 18 (12-24) %, что значительно ($p=0,034$) превышало таковое (14 (8-17) %) в опухолевой ткани у пациентов с аденомами толстого кишечника (Рисунок 5).

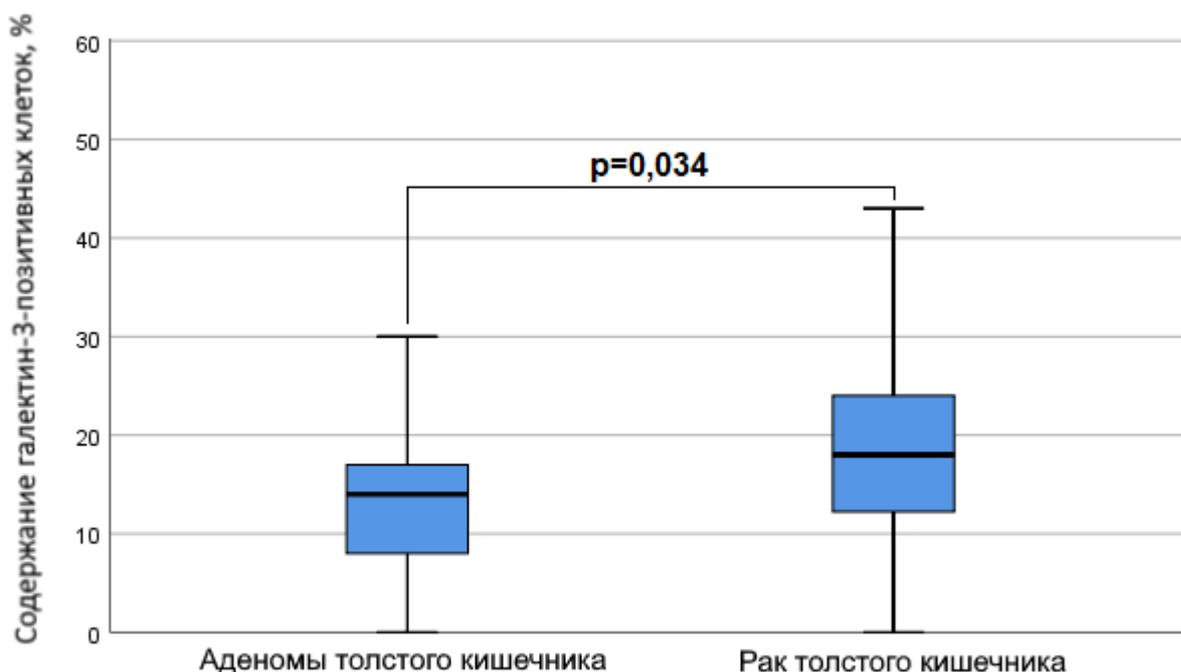


Рисунок 5 – Относительное содержание галектин-3-позитивных опухолевых клеток (%) у больных раком толстого кишечника

3.2 Содержание галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической крови у больных раком толстого кишечника

Несмотря на то, что галектины проявляют во многом свойства цитозольных белков, их можно идентифицировать не только внутри или на поверхности клетки, но и во внеклеточном пространстве. Злокачественные новообразования различной локализации характеризуются дисбалансом экспрессии как внутриопухолевых, так и циркулирующих в крови галектинов [Thijssen V. et al., 2015; Labrie M. et al., 2017].

По результатам проведенного иммуноферментного анализа, у больных раком толстого кишечника обнаруживалось статистически значимое увеличение концентрации галектина-1 до 13,74 (12,23-14,79) нг/мл ($p=0,003$) в плазме крови по сравнению со значениями соответствующего показателя у здоровых доноров (плазменный уровень галектина-1 составил 6,17 (15,31-17,10) нг/мл (Рисунок 6). При этом у больных раком толстого кишечника обнаруживалась заметная связь

(коэффициент корреляции $r=0,59$; $p=0,002$) между повышением концентрации галектина-1 в плазме крови и относительным содержанием галектин-1-экспрессирующих клеток в опухолевой ткани.

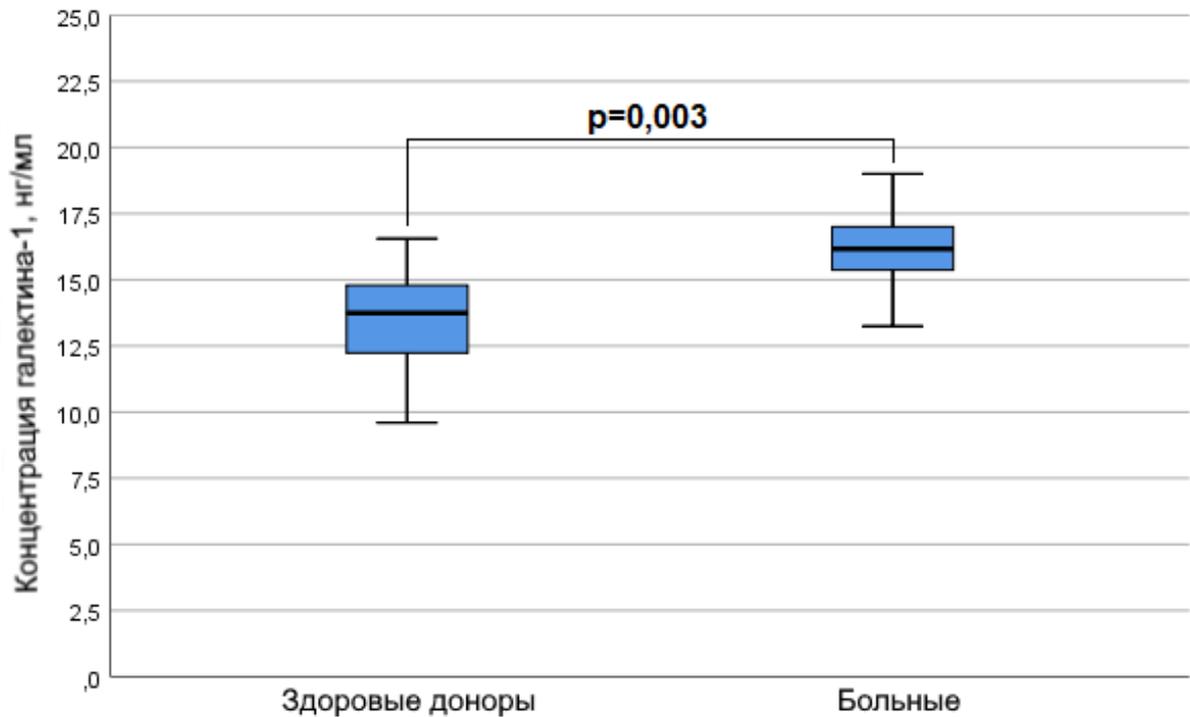


Рисунок 6 – Концентрация галектина-1 в плазме периферической крови (нг/мл) у больных раком толстого кишечника

При исследовании содержания галектина-3 в периферической крови у больных колоректальным раком и здоровых доноров также были выявлены статистически значимые различия. У пациентов с раком толстого кишечника данный параметр оказался равным 3,28 (2,30-5,71) нг/мл, что в 2,1 раза ($p=0,006$) превышало величину аналогичного показателя в группе здоровых доноров (1,56 (1,19-2,17) нг/мл) (Рисунок 7).

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

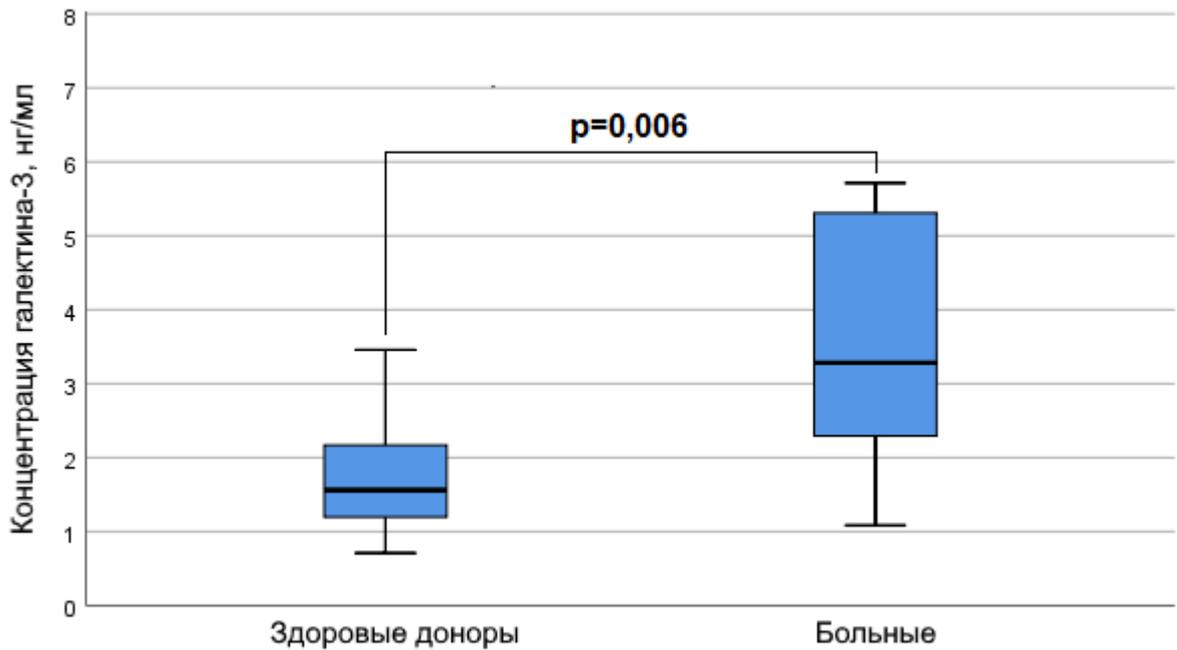


Рисунок 7 – Концентрация галектина-3 в плазме периферической крови (нг/мл) у больных раком толстого кишечника

3.3 Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов крови у больных раком толстого кишечника

Эффективность противоопухолевого иммунного ответа зависит от баланса отдельных субпопуляций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с регуляторной активностью. В настоящем исследовании у больных раком толстого кишечника и здоровых доноров иммунофенотипирование Т-лимфоцитов периферической крови проводилось методом проточной цитометрии с определением экспрессии маркерных внутриядерных транскрипционных факторов $CD4^+$ Т-лимфоцитов: Tbet для Th1-лимфоцитов, RORC2 для Th17-лимфоцитов и Foxp3 для T-регуляторных клеток (Treg).

Известно, что ключевую роль в механизмах противоопухолевой резистентности играют Th1-лимфоциты, способные стимулировать презентацию макрофагами опухоль-ассоциированных антигенов, активировать функции цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и инициировать элиминацию

злокачественных клеток [Kennedy R. et al., 2008; Ling A. et al., 2016].

По результатам проведенного исследования, у больных раком толстого кишечника выявлено статистически значимое снижение относительного содержания $CD4^+T\text{-bet}^+$ Th1-лимфоцитов (0,82 (0,24-0,94) %, $p=0,045$) по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (1,24 (0,48-2,43) %) (Рисунок 8).

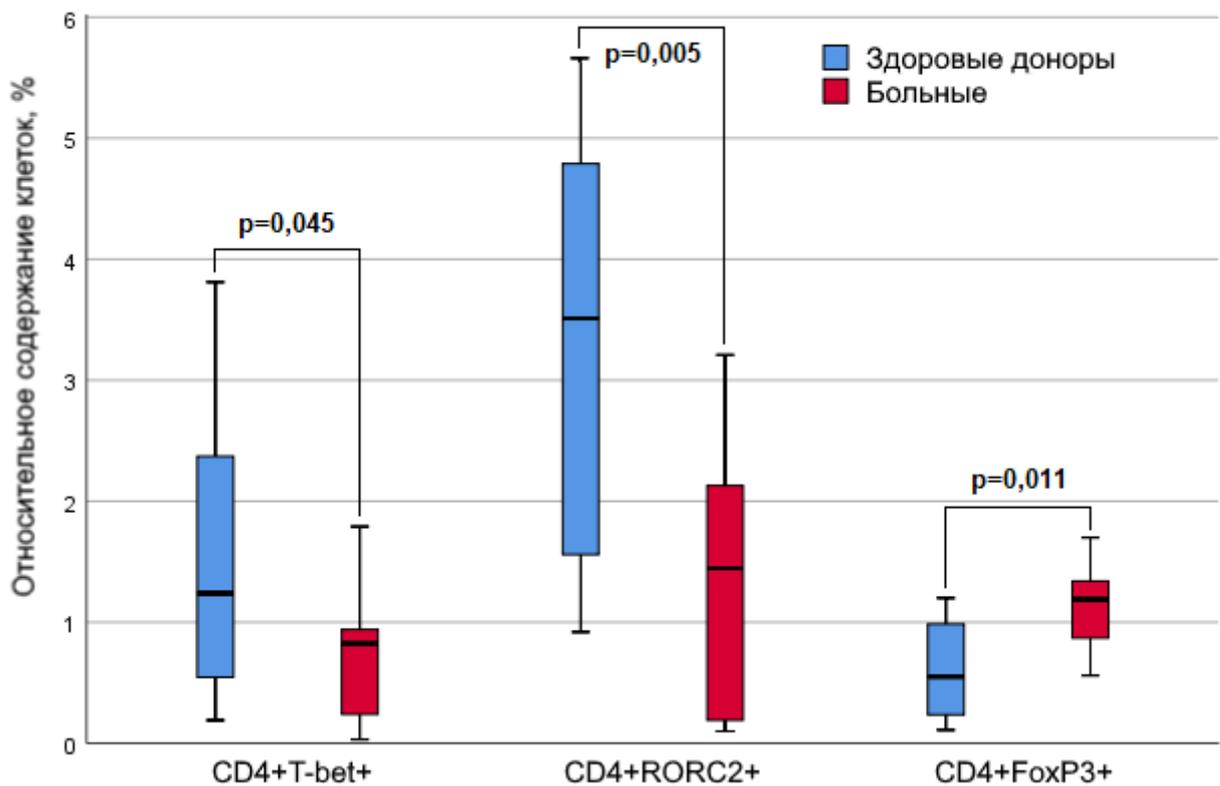


Рисунок 8 – Относительное содержание Th1-, Th17- и Treg-лимфоцитов в периферической крови (% от общего числа лимфоцитов) у больных раком толстого кишечника

При исследовании другой субпопуляции T-лимфоцитов-хелперов – Th17-лимфоцитов, способных в зависимости от цитокинового микроокружения изменять свой фенотип в направлении Th1-лимфоцитов или T-регуляторных клеток [Guery L. et al., 2015], у пациентов с аденокарциномой толстого кишечника было установлено уменьшение процентного содержания $CD4^+RORC2^+$ Th17-

лимфоцитов в периферической крови в среднем в 2,4 раза (1,44 (0,19-2,13), $p=0,005$) по сравнению с соответствующим параметром в группе здоровых доноров (3,51 (1,56-4,79) %) (Рисунок 8).

Среди $CD4^+$ Т-лимфоцитов выделяют также клетки, способные угнетать противоопухолевый иммунитет. Примером таких клеток являются Treg-лимфоциты, которые посредством мембранных молекул PD-1 и CTLA-4, а также секреции иммуносупрессорных цитокинов IL-10 и TGF β подавляют эффективность врожденного и адаптивного иммунного ответа. Известно, что Treg-лимфоциты делятся на естественные тимические с фенотипом $CD4^+Foxp3^+$ и индуцированные на периферии, которые могут не экспрессировать молекулу Foxp3 [Bonertz A. et al., 2009; Tosolini M. et al., 2011]. В нашем исследовании мы оценивали популяцию $CD4^+Foxp3^+$ Treg-лимфоцитов, поскольку именно Foxp3-позитивные T-регуляторные лимфоциты реализуют иммуносупрессорные функции.

По результатам проведенного исследования, у больных раком толстого кишечника относительное содержание $CD4^+Foxp3^+$ Treg-лимфоцитов в периферической крови оказалось равным 1,19 (0,8-1,48) %, что в среднем в 2,2 раза ($p=0,011$) превышало аналогичный показатель у здоровых доноров (процентное содержание $CD4^+Foxp3^+$ Treg-лимфоцитов составляло 0,55 (0,23-0,98) %) (Рисунок 8).

3.4 Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови у больных раком толстого кишечника

Для оценки функциональной активности $CD4^+$ Т-лимфоцитов нами была проведена оценка *in vitro* секреции ключевых цитокинов по результатам измерения концентрации IFN γ , секретируемого Th1-лимфоцитами, IL-17A – маркерного цитокина Th17-лимфоцитов и TGF β 1, источником которого являются Treg-клетки, в супернатантах культуральных суспензий лимфоцитов, выделенных из периферической крови больных раком толстого кишечника.

Исследование содержания $IFN\gamma$ (ключевого цитокина Th1-лимфоцитов) в *in vitro* культуре мононуклеарных лейкоцитов крови показало, что у больных раком толстого кишечника и здоровых доноров значения данного показателя были сопоставимыми (1,286 (0,100-3,571) пг/мл при колоректальном раке и 1,429 (0,100-2,857) пг/мл у здоровых лиц) (Рисунок 9).

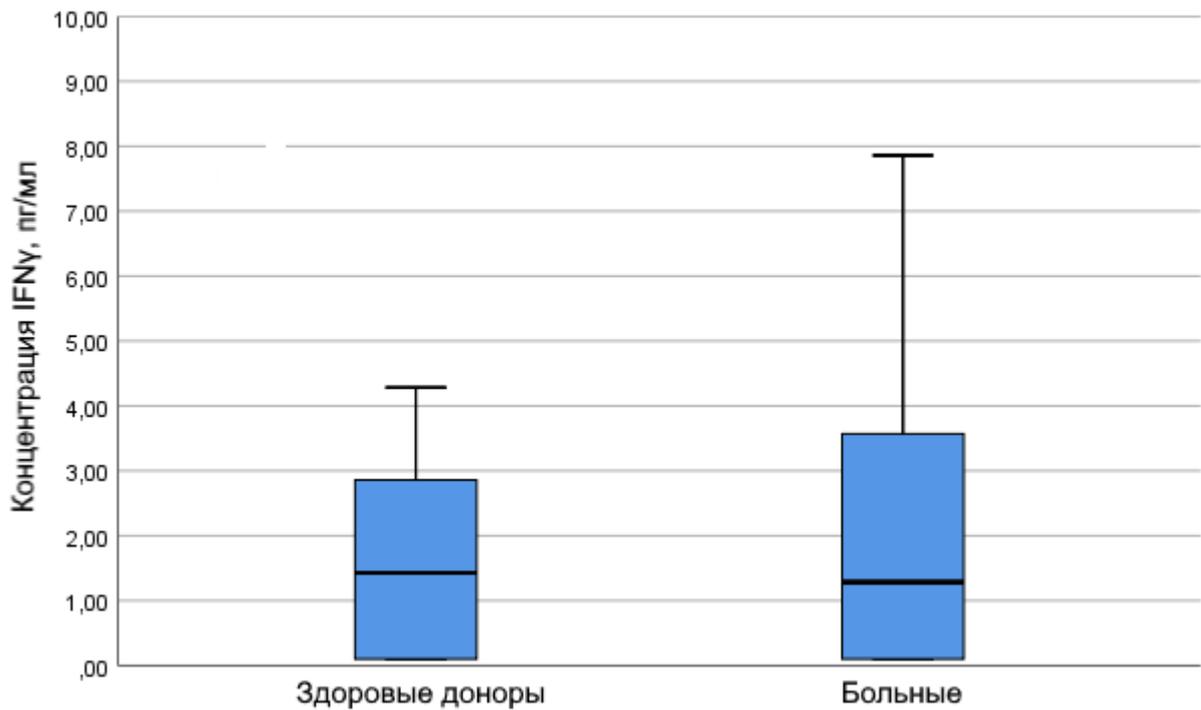


Рисунок 9 – Концентрация $IFN\gamma$ в *in vitro* культуре мононуклеарных лейкоцитов (пг/мл) у больных раком толстого кишечника

При анализе секреции IL-17A мононуклеарными лейкоцитами периферической крови *in vitro* у пациентов с раком толстого кишечника базальный ее уровень оказался равным 0,116 (0,100-0,425) пг/мл, что было в среднем существенно ниже (в 5,5 раза, $p=0,005$) таковой группе здоровых доноров ((0,657 (0,108-0,889) пг/мл) (Рисунок 10).

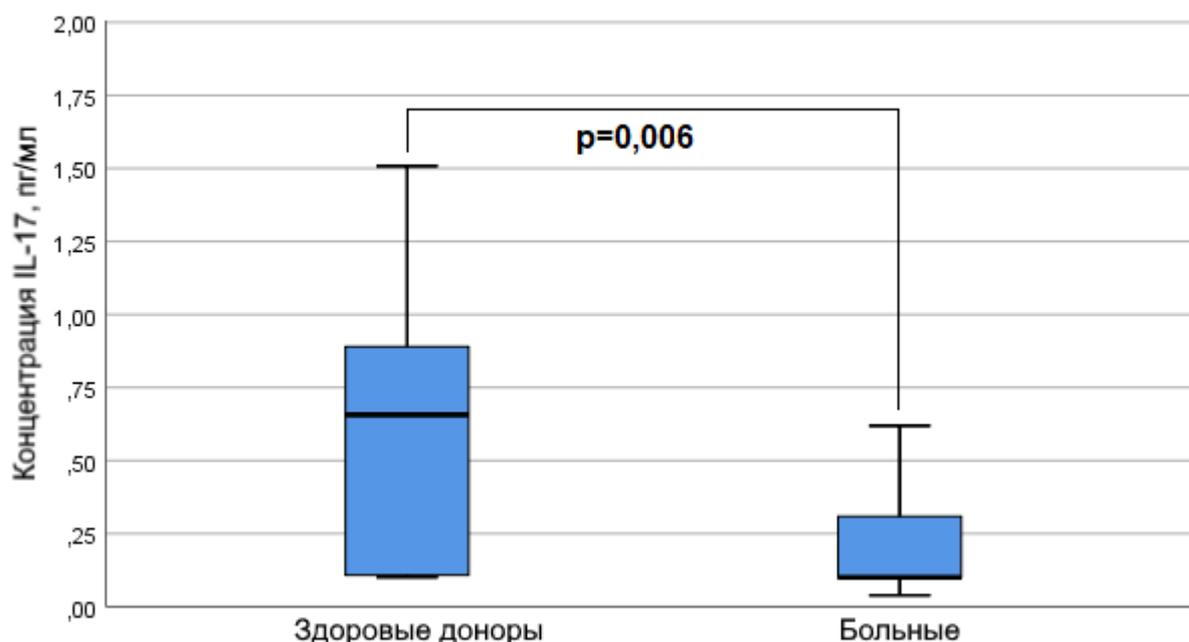


Рисунок 10 – Концентрация IL-17A в *in vitro* культуре мононуклеарных лейкоцитов (пг/мл) у больных раком толстого кишечника

Что касается TGF β 1, то у больных колоректальным раком регистрировалось, напротив, статистически значимое увеличение его секреции в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов (835,8 (534,3-1949,0) пг/мл, $p=0,048$) по сравнению с аналогичным параметром у здоровых доноров (628,6 (471,4-777,2) пг/мл) (Рисунок 11).

Таким образом, при раке толстого кишечника установлен структурно-функциональный дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов-хелперов, сопровождающийся снижением содержания Th1- и Th17-лимфоцитов крови и, напротив, увеличением числа Treg, что в сочетании с гиперсекрецией мононуклеарами крови TGF β 1 указывает на превалирование иммуносупрессорных реакций в реализации противоопухолевого иммунного ответа.

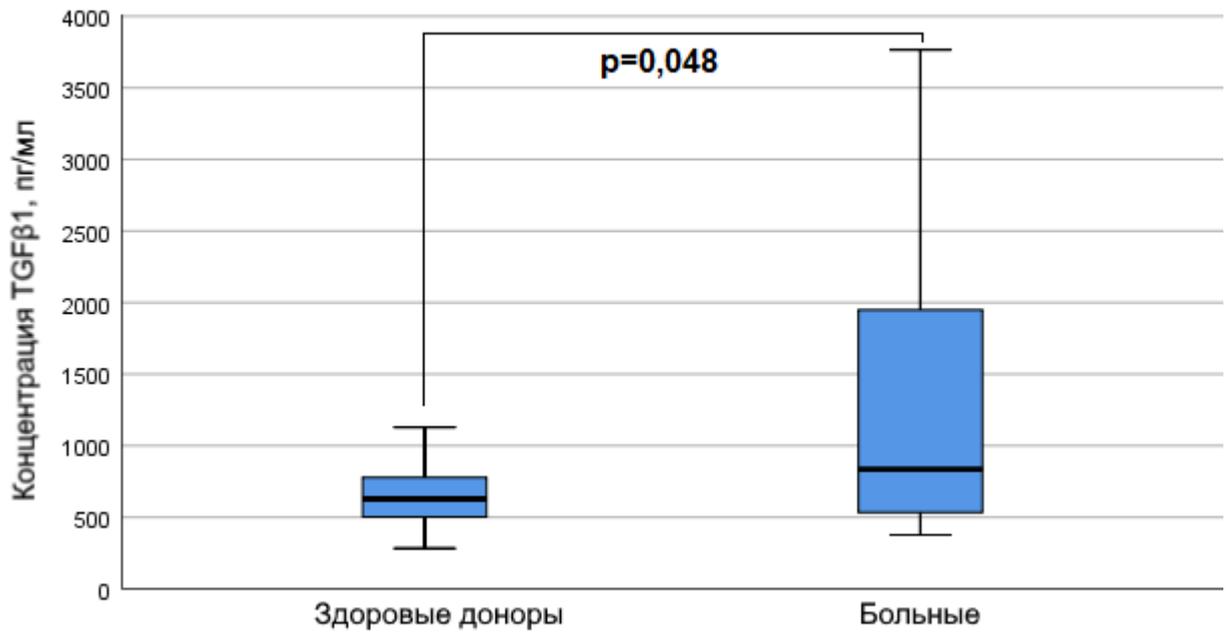


Рисунок 11 – Концентрация TGFβ1 в *in vitro* культуре мононуклеарных лейкоцитов (пг/мл) у больных раком толстого кишечника

3.5 Взаимосвязь содержания галектинов-1,3 в крови с особенностями субпопуляционного состава и цитокин-секреторной активности CD4⁺ Т-лимфоцитов у больных раком толстого кишечника

Опухоль-ассоциированная иммуносупрессия может быть обусловлена действием различных факторов, включая влияние самой опухоли, элементов ее микроокружения, а также регуляторных молекул, к которым относятся галектин-1 и галектин-3.

Для установления взаимосвязей между концентрацией галектина-1 и галектина-3, циркулирующих в периферической крови, и нарушениями субпопуляционного состава и функциональной активности CD4⁺ Т-лимфоцитов при раке толстого кишечника нами был проведен корреляционный анализ.

Согласно полученным данным, у больных раком толстого кишечника обнаружена заметная отрицательная корреляционная взаимосвязь между плазменной концентрацией галектина-1 и относительным содержанием CD4⁺T-bet⁺ Th1-лимфоцитов крови (Таблица 2). Наряду с этим, концентрация

циркулирующего в крови галектина-1 негативно коррелировала с количеством CD4⁺RORC2⁺ Th17-лимфоцитов и уровнем *in vitro* базальной секреции их маркерного цитокина IL-17A в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови (Таблица 2).

Таблица 2 – Взаимосвязь плазменной концентрации галектина-1 и показателей субпопуляционного состава и цитокин-секреторной активности регуляторных Т-лимфоцитов крови у больных раком толстого кишечника

Концентрация галектина в крови	Коэффициент ранговой корреляции Спирмена	CD4 ⁺ Т-лимфоциты и цитокины
Галектин-1 (нг/мл)	r=-0,56 (p=0,035)	CD4 ⁺ T-bet ⁺ Th1 (%)
	r=-0,59 (p=0,033)	CD4 ⁺ RORC2 ⁺ Th17 (%)
	r=0,55 (p=0,035)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg (%)
	r=-0,63 (p=0,001)	IL-17A (пг/мл)
	r=0,48 (p=0,020)	TGFβ1 (пг/мл)

Примечание: p – уровень статистической значимости различий.

В свою очередь, между концентрацией галектина-1 в плазме периферической крови и относительным содержанием CD4⁺Foxp3⁺Treg клеток была выявлена заметная положительная корреляционная зависимость (r=0,55, p=0,035). Положительная корреляция установлена также между плазменным уровнем галектина-1 и *in vitro* базальной секрецией TGFβ1 мононуклеарными лейкоцитами (Таблица 2).

Что касается галектина-3, то нами была установлена обратная корреляционная зависимость между его концентрацией в периферической крови и относительным числом CD4⁺T-bet⁺ Th1-лимфоцитов (Таблица 3). При этом плазменный уровень галектина-3 был положительно взаимосвязан с концентрацией TGFβ1 в супернатантах культуральной суспензии мононуклеарных лейкоцитов периферической крови (Таблица 3).

Таблица 3 – Взаимосвязь плазменной концентрации галектина-3 и показателей субпопуляционного состава и цитокин-секреторной активности регуляторных Т-лимфоцитов крови у больных раком толстого кишечника

Концентрация галектина в крови	Коэффициент ранговой корреляции Спирмена	CD4 ⁺ Т-лимфоциты и цитокины
Галектин-3 (нг/мл)	r=-0,81 (p=0,001)	CD4 ⁺ T-bet ⁺ Th1 (%)
	r=0,70 (p=0,001)	TGFβ1 (пг/мл)

Примечание: p – уровень статистической значимости различий.

Таким образом, у больных раком толстого кишечника высокий плазменный уровень галектина-1 и галектина-3 оказался взаимосвязанным с количественным дефицитом и угнетением секреторной активности Th1- и Th17-лимфоцитов, и, напротив, активацией секреторной функции иммуносупрессорных Treg-клеток.

3.6 Взаимосвязь экспрессии галектинов-1,3 и показателей дисрегуляции адаптивного иммунитета с клинико-морфологическими параметрами опухоли у больных раком толстого кишечника

При опухолевых заболеваниях нарушение механизмов адаптивного иммунного ответа обуславливает ускорение темпов роста и развития

новообразования, инвазию и метастазирование злокачественно трансформированных клеток.

В исследовании нами была проанализирована взаимосвязь нарушений структурно-функционального баланса регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов и содержания галектинов 1 и 3 в опухолевой ткани и периферической крови с клинико-морфологическими характеристиками опухоли у больных раком толстого кишечника. К основным клинико-морфологическим параметрам опухолевого процесса принято относить степень дифференцированности новообразования (критерий злокачественности), степень распространения первичной опухоли, а также наличие очагов метастазирования (критерии злокачественности и прогрессии опухоли).

По результатам гистологического исследования образцов опухолевой ткани у больных раком толстого кишечника в 74 % случаев (у 60 пациентов) была зарегистрирована аденокарцинома высокой и умеренной степени дифференцированности, в 25,9 % (у 21 пациента) установлена низкодифференцированная аденокарцинома.

У больных раком толстого кишечника с низкой степенью дифференцированности новообразования установлено статистически значимое увеличение экспрессии внутриопухолевого галектина-3 по сравнению с таковым у пациентов с высокодифференцированными опухолями толстого кишечника (Таблица 4). Сходная тенденция отмечалась при исследовании концентрации галектина-3 в плазме периферической крови. У пациентов с низкодифференцированной аденокарциномой толстого кишечника плазменная концентрация галектина-3 в среднем в 2,7 раза превышала аналогичный параметр у пациентов с высокодифференцированным колоректальным раком (Таблица 4). Сравнительное исследование содержания галектина-1 (внутри опухоли и в крови), количественного соотношения и показателей секреторной функции субпопуляций CD4⁺T-bet⁺, CD4⁺RORC2⁺ Т-лимфоцитов и CD4⁺Foxp3⁺ Treg-клеток у больных раком толстого кишечника в зависимости от степени дифференцированности опухоли не выявило статистически значимых различий.

Таблица 4 – Содержание галектина-1 и галектина-3 в плазме крови (нг/мл) и опухолевой ткани (% позитивных опухолевых клеток) у больных раком толстого кишечника в зависимости от степени дифференцированности опухоли, Me (Q₁-Q₃)

Содержание галектинов		Степень дифференцированности опухоли	
		Высокая и умеренная	Низкая
В опухоли (% опухолевых клеток)	Галектин-1	20,0 (8,0-41,0)	23,0 (15,0-38,0)
	Галектин-3	15,0 (7,0-22,0)	33,5 (17,5-57,5) p=0,038
В крови (нг/мл)	Галектин-1	15,58 (14,31-16,83)	17,01 (16,09-19,26)
	Галектин-3	2,69 (1,77-4,11)	7,22 (3,41-10,32) p=0,018

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у больных с высокой и умеренной степенью дифференцированности опухоли.

Еще одним клиничко-морфологическим параметром опухолевого процесса является степень распространения (инвазии) первичной опухоли, которую оценивают согласно международной TNM классификации (7 Edition AJCC, 2009 г.) В нашем исследовании у 20 (24,7%) пациентов опухоль прорастала слизистую и подслизистую оболочки (T1), а также мышечный слой толстого кишечника (T2). У 61 (75,3%) больного зарегистрировано распространение опухоли в субсерозный слой или перитонизированные участки ободочной кишки (T3), а также в висцеральную брюшину или соседние органы (T4).

По результатам сравнительного анализа особенностей субпопуляционного состава и цитокин-секреторной функции CD4⁺ Т-лимфоцитов крови в зависимости от распространения первичной опухоли было установлено статистически значимое снижение числа CD4⁺T-bet⁺ Th1-лимфоцитов и *in vitro* секреции IL-17A у больных раком толстого кишечника с более выраженной инвазией новообразования (T3, T4)

по сравнению с аналогичным показателем у пациентов с меньшей выраженностью инвазивного роста опухоли (T1, T2) (Таблица 5). Процентное содержание CD4⁺RORC2⁺ Th17-лимфоцитов и CD4⁺Foxp3⁺ Treg-клеток крови и секреция ими маркерных цитокинов у больных раком толстого кишечника не зависели от степени выраженности инфильтрирующего роста опухоли. Концентрация галектина-1 в плазме периферической крови и экспрессии галектина-1 в опухолевой ткани у больных колоректальным раком с высокой степенью распространения первичной опухоли (T3, T4) оказались достоверно выше, чем у пациентов с меньшей ее выраженностью (T1, T2) (Таблица 6).

Таблица 5 – Относительное содержание регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови (%) и концентрация цитокинов в супернатантах культуральной суспензии мононуклеарных лейкоцитов крови (нг/мл) у больных раком толстого кишечника в зависимости от распространения первичной опухоли, Me (Q₁-Q₃)

Показатели адаптивного иммунитета		Распространение первичной опухоли	
		T1, T2	T3, T4
Относительно содержание лимфоцитов (%)	Th1	0,93 (0,90-1,09)	0,39 (0,18-0,87) p=0,023
	Th17	1,72 (1,14-2,59)	0,85 (0,16-2,13)
	Treg	0,95 (0,67-1,27)	1,27 (0,98-1,70)
Концентрация цитокинов (пг/мл)	IFN γ	1,29 (0,10-2,94)	1,48 (0,10-3,57)
	IL-17A	0,39 (0,11-0,50)	0,10 (0,10-0,10) p=0,013
	TGF β 1	628,6 (502,9-953,0)	1305,0 (534,3-1949,0)

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у больных раком толстого кишечника T1, T2.

Таблица 6 – Содержание галектина-1 и галектина-3 в плазме крови (нг/мл) и опухолевой ткани (% позитивных опухолевых клеток) у больных раком толстого кишечника в зависимости от распространения первичной опухоли, Me (Q₁-Q₃)

Содержание галектинов		Распространение первичной опухоли	
		T1, T2	T3, T4
В опухоли (% опухолевых клеток)	Галектин-1	13,0 (9,0-19,0)	27,0 (15,0-45,0) p=0,032
	Галектин-3	16,0 (6,0-21,5)	17,0 (7,0-24,0)
В крови (нг/мл)	Галектин-1	14,83 (13,10-15,84)	16,68 (15,72-17,88) p=0,006
	Галектин-3	3,13 (1,24-4,90)	3,63 (2,35-7,86)

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у больных раком толстого кишечника T1, T2.

Экспрессия галектина-3 в опухолевой ткани и концентрация данного лектина в периферической крови у больных раком толстого кишечника не зависели от выраженности инфильтрирующего роста первичной опухоли и были сопоставимыми (Таблица 6).

Ключевым критерием злокачественности опухоли является также метастазирование – процесс формирования вторичных новых очагов опухолевого роста, удаленных от первичного опухолевого узла. При колоректальном раке метастазы в первую очередь регистрируются в регионарных лимфатических узлах (N1, N2). Очаги метастазирования в лимфоузлах, расположенных по ходу аорты и зоны наружных подвздошных сосудов, оценивают как отдаленные (M1).

Среди обследованных нами пациентов у 29 (35,8 %) человек были диагностированы регионарные метастазы, у 12 (14,8 %) – отдаленные. При этом у больных раком толстого кишечника, сопровождающимся появлением очагов

регионарного метастазирования, экспрессия галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани, а также концентрация галектина-1 в плазме периферической крови в 1,9, 2,2 и 1,1 раза соответственно превышали аналогичные параметры у пациентов с колоректальным раком без метастазов (Таблица 7).

Таблица 7 – Содержание галектина-1 и галектина-3 в плазме крови (нг/мл) и опухолевой ткани (% позитивных опухолевых клеток) у больных раком толстого кишечника в зависимости от наличия регионарных метастазов, Me (Q₁-Q₃)

Содержание галектинов		Регионарные метастазы	
		N0	N1, N2
В опухоли (% опухолевых клеток)	Галектин-1	20,0 (9,0-32,0)	38,0 (23,0-55,0) p=0,006
	Галектин-3	13,0 (5,0-20,0)	28,0 (17,0-43,0) p=0,001
В крови (нг/мл)	Галектин-1	14,90 (13,17-16,01)	16,59 (16,13-19,00) p=0,021
	Галектин-3	3,78 (2,26-7,61)	3,83 (2,42-9,91)

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с больными без регионарных метастазов (N0).

Сравнительный анализ содержания ключевых субпопуляций регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов, экспрессии галектинов-1,3 клетками опухоли и концентрации указанных лектинов в плазме периферической крови в зависимости от наличия отдаленных метастазов позволил установить статистически значимое увеличение только плазменной концентрации галектина-1 и относительного содержания CD4⁺Foxp3⁺ Treg-лимфоцитов в крови у больных колоректальным раком с отдаленными метастазами по сравнению с таковыми у пациентов без метастатического поражения (Таблицы 8, 9).

Таблица 8 – Относительное содержание регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови (%) и концентрация цитокинов в супернатантах культуральной суспензии мононуклеарных лейкоцитов крови (нг/мл) у больных раком толстого кишечника в зависимости от наличия отдаленных метастазов, Me (Q₁-Q₃)

Показатели адаптивного иммунитета		Отдаленные метастазы	
		M0	M1
Относительное содержание Т-лимфоцитов (%)	Th1	0,91 (0,24-1,12)	0,68 (0,28-0,89)
	Th17	1,72 (0,80-2,29)	1,22 (0,55-1,8)
	Treg	1,09 (0,70-1,34)	1,70 (1,27-2,46) p=0,037
Концентрация цитокинов (пг/мл)	IFN γ	1,43 (0,10-5,00)	1,43 (0,10-2,14)
	IL-17A	0,11 (0,10-0,39)	0,10 (0,10-0,10)
	TGF β 1	835,8 (534,3-2359,0)	1392,5 (919,0-1714,0)

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с больными без отдаленных метастазов (M0).

Таблица 9 – Содержание галектина-1 и галектина-3 в плазме крови (нг/мл) и опухолевой ткани (% позитивных опухолевых клеток) у больных раком толстого кишечника в зависимости от наличия отдаленных метастазов, Me (Q₁-Q₃)

Содержание галектинов		Отдаленные метастазы	
		M0	M1
В опухоли (% опухолевых клеток)	Галектин-1	23,0 (11,0-41,0)	19,0 (10,0-43,0)
	Галектин-3	17,0 (7,0-23,0)	20,0 (12,0-24,0)
В крови (нг/мл)	Галектин-1	15,84 (14,35-16,59)	18,10 (16,90-19,00) p=0,023
	Галектин-3	3,28 (2,29-4,90)	4,33 (2,99-5,71)

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с больными без отдаленных метастазов (M0).

Для уточнения значения внутриопухолевых и плазменных галектинов-1,3 в патогенезе прогрессии опухоли при колоректальном раке нами был проведен логистический регрессионный анализ. Была проанализирована взаимосвязь экспрессии галектинов типа 1 и 3 опухолевыми клетками и плазменной концентрации галектина 1 и галектина 3 у больных раком толстого кишечника с показателями злокачественности опухоли, а именно со степенью распространения первичной опухоли и наличием очагов регионарного и отдаленного метастазирования. По результатам проведенного анализа были получены статистически значимые уравнения логистической регрессии ($p < 0,001$). Характеристика параметров этих уравнений, а также уровень точности классификации для каждого уравнения представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Характеристика членов уравнений логистической регрессии

Показатель	Член уравнения	Оценка	Отношение шансов	-95%	+95%	P	Точность классификации
1	2	3	4	5	6	7	8
Степень распространенности первичной опухоли (T1, T2 / T3, T4)	Галектин-1 опухоли	0,097	1,102	1,026	1,185	0,008	82,7%
	Свободный член	-0,389	0,678	-	-	0,540	
	Галектин-1 крови	0,925	2,521	1,178	5,396	0,017	73,1%
	Свободный член	-14,285	0,562	-	-	0,020	
Регионарные метастазы (N0 / N1, N2)	Галектин-1 опухоли	0,056	1,058	1,011	1,108	0,016	79,6%
	Галектин-3 опухоли	0,117	1,124	1,043	1,211	0,002	
	Свободный член	-4,705	0,009	-	-	0,001	

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4	5	6	7	8
Регионарные метастазы (N0 / N1, N2)	Галектин-1 крови	0,988	2,685	1,118	6,452	0,027	78,3%
	Свободный член	-15,662	0,427	-	-	0,029	
Отдаленные метастазы (M0 / M1)	Галектин-1 крови	1,376	3,958	1,172	8,365	0,027	95,2%
	Свободный член	-24,772	0,284	-	-	0,021	

Примечание: p – уровень статистической значимости; -95%/+95% – доверительный интервал отношения шансов.

Согласно результатам логистического регрессионного анализа, гиперэкспрессия галектина-1 и галектина-3 в опухолевой ткани и увеличение концентрации галектина-1 в плазме периферической крови у больных раком толстого кишечника ассоциированы со степенью инвазии первичной опухоли, а также риском возникновения локальных и дистантных метастазов, что составляет основу неблагоприятного прогноза заболевания. Наибольшее значение в отношении прогрессии рака толстого кишечника продемонстрировал галектин-1, опухолевая экспрессия и плазменный уровень которого оказались взаимосвязанными со степенью распространения первичной опухоли и появлением очагов регионарного и (в случае плазменной концентрации галектина-1) отдаленного метастазирования (Таблица 10).

Таким образом, при раке толстого кишечника доказанная взаимосвязь гиперэкспрессии галектина-1 и галектина-3 опухолевыми клетками и увеличения концентрации галектина-1 в периферической крови в ассоциации с нарушением субпопуляционного состава и цитокин-секреторной функции иммунорегуляторных Т-лимфоцитов, высоким инвазивным и метастатическим потенциалом опухоли позволяет рассматривать изученные лектины в качестве предикторов агрессивного течения заболевания.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проблема раннего выявления и быстрого прогрессирования злокачественных новообразований толстого кишечника обосновывает актуальность детального изучения молекулярно-клеточных основ иммунопатогенеза этих заболеваний. Одним из основных механизмов злокачественного роста клеток является способность опухоли и ее микроокружения продуцировать различные биомолекулы, активирующие пролиферацию трансформированных клеток, их инвазию и метастазирование, а также подавляющие противоопухолевый иммунный ответ [Seufferlein T. et al., 2009]. К таким факторам относятся галектины, участвующие в регуляции клеточного цикла, апоптотической гибели клеток, межклеточных взаимодействиях и других процессах [Rabinovich G. et al., 2002; Blaževič O. et al., 2016].

Дисбаланс экспрессии галектинов-1,3 регистрируется при многих злокачественных новообразованиях и коррелирует со степенью опухолевой прогрессии [Ebrahim A.H. et al., 2014; Thijssen V. et al., 2015; Labrie M. et al., 2017]. По данным ряда авторов, экспрессия галектинов, характерная для «здоровых» эпителиоцитов слизистой оболочки толстого кишечника, может значительно увеличиваться при злокачественной трансформации клеток [Hittelet A. et al., 2003; Uhlén M. et al., 2005; Watanabe M. et al., 2008].

Согласно результатам настоящего исследования, у больных колоректальным раком отмечается увеличение внутриопухолевой экспрессии галектина-1 и галектина-3 по сравнению с таковой у пациентов с доброкачественными опухолями толстого кишечника. Гиперэкспрессия галектинов-1,3 злокачественно трансформированными опухолевыми клетками, по-видимому, может быть обусловлена стимулирующим влиянием гипоксии, развивающейся в опухолевом очаге ввиду неспособности вновь образующихся сосудов обеспечить кислородом активно делящиеся клетки опухоли [Ikemori R.Y. et al., 2014]. По данным X. Zhao et al. (2010), гипоксией индуцируемый фактор (hypoxia-inducible factor – HIF) 1 может активировать продукцию галектина-1 путем взаимодействия с участками

регуляторной области гена *галектина-1* [Zhao X.Y. et al., 2010]. Вместе с тем, высокая экспрессия галектинов в опухоли может быть результатом стимулирующего влияния компонентов опухолевого микроокружения [Yamamoto-Sugitani M. et al., 2011].

Нарушение внутриопухолевой экспрессии галектинов может сопровождаться изменением содержания данных белков в периферической крови [Labrie M. et al., 2017; Martinez-Bosch N. et al., 2018; Topcu T.O. et al., 2018], в том числе и при колоректальном раке [Watanabe M. et al., 2011; Iacovazzi P.A. et al., 2010; Barrow H. et al., 2011; Shimura T. et al., 2016]. По результатам проведенного исследования, у больных раком толстого кишечника концентрация галектина-1 и галектина-3 в плазме периферической крови была выше, чем у здоровых доноров. В отдельных работах показано также увеличение плазменного уровня галектина-1 [Watanabe M. et al., 2011] и галектина-3 [Barrow H. et al., 2011; Shimura T. et al., 2016] при колоректальном раке. Однако, по сведениям H. Barrow et al. (2011), концентрация галектина-1 в сыворотке крови у больных раком толстого кишечника соответствует таковой в группе контроля [Barrow H. et al., 2011]. Данное противоречие может быть обусловлено тем, что авторы в своей работе определяли именно сывороточный уровень галектина-1, не учитывая возможность его связывания активированными факторами свертывания крови [Barrow H. et al., 2011]. Рассуждая о причинах повышения уровня галектина-1 и галектина-3 в периферической крови у больных колоректальным раком, следует отметить, что, несмотря на широкую распространенность данных лектинов в тканях организма, основными их продуцентами при злокачественных новообразованиях считаются сами опухолевые клетки, а также клетки опухолевого микроокружения [Jurisci I. et al., 2000; Yu L.G., 2010; Banh A. et al., 2011; Watanabe M. et al., 2011]. Это подтверждается результатами нашего исследования, согласно которым уровень галектина-1 в плазме крови у больных раком толстого кишечника положительно коррелировал с содержанием галектин-1-позитивных опухолевых клеток.

Важным патогенетическим и, нередко, этиологическим предрасполагающим фактором возникновения онкологических заболеваний является дисрегуляция

врожденного и адаптивного иммунитета. Его нарушения могут проявляться анергией опухоль-специфических Т-лимфоцитов, дефектами их клональной экспансии, дифференцировки и функциональной активности. Данные изменения приводят не только к угнетению противоопухолевого иммунитета, что способствует росту, инвазии и метастазированию клеток новообразования, но и лежат в основе развития у пациентов паранеопластического синдрома, утяжеляющего течение болезни [Gonzalez H. et al., 2018].

Известно, что эффективность антицеллюлярных механизмов противоопухолевой резистентности в значительной степени зависит от баланса субпопуляций Т-лимфоцитов с регуляторной активностью [Toes R. et al., 1999; Facciabene A. et al., 2012]. При этом трансформированные клетки, изначально уязвимые для иммунной системы, по мере прогрессирования опухолевого роста приобретают способность активно подавлять направленный против них иммунный ответ [Smyth M.J. et al., 2006].

Примечательно, что иммуномодулирующее влияние злокачественно трансформированных клеток не ограничивается пределами опухолевого микроокружения, а может распространяться на клетки органов иммунопоза и манифестировать в форме вторичной иммунологической недостаточности. В 1996 году P. Pellegrini et al. продемонстрировали преобладание *in vitro* секреции ИЛ-4 над продукцией ИЛ-2 лейкоцитами периферической крови у больных колоректальным раком, что, по мнению авторов, свидетельствует о подавлении Th1-зависимых реакций противоопухолевого иммунного ответа [Pellegrini P. et al., 1996]. Позднее в литературе появились и другие исследования, данные которых указывают на системный характер дисрегуляции функций Т-лимфоцитов при многих опухолевых заболеваниях [Membrives M.M.V. et al., 2015; Wang L. et al., 2017; Wang L. et al., 2020]. Учитывая, что лимфоциты являются рециркулирующими клетками, способными к рекрутированию из кровотока в ткани и наоборот, структурно-функциональные изменения Т-лимфоцитов периферической крови во многом отражают состояние не только общего иммунного статуса организма при

опухолевой патологии, но и иммунного микроокружения опухоли [Wang L. et al., 2019].

Центральную роль в реализации механизмов противоопухолевой резистентности играют $CD4^+$ Т-лимфоциты-хелперы типа 1 (Th1), которые участвуют в элиминации злокачественных клеток путем продукции $IFN\gamma$, активации цитотоксических $CD8^+$ лимфоцитов, а также стимуляции презентации макрофагами опухоль-ассоциированных антигенов [Kennedy R. et al., 2008; Ling A. et al., 2016]. К противоопухолевым эффектам $IFN\gamma$ также относят угнетение пролиферации и индукцию апоптоза злокачественных клеток [Chawla-Sarkar M. et al., 2003], подавление опухолевого неоангиогенеза [Qin Z. et al., 2003]. Для многих злокачественных опухолей характерно уменьшение количества Th1-лимфоцитов в ткани новообразования и периферической крови, взаимосвязанное с неблагоприятным прогнозом болезни и низкой выживаемостью пациентов [Ling A. et al., 2016; Yang J. et al., 2019].

Предыдущий тезис не противоречит результатам нашего исследования, согласно которым, у больных раком толстого кишечника установлено снижение относительного содержания $CD4^+T\text{-bet}^+$ Th1-лимфоцитов в крови по сравнению с таковым у здоровых доноров. Однако при определении концентрации $IFN\gamma$ – маркерного цитокина дифференцировки и активации Th1-лимфоцитов, в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови *in vitro* у больных раком толстого кишечника мы не обнаружили существенного изменения его базальной секреции. Учитывая, что $IFN\gamma$ -секреторный ответ является типовой реакцией Th1-лимфоцитов, цитотоксических $CD8^+$ - и NK-клеток на антигенную стимуляцию, в том числе опухолевую [Aqbi H.F. et al., 2018], выявленный дефицит $IFN\gamma$ -опосредованных реакций (в частности снижение числа $CD4^+T\text{-bet}^+$ Th1-клеток) у больных колоректальным раком отражает снижение противоопухолевой защиты макроорганизма.

В механизмах развития и прогрессии опухоли важная роль отводится еще одной субпопуляции Т-лимфоцитов – Th17, относительное содержание которых в периферической крови может варьироваться, хотя интерпретация этих изменений

при злокачественных опухолях толстого кишечника пока неоднозначна [Amicarella F. et al., 2017]. Известно, что CD4⁺ Th17-лимфоциты, секретирующие IL-17A, оказывают разнонаправленное влияние на опухолевый процесс в зависимости от вида новообразования и стадии болезни. Показана способность Th17-лимфоцитов стимулировать рекрутирование в очаг опухоли цитотоксических лимфоцитов, нейтрофилов, NK-клеток и Th1-лимфоцитов, проявляющих опухолецидные свойства [Kryczek I. et al., 2009; De Simone V. et al., 2013]. В то же время, Th17-клетки способны индуцировать продукцию клетками опухоли и элементами ее микроокружения провоспалительных цитокинов и факторов роста, усиливая тем самым опухолевый рост и прогрессию опухоли [Murugaiyan G. et al., 2009; De Simone V. et al., 2013; Amicarella F. et al., 2017].

Согласно данным L. Ling et al. (2015), у больных раком толстого кишечника процентное содержание Th17-лимфоцитов в периферической крови уменьшается и коррелирует с неблагоприятным прогнозом заболевания [Ling L. et al., 2015]. Другие авторы отмечают, напротив, повышение числа циркулирующих Th17-клеток и плазменной концентрации IL-17A при колоректальном раке, постулируя данные изменения как предиктор высокой степени агрессивности новообразования [Doulabi H. et al., 2018]. По результатам нашего исследования, у больных раком толстого кишечника относительное содержание CD4⁺RORC2⁺ Th17-лимфоцитов в периферической крови оказалось ниже соответствующего параметра у здоровых лиц, и сочеталось со снижением *in vitro* секреции IL-17A, что свидетельствует о недостаточности иммунных механизмов, опосредованных Th17-лимфоцитами в иммунопатогенезе рака толстого кишечника.

Значимую роль в угнетении механизмов противоопухолевого иммунитета и развитии толерантности иммунокомпетентных клеток к опухолевым антигенам играют T-регуляторные лимфоциты (Treg), реализующие свои функции за счет контактного (рецептор-опосредованного) ингибирования иммунокомпетентных клеток, а также секреции супрессорных цитокинов IL-10 и TGFβ [Bonertz A. et al., 2009; Ohue Y. et al., 2019]. Наряду с иммуносупрессорными свойствами, TGFβ способен оказывать стимулирующее влияние непосредственно на процессы

пролиферации злокачественных клеток, их инвазию и метастазирование [Massague J., 2008].

Подавляющее большинство злокачественных опухолей характеризуется увеличением содержания циркулирующих и внутриопухолевых Treg-лимфоцитов, что ассоциируется с негативным прогнозом заболевания и низкой выживаемостью больных [Ge X. et al., 2019; Ohue Y. et al., 2019]. В исследованиях, проводимых В. Bencsikova et al. (2019), показана негативная роль циркулирующих в крови Treg-лимфоцитов в механизмах прогрессии колоректального рака, ассоциированного с наличием метастазов, и развития у пациентов устойчивости опухолевых клеток к химиотерапии [Bencsikova V. et al., 2019]. По данным других ученых, инфильтрация опухолевой ткани Foxp3-позитивными T-регуляторными лимфоцитами является маркером благоприятного прогноза течения рака толстого кишечника, ассоциированного с общей выживаемостью пациентов [Sinicropo F.A. et al., 2009; Kuwahara T. et al., 2019].

По результатам нашего исследования, у пациентов с раком толстого кишечника относительное содержание CD4⁺Foxp3⁺ Treg-лимфоцитов в крови достоверно превышало аналогичный показатель у здоровых доноров. Одновременно с этим у больных колоректальным раком было зарегистрировано увеличение *in vitro* секреции мононоуклеарными лейкоцитами крови TGFβ1-изоформы трансформирующего фактора роста – основного цитокина с иммуносупрессорной активностью.

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

Известно, что ключевым механизмом опухоль-индуцированной дисфункции клеток адаптивного иммунитета, формирующейся при прогрессии злокачественных новообразований, является супрессорное действие толерогенных

дендритных клеток, которые, в свою очередь, дифференцируются под влиянием опухолевых факторов [Rabinovich G.A. et al., 2007]. Кооперативное взаимодействие злокачественно трансформированных клеток и факторов иммунной системы может быть опосредовано галектинами. В литературе описаны некоторые прямые эффекты галектинов 1-го и 3-го типов в отношении эффекторных и регуляторных популяций Т-лимфоцитов в экспериментах *in vitro* [Rabinovich G.A. et al., 2002; Toscano M.A. et al., 2006; Blois S.M. et al., 2007; Stowell S.R. et al., 2008; Chen H.Y. et al., 2009; Wei J. et al., 2010; Cedeno-Laurent F. et al., 2012; Fermino M.L. et al., 2013], однако особенности иммунорегуляторного действия данных лектинов при опухолевых заболеваниях остаются, по-прежнему, предметом дискуссий. Малоизученными в развитии опухоль-ассоциированной дисрегуляции иммунитета являются дистантные (через кровь) регуляторные эффекты галектинов, секретируемых клетками опухоли и ее микроокружения. Согласно результатам *in vitro* исследований, для реализации иммуностропных эффектов галектинов необходима высокая локальная концентрация рассматриваемых белков. Подобные условия, в частности, могут обеспечиваться в пределах микроокружения опухоли [Fortuna-Costa A. et al., 2014; Cousin J. et al., 2016]. Вместе с тем, в литературе представлены сведения, указывающие на наличие биологической активности и у галектинов, выделяемых опухолевыми клетками в кровь [Yu L.G., 2010; Chen C. et al., 2014].

В связи с вышеизложенным, нами была проанализирована взаимосвязь плазменной концентрации галектинов (типов 1 и 3) с относительным содержанием CD4⁺T-bet⁺ Th1, CD4⁺RORC2⁺ Th17 и CD4⁺Foxp3⁺ Treg лимфоцитов крови и их цитокин-секреторной активностью у больных раком толстого кишечника. По результатам исследования установлена корреляционная связь между высокой концентрацией галектина-1 в периферической крови и снижением количества CD4⁺T-bet⁺ лимфоцитов крови (Рисунок 12), что, по-видимому, отражает супрессорное влияние секреторного галектина-1 в отношении ключевых противоопухолевых Th1-лимфоцитов.

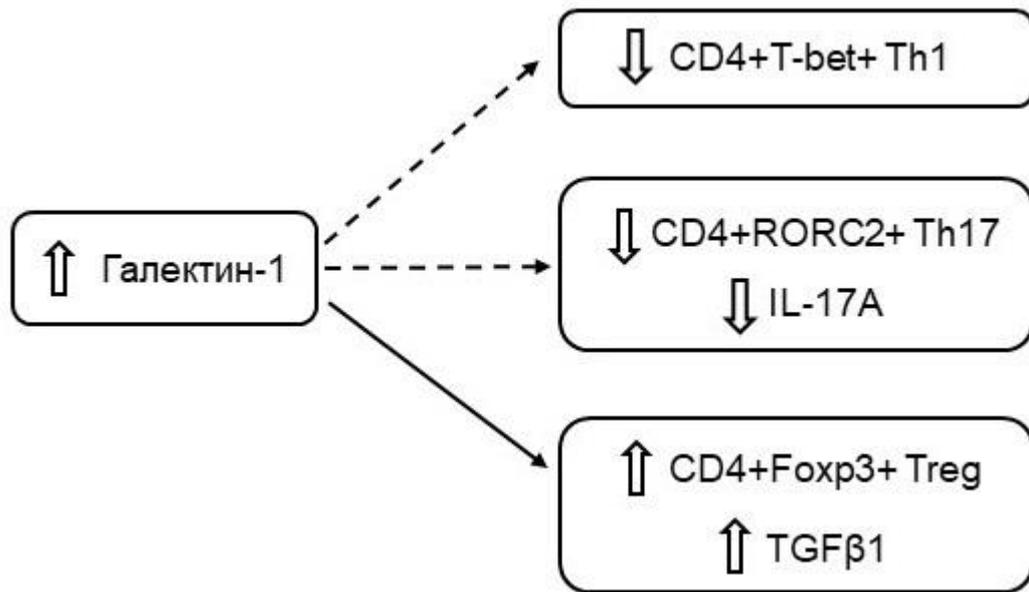


Рисунок 12 – Взаимосвязь увеличения плазменной концентрации галектина-1 с относительным содержанием CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови и *in vitro* секрецией их маркерных цитокинов у больных раком толстого кишечника

Примечание: здесь и в рисунке 10, пунктирные стрелки – отрицательные корреляции, сплошная стрелка – положительная корреляция.

В основе выявленной взаимосвязи могут лежать два механизма. По мнению К.Е. Раса et al. (1999), галектин-1-опосредованный дефицит Т-лимфоцитов-хелперов типа 1 обусловлен преимущественной индукцией апоптоза клеток при связывании галектина-1 с мембранными рецепторами CD3, CD7, CD43 и CD45 на Т-лимфоцитах [Раса К.Е. et al., 1999]. В исследованиях N. Rubenstein et al. (2004) продемонстрировано, что именно индукция апоптоза опухоль-специфичных Th1-лимфоцитов инициировала *in vitro* иммуносупрессорный эффект галектина-1, секретируемого клеточной линией меланомы B16 [Rubinstein N. et al., 2004]. Сходные результаты были получены при сокультивировании Т-лимфоцитов с клетками Рида-Штернберга [Juszczynski P. et al., 2007] и рака поджелудочной железы [Tang D. et al., 2007]. Другим механизмом галектин-1-зависимой супрессии функций Th1-лимфоцитов является подавление их антиген-зависимой активации и IL-2-опосредованной клональной пролиферации путем связывания галектина-1 с

Т-клеточным рецептором (TCR) для распознавания антигена [Vespa G.N. et al., 1999; Chung C.D. et al., 2000].

Известно, что галектин-1 проявляет иммуносупрессорные свойства также в отношении Th17-лимфоцитов. Показана способность данного лектина индуцировать *in vitro* апоптотическую гибель Th17-лимфоцитов и, напротив, подавлять их дифференцировку [Toscano M.A. et al., 2007]. По данным О.А. Васильевой и соавт. (2015), добавление рекомбинантного галектина-1 в *in vitro* культуру мононуклеарных лейкоцитов крови здоровых доноров приводило к уменьшению содержания Th17-лимфоцитов, о чем свидетельствовало снижение числа клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор RORC2 [Васильева О.А. и соавт., 2015]. Наряду с этим, продемонстрирована способность галектина-1 модулировать секрецию IL-17A Т-лимфоцитами. Согласно сведениям, полученным М.А. Toscano et al. (2007), делеция гена галектина-1 у мышей сопровождается увеличением секреции IL-17A селезеночными Т-лимфоцитами [Toscano M.A. et al., 2007]. При этом в литературе не представлены сведения, касающиеся роли галектин-1-зависимой регуляции функций Th17-лимфоцитов в патогенезе опухоль-ассоциированной иммуносупрессии.

По результатам нашего исследования, у больных колоректальным раком обнаружена отрицательная корреляционная взаимосвязь плазменной концентрации галектина-1 с относительным содержанием CD4⁺RORC2⁺ Th17-лимфоцитов в крови и *in vitro* базальной секрецией IL-17A мононуклеарными лейкоцитами крови (Рисунок 9). Принимая во внимание данные литературы и полученные нами результаты, следует заключить факт участия галектина-1 в подавлении Th17-зависимых реакций адаптивного иммунитета при раке толстого кишечника.

Как уже упоминалось ранее, галектин-1 способен угнетать реакции противоопухолевого иммунного ответа через активацию механизмов иммуносупрессии, опосредованных Treg. По результатам проведенного исследования, у больных колоректальным раком высокая концентрация галектина-1 в плазме периферической крови взаимосвязана с увеличением относительного

числа CD4⁺Foxp3⁺Treg клеток, а также *in vitro* гиперсекрецией TGFβ1 мононуклеарными лейкоцитами крови. Установленная взаимосвязь обусловлена, по-видимому, стимулирующим влиянием секреторного галектина-1 на Treg-лимфоциты периферической крови. Согласно данным литературы, галектин-1 потенцирует *in vitro* дифференцировку Т-регуляторных клеток из наивных и поляризованных Т-лимфоцитов [Cedeno-Laurent F. et al., 2012]. Вместе с тем, галектин-1 может стимулировать пролиферацию и цитокин-секреторную активность уже дифференцированных Treg-лимфоцитов путем непосредственного взаимодействия с их мембранными рецепторами, а также через активацию толерогенных дендритных клеток [Blois S.M. et al., 2007; Dalotto-Moreno T. et al., 2013]. Наряду с этим, описана способность галектина-1, секретируемого опухолевыми клетками рака молочной железы, инициировать *in vivo* клональную экспансию и функциональную активность Treg [Dalotto-Moreno T. et al., 2013].

В отличие от галектина-1, рассматриваемого в литературе в качестве универсального супрессорного фактора, информация об иммунорегуляторных эффектах, реализуемых галектином-3 не вполне однозначная. Показано, что секреторный галектин-3 способен индуцировать апоптоз CD4⁺ Т-лимфоцитов, [Stillman B.N. et al., 2006; Wei J. et al., 2010], а повышенная экспрессия галектина-3 самими Т-лимфоцитами ассоциирована с развитием анергии и снижением цитокин-секреторной активности этих клеток [Chen H.Y. et al., 2009]. По данным других авторов, галектин-3, локализованный внутриклеточно, напротив, увеличивает резистентность Т-лимфоцитов к апоптотической гибели [Yang R.Y. et al., 1996], а также стимулирует продукцию ими IL-2 [Hsu D.K. et al., 1996]. Следует отметить, что внутриклеточная экспрессия галектина-3 может быть индуцирована секреторной формой этого лектина [Hsu D.K. et al., 2009].

Не совсем ясной остается функция галектина-3 в отношении Т-регуляторных клеток. С одной стороны, показана способность данного белка стимулировать *in vitro* дифференцировку и цитокин-секреторную активность Treg-клеток. Нокаут гена галектина-3 в экспериментальной модели меланомы сопровождался снижением рекрутирования Т-регуляторных клеток в очаг опухоли [Radosavljevic

G. et al., 2011]. В то же время, по данным M.L. Fermino (2013), эндогенный галектин-3 снижает *in vivo* миграционную способность Treg-лимфоцитов, а также подавляет продукцию ими иммуносупрессорных цитокинов IL-10 и TGF β [Fermino M.L. et al., 2013]. Установлено также ингибирующее влияние галектина-3 на *in vitro* созревание и цитокин-секреторную функцию Treg [Васильева О.А. и соавт., 2013].

Согласно результатам нашего исследования, у больных колоректальным раком увеличение концентрации галектина-3 в плазме периферической крови было ассоциировано со снижением числа циркулирующих CD4⁺T-bet⁺ T-лимфоцитов и возрастанием *in vitro* секреции TGF β 1 мононуклеарами крови (Рисунок 13).

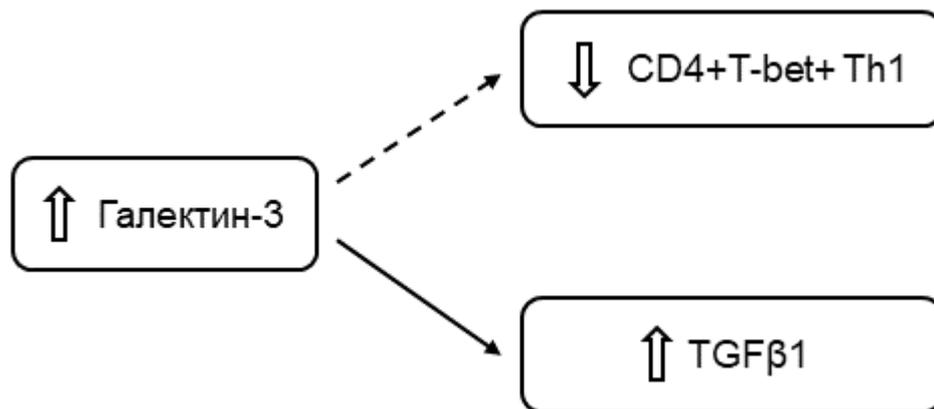


Рисунок 13 – Взаимосвязь увеличения плазменной концентрации галектина-3 с относительным содержанием CD4⁺ Th1-лимфоцитов в крови и *in vitro* секрецией TGF β 1 мононуклеарными лимфоцитами крови у больных раком толстого кишечника

В целом, при раке толстого кишечника галектин-3 оказывает супрессорное влияние на клеточно-зависимые реакции адаптивного иммунитета посредством подавления Th1-лимфоцитов и активации функций иммуносупрессорных T-регуляторных клеток. Полученные нами результаты не противоречат данным T. Shimura et al. (2016), согласно которым у больных раком толстого кишечника уровень циркулирующего в крови галектина-3 отрицательно коррелировал с секрецией лимфоцитами IL-12 – ключевого фактора дифференцировки T-хелперов 1-ого типа [Shimura T. et al., 2016].

Таким образом, при раке толстого кишечника галектин-1 и галектин-3 являются факторами дисрегуляции адаптивного иммунитета, а опухоль-ассоциированная гиперсекреция данных лектинов может выступать в качестве одного из механизмов иммуносупрессии, индуцируемой злокачественными клетками.

Как упоминалось ранее, снижение эффективности антицеллюлярных механизмов противоопухолевой резистентности вносит значительный вклад в патогенез опухолевого процесса, способствует росту и распространению опухоли. Для установления роли галектин-1,3-зависимой дисрегуляции адаптивного иммунитета в механизмах опухолевой прогрессии при раке толстого кишечника нами была проанализирована взаимосвязь нарушений субпопуляционного баланса и цитокин-секреторной активности $CD4^+T\text{-bet}^+$ Th1, $CD4^+RORC2^+$ Th17 и $CD4^+Foxp3^+$ Treg лимфоцитов крови с клинико-морфологическими показателями опухолевой прогрессии, а именно со степенью дифференцированности опухоли, степенью ее распространенности, а также наличием регионарных и отдаленных метастазов.

Согласно полученным результатам, дефицит Th1-лимфоцитов в периферической крови и *in vitro* гипосекреция маркерного цитокина $CD4^+RORC2^+$ Th17-лимфоцитов IL-17A наиболее выражены у больных раком толстого кишечника с высокой степенью инвазии первичной опухоли (T3, T4), а увеличение относительного содержания Treg-клеток – у больных колоректальным раком, сопровождающимся появлением очагов гематогенного метастазирования (M1) (Рисунок 14). По результатам *in vivo* исследований, активация иммуносупрессорных Treg-лимфоцитов и подавление Th1-зависимых противоопухолевых реакций сопровождаются увеличением инвазивного и метастатического потенциала новообразования [Radosavljevic G. et al., 2011; Cedeno-Laurent F. et al., 2012; Dalotto-Moreno et al., 2013].



Рисунок 14 – Взаимосвязь нарушений субпопуляционного состава и цитокин-секреторной активности CD4⁺ Т-лимфоцитов крови с клинико-морфологическими показателями злокачественности опухолевого процесса у больных раком толстого кишечника

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

По результатам нашего исследования, избыточная экспрессия галектина-1 в опухолевой ткани и высокая концентрация галектина-1 в периферической крови

достоверно чаще выявлялись у пациентов с раком толстого кишечника, характеризующимся прорастанием опухоли субсерозного слоя кишечника, появлением очагов лимфогенного и (в случае галектина-1 периферической крови) гематогенного метастазирования (Рисунок 15).



Рисунок 15 – Взаимосвязь внутриопухолевой экспрессии галектинов (типов 1 и 3) и их концентрации в периферической крови с клиничко-морфологическими показателями злокачественности опухолевого процесса у больных раком толстого кишечника

Полученные нами результаты согласуются с данными X. Zhao et al. (2010), которые показали ассоциацию степени распространения первичной опухоли и появления регионарных метастазов с увеличением количества галектин-1-позитивных опухолевых клеток при колоректальном раке [Zhao X.Y. et al., 2010]. По сведениям К. Wu et al. (2015), высокий плазменный уровень галектина-1 сопряжен с риском лимфогенной диссеминации первичной опухоли у больных раком толстого кишечника [Wu. K. et al., 2015]. Следует отметить, что связь концентрации галектина-1 в плазме периферической крови с риском возникновения очагов отдаленного метастазирования при колоректальном раке нами зарегистрирована впервые.

При анализе экспрессии опухолевыми клетками галектина-3, нами была обнаружена взаимосвязь данного параметра с наличием у пациентов регионарных метастазов (Рисунок 15).

В литературе описаны различные механизмы влияния галектинов-1,3 на способность опухолевых клеток к инфильтративному росту и метастатическому распространению, не связанные с галектин-опосредованной дисрегуляцией иммунитета. По данным N. Horiguchi et al. (2003), при колоректальном раке галектин-1 модулирует *in vitro* адгезию опухолевых клеток к белкам внеклеточного матрикса фибронектину и ламинину, что связано с активацией внутриклеточных вторичных мессенджеров MAPK и PI3K [Horiguchi N. et al., 2003]. В свою очередь, K. Wu et al. (2013) показали, что при индуцированной гиперэкспрессии галектина-3 в клеточной линии рака толстого кишечника, увеличение метастатической активности клеток опосредованно запуском K-Ras-Raf-Erk1/2-сигнального каскада [Wu K. et al., 2013]. Установлена также способность галектина-1 стимулировать секрецию клетками опухолевого микроокружения протеолитических ферментов, расщепляющих белки внеклеточного матрикса, что облегчает инвазию злокачественных клеток, их интра- и экстравазацию [Miao J. et al., 2014; Zhu X. et al., 2016].

Кроме этого, галектины 1-го и 3-го типов реализуют проангиогенные свойства и потенцируют образование в опухолевом очаге разветвленной сосудистой сети. Последнее улучшает не только приток кислорода и питательных веществ в опухоль, но и способствует лимфатической и гематогенной диссеминации злокачественных клеток [Lugano R. et al., 2020]. Данный эффект галектинов опосредован стимуляцией ими экспрессии на клетках опухоли рецепторов к сосудисто-эндотелиальному ростовому фактору (vascular-endothelial growth factor – VEGF) [Lugano R. et al., 2020]. По данным экспериментальных *in vitro* исследований, галектин-1 и галектин-3 индуцируют процессы пролиферации и миграции эндотелиоцитов путем перекрестного связывания и кластеризации рецепторов к VEGF, что приводит к амплификации внутриклеточного сигнала [Thijssen V. et al., 2010; Markowska, A.I. et al., 2011; Croci D.O. et al., 2014].

Анализируя возможные причины взаимосвязи плазменного уровня галектина-1 с риском гематогенного метастазирования рака толстого кишечника, необходимо отметить, что эффекты галектинов не ограничиваются микроокружением опухоли, а распространяются и на циркулирующие в крови опухолевые клетки. Известно, что галектины типов 1 и 3 способны вызывать агрегацию злокачественных клеток путем перекрёстного связывания мембранных β -галактозидов, что может увеличивать выживаемость метастатических опухолевых клеток в кровеносном русле [Zhao Q. et al., 2010; Cousin J.M. et al., 2015]. По данным других авторов, галектины 2-го, 4-го и 8-го типов стимулируют секрецию эндотелиоцитами колониестимулирующего фактора гранулоцитов (granulocyte colony-stimulating factor – G-CSF), IL-6 и моноцитарного хемотаксического фактора (monocyte chemoattractant protein – MCP) 1, тем самым повышая адгезию циркулирующих опухолевых клеток к эндотелию сосудов [Chen C. et al., 2014]. Учитывая, что пути галектин-опосредованной модуляции адгезионных свойств клеток во многом универсальны [Rabinovich G.A. et al., 2007], данный механизм, возможно, реализуется и галектином-1.

Наряду с этим, в литературе имеются данные о неодинаковой экспрессии галектинов-1,3 злокачественными клетками толстого кишечника разной степени дифференцированности [Sanjuán X. et al., 1997; Hittlet A. et al., 2003]. По результатам нашего исследования, высокая экспрессия внутриопухолевого галектина-3 в сочетании с повышением плазменной концентрации данного лектина была зарегистрирована у пациентов с низкодифференцированными злокачественными опухолями толстого кишечника (Рисунок 14). Данная особенность, вероятно, обусловлена усилением экспрессии галектина-3 в условиях внутриопухолевой гипоксии, степень которой нарастает по мере снижения дифференцированности новообразования [Jögi J.A. et al., 2012].

В целом, у больных раком толстого кишечника установлена повышенная экспрессия галектинов-1,3 в опухолевой ткани и высокая их концентрация в периферической крови в ассоциации с дисбалансом субпопуляций и цитокин-секреторной активности адаптивных CD4⁺ Т-лимфоцитов-хелперов, сопряженные

с низкой степенью дифференцированности опухоли, выраженным инфильтрирующим ростом первичного опухолевого узла, а также повышенным риском возникновения регионарных и отдаленных метастазов (Рисунок 16).

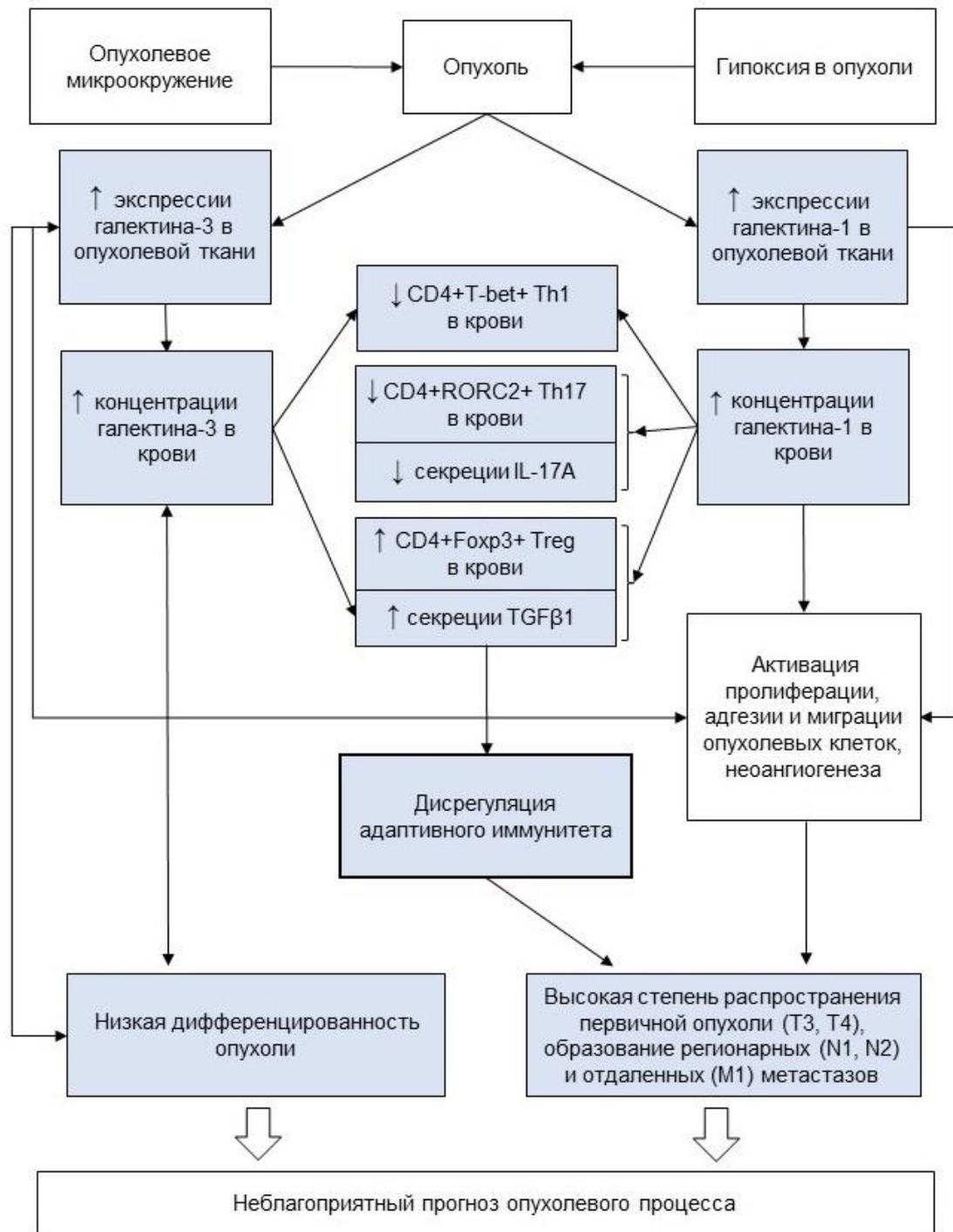


Рисунок 16 – Роль галектинов 1 и 3 в механизмах дисрегуляции адаптивного иммунитета и опухолевой прогрессии при раке толстого кишечника (по данным X. Zhao et al. (2010), M. Watanabe et al. (2011), K. Wu et al. (2013), D. Croci et al. (2014), C. Chen et al. (2014) и результатам собственных исследований (выделено цветом))

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

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

ВЫВОДЫ

1. При раке толстого кишечника повышено содержание галектин-1,3-экспрессирующих клеток в опухолевой ткани (выше, чем при аденомах толстого кишечника) и галектинов 1 и 3 в периферической крови (выше, чем у здоровых доноров). Установлено прямое соотношение между концентрацией галектина-1 в плазме крови и количеством галектин-1-позитивных клеток в ткани злокачественного новообразования.
2. Иммунная дисрегуляция у больных раком толстого кишечника развивается вследствие дефицита $CD4^+T\text{-bet}^+$ (Th1) и $CD4^+RORC2^+$ (Th17) лимфоцитов и увеличения относительного содержания иммуносупрессорных $CD4^+Foxp3^+$ Treg-клеток в крови в комплексе с нарушениями *in vitro* секреции Th17- и Treg-маркерных цитокинов – IL-17A (снижение) и TGF β 1 (повышение). Секреция IFN γ варьирует в пределах нормы.
3. Нарушения субпопуляционного состава регуляторных T-лимфоцитов крови (дефицит Th1, Th17) и их цитокин-секреторной активности (гиперсекреция TGF β 1) у больных раком толстого кишечника коррелируют с увеличением концентрации галектина-1 и галектина-3 в плазме крови.
4. У больных раком толстого кишечника высокая внутриопухолевая экспрессия галектина-1 и повышение концентрации галектина-1 в крови определяются при выраженной инвазии новообразования с наличием очагов регионарного и отдаленного метастазирования, в то время как высокая экспрессия галектина-3 клетками первичной опухоли соответствует низкой степени ее дифференцированности и регионарному метастазированию.
5. Галектин-1,3-зависимый дефицит $CD4^+T\text{-bet}^+$ Th1-лимфоцитов крови и *in vitro* гипосекреция IL-17A сочетаются с высокой степенью распространения первичной опухоли, а увеличение количества $CD4^+Foxp3^+$ иммуносупрессорных Treg-клеток в крови – с наличием отдаленных метастазов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ЦТЛ – цитотоксические лимфоциты
- APC – alyphycosyanin (аллофикоцианин)
- CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)
- CRD – carbohydrate recognition domain (домен для распознавания углеводов)
- CXCL – C-X-C motif chemokine ligand (С-Х-С хемокиновый лиганд)
- Cy5.5 – Cyanin 5.5 (цианин 5.5)
- Foxp3 – forkhead box p3
- FSC – forward scatter (прямое светорассеяние)
- G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor (колониестимулирующий фактор гранулоцитов)
- HIF – hypoxia-inducible factor (гипоксией индуцируемый фактор)
- IFN – interferon (интерферон)
- IL – interleukin (интерлейкин)
- MHC – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)
- MMP – matrix metalloproteinases (матриксные металлопротеиназы)
- НК-клетки – natural killer cells (натуральные киллеры)
- PE – Phycocerythrin (фикоэритрин)
- PerCP – Peridinin Chlorophyll Protein Complex – (Перидинина-хлорофилл-белковый комплекс)
- SSC – side scatter (боковое светорассеяние)
- T-bet – T-box protein expressed in T cells (T-box белок, экспрессирующийся в Т-клетках)
- TCR – T-cell receptor (Т-клеточный рецептор)
- TGF – transforming growth factor (трансформирующий фактор роста)
- Th – T-helpers (Т-лимфоциты-хелперы)
- TNF – tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли)
- Treg – regulatory T cells (Т-регуляторные лимфоциты)

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние галектинов на дифференцировку и функциональную активность Th-лимфоцитов *in vitro* / О.А. Васильева, Т.С. Прохоренко, А.П. Зима, В.В. Новицкий // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – С. 14.
2. Гольдберг Е.Д. Методы культуры ткани в гематологии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов – Томск: Изд-во Том. ун-та. – 1992. – 264 с.
3. Меркулов, Г.А. Курс патологогистологической техники / Г.А. Меркулов – Л. : Медицина. – 1996. – 544 с.
4. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / под ред. С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. – 3-е изд, доп. и перераб. – Казань : Титул, 2004. – 456 с.
5. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М. : МНИОИ им. П. А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. – илл. – 236 с.
6. Регуляция экспрессии генов транскрипционных факторов дифференцировки T-лимфоцитов CD4⁺ галектином-3 *in vitro* / О.А. Васильева, В.Д. Якушина, Н.В. Рязанцева [и др.] // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47, № 6. – С. 1004–1010.
7. Васильева О.А. Галектин-3 модулирует функциональную активность Th17 и регуляторных T-лимфоцитов *in vitro* / О.А. Васильева // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8(17), N 3. – С. 270-272.
8. Роль галектина-1 в регуляции дифференцировки CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺- клеток *in vitro* / О.А. Васильева, В.Д. Якушина, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // Иммунология. – 2014. – Т. 35, N 6. – С. 300-305.
9. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8⁺ T cells / Z. Qin, J. Schwartzkopff, F. Pradera [et al.] // Cancer Res. – 2003. – Vol. 63, N 14. – P. 4095–4100.

10. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics / M. Uhlén, E. Björling, C. Agaton [et al.] // *Mol Cell Proteomics*. – 2005. - Vol. 4, N 12. – P. 1920–1932.
11. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance / S.M. Blois, J.M. Ibarregui, M. Tometten [et al.] // *Nat Med*. – 2007. – Vol. 13, N 12. – P. 1450–1457.
12. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. L. Yang, J. Huang, X. Ren [et al.] // *Cancer Cell*. – 2008. – Vol. 13, N 1. – P. 23–35.
13. Analysis of Th22, Th17 and CD4+cells co-producing IL-17/IL-22 at different stages of human colon cancer / H. Doulabi, M. Rastin, H. Shabahangh, [et al.] // *Biomed Pharmacother*. – 2018. – Vol. 103. – P. 1101–1106.
14. An application of the 2-nitrobenzenesulfonyl method to proteomic profiling of human colorectal carcinoma: A novel approach for biomarker discovery / M. Watanabe, I. Takemasa, N. Kawaguchi [et al.] // *Proteomics Clin Appl*. – 2008. Vol. 2, N 6. – P. 925–935.
15. Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma / A. Bonertz, J. Weitz, D.H. Pietsch [et al.] // *J Clin Invest*. – 2009. – Vol. 119, N 11. – P. 3311–3321.
16. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer / L.E. Dow, K.P. O'Rourke, J. Simon [et al.] // *Cell*. – 2015. – Vol. 161, N 7. – P. 1539–1552.
17. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. M. Chawla-Sarkar, D.J. Lindner, Y.F. Liu [et al.] // *Apoptosis*. – 2003. – Vol. 8, N 3. – P. 237–249.
18. Association between circulating galectin-3 levels and the immunological, inflammatory and nutritional parameters in patients with colorectal cancer / T. Shimura, M. Shibata, K. Gonda [et al.] // *Biomed Rep*. – 2016. – Vol. 5, N 3. – P. 203–207.

19. B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and stromal cells communicate through Galectin-3 / F. Fei, E.J. Joo, S.S. Tarighat [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, N 13. – P. 11378–11394.
20. Balkwill, F.R. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities / F.R. Balkwill, A. Mantovani // *Semin Cancer Biol*. – 2012. – Vol. 22, N 1. – P. 33–40.
21. Barrow, H. The role of galectins in colorectal cancer progression / H. Barrow, J.M. Rhodes, L.G. Yu // *Int J Cancer*. – 2011. – Vol. 121, N 1. – P. 1–8.
22. Bartholin, L. TGF- β as Tumor Suppressor: In Vitro Mechanistic Aspects of Growth Inhibition / L. Bartholin, D.F. Vincent, U. Valcourt // *TGF- β in Human Disease*. – 2013. – P. 113–138.
23. Bartolazzi, A. Galectins in Cancer and Translational Medicine: From Bench to Bedside / A. Bartolazzi // *Int J Mol Sci*. – 2018. – Vol, 19, N 10. – P. 2934.
24. Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g / A. Böyum // *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. – 1968. – Vol. 97. – P. 77–89.
25. Breast cancer induces systemic immune changes on cytokine signaling in peripheral blood monocytes and lymphocytes / L. Wang, D.L. Simons, X. Lu [et al.] // *EBioMedicine*. – 2020. – Vol. 52. – P. 102631.
26. Brinchmann, M.F. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation [Electronic resource] / M.F. Brinchmann, D.M. Patel, M.H. Iversen // *Mediators Inflamm*. – 2018. – Vol. 2018. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987346/> (дата обращения: 08.12.2020).
27. Calle, E.E. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms / E.E. Calle, R. Kaaks // *Nat Rev Cancer*. – 2004. – Vol. 4, N 8. – P. 579–591.

28. Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors / A. Jögi, M. Vaapil, M. Johansson, S. Pählman // *Ups J Med Sci.* – 2012. – Vol. 117, N 2. – P. 217–224.
29. Cancer Immunotherapies Targeting Tumor-Associated Regulatory T Cells / X. Ge, Y. Zhao, C. Chen [et al.] // *Onco Targets Ther.* – 2019. – Vol. 12. – P. 11033–11044.
30. Carethers, J.M. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer / J.M. Carethers, B.H. Jung // *Gastroenterology.* – 2015. – Vol. 149, N 5. – P. 1177–1190.
31. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses / R.E. Toes, F. Ossendorp, R. Offringa, C.J. Melief // *J Exp Med.* – 1999. – Vol. 189, N 5. – P. 753–756.
32. Chang, S.H. T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer / S.H. Chang // *Arch. Pharm. Res.* – 2019. – Vol. 42. – P. 549–559.
33. Circulating Galectin-1 and 90K/Mac-2BP Correlated with the Tumor Stages of Patients with Colorectal Cancer / K.L. Wu, H.H. Chen, C.T. Pen [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 306964.
34. Circulating galectins -2, -4 and -8 in cancer patients make important contributions to the increased circulation of several cytokines and chemokines that promote angiogenesis and metastasis / C. Chen, C.A. Duckworth, B. Fu [et al.] // *Br J Cancer.* – 2014. – Vol. 110, N 3. – P. 741–752.
35. Circulating T cell subsets are associated with clinical outcome of anti-VEGF-based 1st-line treatment of metastatic colorectal cancer patients: a prospective study with focus on primary tumor sidedness / B. Bencsikova, E. Budinska, I. Selingerova [et al.] // *BMC Cancer.* – 2019. – Vol. 19, N 1. – P. 687.
36. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer / M. Tosolini, A. Kirilovsky, B. Mlecnik // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71., N 4. – P. 1263-1271.
37. Clinical significance of circulating galectins as colorectal cancer markers / M. Watanabe, I. Takemasa, N. Kaneko [et al.] // *Oncol Rep.* – 2011. – Vol. 25, N 5. – P. 1217–1226.

38. Clinicopathological and prognostic significance of galectin-1 and vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer / J. Chen, S.J. Zhou, Y. Zhang [et al.] // *World journal of gastroenterology*. – 2013. – Vol. 19, N 13. – P. 2073–2079.
39. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients / I. Iurisci, N. Tinari, C. Natoli [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2000. – Vol. 6, N 4. – P. 1389–1393.
40. Connecting blood and intratumoral Treg cell activity in predicting future relapse in breast cancer / L. Wang, D.L. Simons, X. Lu [et al.] // *Nat Immunol*. – 2019. – Vol. 20, N 9. – P. 1220–1230.
41. Cousin, J.M. Glycodendrimers: tools to explore multivalent galectin-1 interactions / J.M. Cousin, M.J. Cloninger // *Beilstein J Org Chem*. – 2015. – Vol. 11. – P. 739–747.
42. Cousin, J.M. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1 / J.M. Cousin, M.J. Cloninger // *Int J Mol Sci*. – 2016. – Vol. 17, N 9. – P. 1566.
43. Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity / G. Radosavljevic, I. Jovanovic, I. Majstorovic [et al.] // *Clin Exp Metastasis*. – 2011. – Vol. 28, N 5. – P. 451–462.
44. Díaz-Alvarez, L. The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens [Electronic resource] / L. Díaz-Alvarez, E. Ortega // *Mediators Inflamm*. – 2017. – Vol. 2017. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28607536/> (дата обращения: 08.12.2020).
45. Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression / X. Sanjuán, P.L. Fernández, A. Castells [et al.] // *Gastroenterology*. – 1997. – Vol. 113, N 6. – P. 1906–1915.
46. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death / M.A. Toscano, G.A. Bianco, J.M. Ilarregui [et al.] // *Nat Immunol*. – 2007. – Vol. 8, N 8. – P. 825–834.

47. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion / S.R. Stowell, Y. Qian, S. Karmakar [et al.] // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 180, N 5. – P. 3091–3102.
48. Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4+ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression / P. Pellegrini, A.M. Berghella, T. Del Beato [et al.] // *Cancer Immunol Immunother.* – 1996. – Vol. 42, N 1. – P. 1– 8.
49. Dissecting the mechanisms and molecules underlying the potential carcinogenicity of red and processed meat in colorectal cancer (CRC): an overview on the current state of knowledge / M. Cascella, S. Bimonte, A. Barbieri [et al.] // *Infect Agent Cancer.* – 2018. – Vol. 13. – P. 3.
50. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3 / S. Califice, V. Castronovo, M. Bracke, F. van den Brûle // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23, N 45. – P. 7527–7536.
51. Dual role of tumour-infiltrating T helper 17 cells in human colorectal cancer / F. Amicarella, M.G. Muraro, C. Hirt [et al.] // *Gut.* – 2017. – Vol. 66, N 4. – P. 692–704.
52. Early-onset colorectal cancer: initial clues and current views / L.J. Hofseth, J.R. Hebert, A. Chanda [et al.] // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2020. – Vol. 17, N 6. – P. 352–364.
53. Endogenous Galectin-1 in T Lymphocytes Regulates Anti-prostate Cancer Immunity / E. Corapi, G. Carrizo, D. Compagno, D. Laderach // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2190.
54. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis / I. Kryczek, S. Wei, W. Szeliga [et al.] // *Blood.* – 2009. – Vol. 114, N 2. – P. 357–359.
55. Facciabene, A. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis / A. Facciabene, G.T. Motz, G. Coukos // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, N. 9. – P. 2162–2171.

56. Fortuna-Costa, A. Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis / A. Fortuna-Costa, A.M. Gomes, E.O. Kozlowski [et al.] // *Front Oncol.* - 2014. - Vol. 4. - P. 138.
57. Fridman, W.H. From Cancer Immune Surveillance to Cancer Immunoediting: Birth of Modern Immuno-Oncology / W.H. Fridman // *J Immunol.* - 2018. - Vol. 201, N 3. - P. 825–826.
58. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices / G.A. Rabinovich, M.A. Toscano, S.S. Jackson, G.R. Vasta // *Curr Opin Struct Biol.* - 2007. - Vol. 17, N 5. - P. 513–520.
59. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation / V. Sundblad, I.G. Morosi, J.R. Geffner, G.A. Rabinovich // *J Immunol.* - 2017. - Vol. 199, N 11. - P. 3721–3730.
60. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells / M.I. Garín, C.C. Chu, D. Golshayan [et al.] // *Blood.* - 2007. - Vol. 109, N 5. - P. 2058–2065.
61. Galectin-1: a small protein with major functions / I. Camby, M. Le Mercier, F. Lefranc, R. Kiss // *Glycobiology.* - 2006. - Vol. 16, N 11. - P. 137–157.
62. Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin / F. van den Brûle, S. Califice, F. Garnier [et al.] // *Lab Invest.* - 2003. - Vol. 83, N 3. - P. 377–386.
63. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation / A. Paz, R. Haklai, G. Elad-Sfadia [et al.] // *Oncogene.* - 2001. - Vol. 20, N 51. - P. 7486–7493.
64. Galectin-1 dimers can scaffold Raf-effectors to increase H-ras nanoclustering / O. Blaževitš, Y.G. Mideksa, M. Šolman [et al.] // *Sci Rep.* - 2016. - Vol. 6. - P. 24165.
65. Galectin-1-driven T cell exclusion in the tumor endothelium promotes immunotherapy resistance / D.K. Nambiar, T. Aguilera, H. Cao [et al.] // *J Clin Invest.* - 2019. - Vol. 129, N 12. - P. 5553–5567.

66. Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function / C.C. Motran, K.M. Molinder, S.D. Liu [et al.] // *Eur J Immunol.* – 2008. – Vol. 38, N 11. – P. 3015–3027.
67. Galectin-1 induces cell adhesion to the extracellular matrix and apoptosis of non-adherent human colon cancer Colo201 cells / N. Horiguchi, K. Arimoto, A. Mizutani [et al.] // *J Biochem.* – 2003. – Vol. 134, N 6. – P. 869–874.
68. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction / C.D. Chung, V.P. Patel, M. Moran [et al.] // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 165, N 7. – P. 3722–3729.
69. Galectin-1 is a diagnostic marker involved in thyroid cancer progression / V. Arcolia, F. Journe, A. Wattier [et al.] // *Int J Oncol.* – 2017. – Vol. 51, N 3. – P. 760–770.
70. Galectin-1 knockdown in carcinoma-associated fibroblasts inhibits migration and invasion of human MDA-MB-231 breast cancer cells by modulating MMP-9 expression // X. Zhu, K. Wang, K. Zhang [et al.] // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2016. – Vol. 48, N 5. – P. 462–467.
71. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation / G.N. Vespa, L.A. Lewis, K.R. Kozak [et al.] // *J Immunol.* – 1999. – Vol. 162, N 2. – P. 799–806.
72. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses / M.A. Toscano, A.G. Commodaro, J.M. Ibarregui [et al.] // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 176, N 10. – P. 6323–6332.
73. Galectin-1 triggers an immunoregulatory signature in Th cells functionally defined by IL-10 expression / F. Cedeno-Laurent, M. Opperman, S.R. Barthel [et al.] // *J Immunol.* – 2012. – Vol. 188, N 7. – P. 3127–3137.
74. Galectin-3 expression is prognostic in diffuse type gastric adenocarcinoma, confers aggressive phenotype, and can be targeted by YAP1/BET inhibitors / J.A. Ajani, J.S. Estrella, Q. Chen [et al.] // *Br J Cancer.* – 2018. – Vol. 118, N 1. – P. 52–61.

75. 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.] // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 176, N 2. – P. 778–789.
76. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review) / R. Dong, M. Zhang, Q. Hu [et al.] // *Int J Mol Med.* – 2018. – Vol. 41, N 2. – P. 599–614.
77. 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 // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279, N 33. – P. 34922–34930.
78. Galectin-3 captures interferon-gamma in the tumor matrix reducing chemokine gradient production and T-cell tumor infiltration / M. Gordon-Alonso, T. Hirsch, C. Wildmann, P. van der Bruggen // *Nat Commun.* – 2017. – Vol. 8. – P. 793.
79. Galectin-3 expression in colorectal cancer: relation to invasion and metastasis / K. Tsuboi, T. Shimura, N. Masuda [et al.] // *Anticancer Res.* – 2007. – Vol. 27, N 4B. – P. 2289–2296.
80. Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer / K. Endo, S. Kohnoe, E. Tsujita [et al.] // *Anticancer Res.* – 2005. – Vol. 25, N 4. – P. 3117–3121.
81. Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia / M. Yamamoto-Sugitani, J. Kuroda, E. Ashihara [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – Vol. 108, N 42. – P. 17468-17473.
82. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse / H.Y. Chen, A. Fermin, S. Vardhana [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – Vol. 106, N 34. – P. 14496–14501
83. Galectin-3 negatively regulates the frequency and function of CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells and influences the course of *Leishmania major* infection / M.L. Fermino, F.C. Dias, C.D. Lopes [et al.] // *Eur J Immunol.* – 2013. – Vol. 43, N 7. – P. 1806–1817.

84. Galectin-3 up-regulation in hypoxic and nutrient deprived microenvironments promotes cell survival / R.Y. Ikemori, C.M. Machado, K.M. Furuzawa [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, N 11. – P. e111592.
85. Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alphaM / N. Nishi, H. Shoji, M. Seki [et al.] // *Glycobiology*. – 2003. – Vol. 13, N 11. – P. 755–763.
86. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway / Y. Kashio, K. Nakamura, M.J. Abedin [et al.] // *J Immunol*. – 2003. – Vol 170, N 7. – P. 3631-3636.
87. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis / M. Seki, S. Oomizu, K.M. Sakata [et al.] // *Clin Immunol*. – 2008. – Vol. 127, N 1. – P. 78–88.
88. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review / V.L. Thijssen, R. Heusschen, J. Caers, A.W. Griffioen // *Biochim Biophys Acta*. - 2015. – Vol. 1855, N 2. – P. 235–247.
89. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? / G.A. Rabinovich, L.G. Baum, N. Tinari [et al.] // *Trends Immunol*. – 2002. – Vol. 23, N 6. – P. 313–320.
90. Galectins as Checkpoints of the Immune System in Cancers, Their Clinical Relevance, and Implication in Clinical Trials / D. Compagno, C. Tiraboschi, J.D. Garcia [et al.] // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, N 5. – P. 750.
91. Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy / A.H. Ebrahim, Z. Alalawi, L. Mirandola [et al.] // *Ann Transl Med*. – 2014. – Vol. 2, N 9. – P. 88.
92. Genetic alterations in colorectal cancer / T. Armaghany, J.D. Wilson, Q. Chu, G. Mills // *Gastrointest Cancer Res*. – 2012. – Vol. 5, N 1. – P. 19–27.
93. Ghazarian, H. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics / H. Ghazarian, B. Idoni, S.B. Oppenheimer // *Acta Histochem*. – 2011. – Vol. 113, N 3. – P. 236–247.
94. Glioma-Associated Cancer-Initiating Cells Induce Immunosuppression / J. Wei, J. Barr, L.Y. Kong [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2010. – Vol. 16, N 2. – P. 461–473.

95. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram [et al.] // *CA Cancer J Clin.* – 2018. – Vol. 68, N 6. – P. 394–424.
96. 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, N 4. – P. 744–758.
97. Gonzalez, H. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression / H. Gonzalez, C. Hagerling, Z. Werb // *Genes Dev.* – 2018. – Vol. 32 (19-20). – P. 1267–1284.
98. Guéry, L. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity [Electronic resource] / L. Guéry, S. Hugues // *BioMed Research International.* – 2015. – Vol. 2015. – URL: hindawi.com/journals/bmri/2015/314620/ (дата обращения: 08.12.2020).
99. Hereditary and familial colon cancer / K. W. Jasperson, T.M. Tuohy, D.W. Neklason, R.W. Burt // *Gastroenterology.* – 2010. – Vol. 138. – P. 2044–2058.
100. High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion / H.J. Kim, H.K. Jeon, Y.J. Cho [et al.] // *Eur J Cancer.* – 2012. – Vol. 48, N 12. – P. 1914–1921.
101. Hsu, D.K. Galectin-3 regulates T-cell functions / D.K. Hsu, H.Y. Chen, F.T. Liu // *Immunol Rev.* – 2009. – Vol. 230, N 1. – P. 114–127.
102. Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3 / D.K. Hsu, S.R. Hammes, I. Kuwabara [et al.] // *Am J Pathol.* – 1996. – Vol. 148, N 5. – P. 1661–1670.
103. Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells / X.Y. Zhao, T.T. Chen, L. Xia [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2010. – Vol. 31, N 8. – P. 1367–1375.
104. IFN- γ orchestrates tumor elimination, tumor dormancy, tumor escape, and progression [Electronic resource] / H.F. Aqbi, M. Wallace, S. Sappal [et al.] // *J*

- Leukoc Biol. – 2018. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29469956/> (дата обращения: 08.12.2020).
105. IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer / M. Martini, M.G. Testi, M. Pasetto [et al.] // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28, N. 20. – P. 3548–3557.
106. IL6 Signaling in Peripheral Blood T Cells Predicts Clinical Outcome in Breast Cancer / L. Wang, A.K. Miyahira, D.L. Simons [et al.] // *Cancer Res*. – 2017. – Vol. 77, N 5. – P. 1119–1126.
107. Immune response modulation by Galectin-1 in a transgenic model of neuroblastoma / G. Büchel, J.H. Schulte, L. Harrison [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2016. – Vol. 5, N 5. – P. e1131378.
108. Impact of Galectins in Resistance to Anticancer Therapies / P. Navarro, N. Martínez-Bosch, A.G. Blidner, G.A. Rabinovich // *Clin Cancer Res*. – 2020. – Vol. 26, N 23. – P. 6086–6101.
109. 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, N 68. – P. 32984–32996.
110. Induced reactivity of intestinal CD4(+) T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation / A. Hokama, E. Mizoguchi, K. Sugimoto [et al.] // *Immunity*. – 2004. – Vol. 20, N 6. – P. 681–693.
111. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer / O.A. Haabeth, K.B. Lorvik, C. Hammarström [et al.] // *Nat Commun*. – 2011. – Vol. 2. – P. 240.
112. Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis / Q. Zhao, M. Barclay, J. Hilkens [et al.] // *Mol Cancer*. – 2010. – Vol. 9. – P. 154.
113. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma / F.A. Sinicrope, R.L. Rego, S.M. Ansell [et al.] // *Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 137, N 4. – P. 1270–1279.

114. Intratumoural-infiltrating CD4 + and FOXP3 + T cells as strong positive predictive markers for the prognosis of resectable colorectal cancer / T. Kuwahara, S. Hazama, N. Suzuki [et al.] // *Br J Cancer*. – 2019. – Vol. 121, N 8. – P. 659–665.
115. Itzkowitz, S.H. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation / S.H. Itzkowitz, X. Yio // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. – 2004. – Vol. 287, N 1. – P. G7–17.
116. Jess, T. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies / T. Jess, C. Rungoe, L. Peyrin-Biroulet // *Clin Gastroenterol Hepatol*. – 2012. – Vol. 10., N 6. – P. 639–45.
117. Johannes, L. Galectins at a glance / L. Johannes, R. Jacob, H. Leffler // *J Cell Sci*. – 2018. – Vol. 131, N 9. – P. jcs208884.
118. Knockdown of galectin-1 suppresses the growth and invasion of osteosarcoma cells through inhibition of the MAPK/ERK pathway / J.H. Miao, S.Q. Wang, M.H. Zhang [et al.] // *Oncol Rep*. – 2014. Vol. 32, N 4. – P. 1497–504.
119. Keum, N. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. N. Keum, E. Giovannucci // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2019. – Vol. 16, N 12. – P. 713–732.
120. Kedrin. D. Genetics of the serrated pathway to colorectal cancer / D. Kedrin. M.K. Gala // *Clin Transl Gastroenterol*. – 2015. – Vol. 6, N 4. – P. e84.
121. Kennedy, R. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses / R. Kennedy, E. Celis // *Immunol Rev*. – 2008. – Vol. 222. – P. 129–144.
122. Labrie, M. Tissue and plasma levels of galectins in patients with high grade serous ovarian carcinoma as new predictive biomarkers [Electronic resource] / M. Labrie, L.O.F. De Araujo, L. Communal [et al.] // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-13802-5#citeas> (дата обращения: 08.12.2020).
123. Liang, P.S. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis / P.S. Liang, T.Y. Chen, E. Giovannucci // *Int J Cancer*. – 2009. – Vol. 124, N 10. – P. 2406–2415.

124. Liu, F.T. Galectins as modulators of tumour progression / F.T. Liu, G.A. Rabinovich // *Nat Rev Cancer*. – 2005. – Vol. 5, N 1. – P. 29–41.
125. Lugano, R. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities / R. Lugano, M. Ramachandran, A. Dimberg [et al.] // *Cell Mol Life Sci*. – 2020.- Vol. 77, N 9. – P. 1745–1770.
126. Markowska, A.I. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response / A.I. Markowska, F.T. Liu, N. Panjwani // *J Exp Med*. – 2010. – Vol. 207, N 9. – P. 1981–1993.
127. Markowska, A.I. Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in human endothelial cells // A.I. Markowska, K.C. Jefferies, N. Panjwani // *J Biol Chem*. – 2011. – Vol. 286, N 34. – P. 29913-29921.
128. Markman, J.L. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer / J.L. Markman, S.L. Shiao // *J Gastrointest Oncol*. – 2015. – Vol. 6, N 2. – P. 208-223.
129. Massagué, J. TGFbeta in Cancer. J. Massagué // *Cell*. – 2008. – Vol. 134, N 2. – P. 215–230.
130. Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1 / F. Kovács-Sólyom, A. Blaskó, R. Fajka-Boja [et al.] // *Immunol Lett*. – 2010. – Vol. 127, N 2. – P. 108–118.
131. Méndez-Huergo, S.P. Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis / S.P. Méndez-Huergo, A.G. Blidner, G.A. Rabinovich // *Curr Opin Immunol*. – 2017. – Vol. 45, N 8. – P. 15.
132. Mojic, M. The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immune evasion / M. Mojic, K. Takeda, Y. Hayakawa // *Int J Mol Sci*. – 2017. – Vol. 19, N 1. – P. 89.
133. Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2 / G.A. Rabinovich, C.R. Alonso, C.E. Sotomayor [et al.] // *Cell Death Differ*. – 2000. – Vol 7, N 8. – P. 747–753.

134. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. J.M. Bruun, A.S. Lihn, S.B. Pedersen, B. Richelsen // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2005. – Vol. 90, N 4. – P. 2282–2289.
135. Murugaiyan, G. Protumor vs antitumor functions of IL-17 / G. Murugaiyan, B. Saha // *J Immunol.* – 2009. Vol. 183, N 7. – P. 4169–7415.
136. Nakajima, K. Galectin-3: an immune checkpoint target for musculoskeletal tumor patients / K. Nakajima, V. Balan, A. Raz // *Cancer Metastasis Rev.* – 2020. – Vol. 40, N 1. – P. 297–302.
137. Natural innate and adaptive immunity to cancer / M.D. Vesely, M.H. Kershaw, R.D. Schreiber, M.J. Smyth // *Annu Rev Immunol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 235–271.
138. Ohue, Y. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? / Y. Ohue, H. Nishikawa // *Cancer Sci.* – 2019. – Vol. 110, N 7. – P. 2080–2089.
139. Overexpression of galectin-3 enhances migration of colon cancer cells related to activation of the K-Ras-Raf-Erk1/2 pathway / K.L. Wu, E.Y. Huang, E.W. Jhu [et al.] // *J Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 48, N 3. – P. 350–359.
140. Peripheral blood lymphocytes indicate an immunosuppressive status in lung cancer [Electronic resource] / M.M.V. Membrives, A.S.P. Ramos, F.P. Garsía [et al.] // *European Respiratory Journal.* – 2015. – Vol. 46. – URL: https://erj.ersjournals.com/content/46/suppl_59/PA527 (дата обращения: 08.12.2020).
141. Precancerous colorectal lesions (Review) / V. Conteduca, D. Sansonno, S. Russi, F. Dammacco // *Int J Oncol.* – 2013. Vol. 43, N 4. – P. 973–984.
142. Predictive and prognostic value of circulating blood lymphocyte subsets in metastatic breast cancer / J. Yang, J. Xu, Y. E, T. Sun // *Cancer Med.* – 2019. – Vol. 8, N 2. – P. 492–500.
143. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes / J.L. Welton, S. Khanna, P.J. Giles [et al.] // *Mol Cell Proteomics.* – 2010. – Vol. 9, N 6. – P. 1324–1338.

144. Rabinovich, G.A. Shaping the Immune Landscape in Cancer by Galectin-Driven Regulatory Pathways / G.A. Rabinovich, J.R. Conejo-García // *J Mol Biol.* -2016. – Vol 428, N 16. – P. 3266–3281.
145. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects / C. Li, P. Jiang, S. Wei [et al.] // *Mol Cancer.* – 2020. - Vol. 19., N 1. – P. 116.
146. Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes / N. Demotte, V. Stroobant, P.J. Courtoy [et al.] // *Immunity.* – 2008. – Vol. 28, N 3. – P. 414–424.
147. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1 / K.E. Pace, C. Lee, P.L. Stewart, L.G. Baum // *J Immunol.* – 1999. Vol. 163, N 7. – P. 3801–3811.
148. Role of galectins in lung cancer / W.A. Chang, M.J. Tsai, P.L. Kuo, J.Y. Hung // *Oncol Lett.* – 2017. – Vol. 14, N 5. – P. 5077–5084.
149. Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy / F.C. Chou, H.Y. Chen, C.C. Kuo, H.K. Sytwu // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19, N 2. – P. 430.
150. Role of TH17 cytokines in the control of colorectal cancer // V. De Simone, F. Pallone, G. Monteleone, C. Stolfi // *Oncoimmunology.* – 2013. – Vol. 2, N 12. – P. e26617.
151. Rubinstein, N. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege / N. Rubinstein, M. Alvarez, N.W. Zwirner [et al.] // *Cancer Cell.* – 2004. – Vol. 5, N 3. – P. 241–251.
152. Seidel, J.A. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations / J.A. Seidel, A. Otsuka, K. Kabashima // *Front Oncol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 86.
153. Seoane, J. Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control / J. Seoane // *Carcinogenesis.* – 2006. – Vol. 27, N 11. – P. 2148–2156.

154. Seoane, J. TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression / J. Seoane, R.R. Gomis // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2017. – Vol. 9, N 12. – P. a022277.
155. Serum galectin-2, -4, and -8 are greatly increased in colon and breast cancer patients and promote cancer cell adhesion to blood vascular endothelium / H. Barrow, X. Guo, H.H. Wandall [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17, N 22. – P. 7035–7046.
156. Serum levels of galectin-3 and its ligand 90k/mac-2bp in colorectal cancer patients / P.A. Iacovazzi, M. Notarnicola, M.G. Caruso [et al.] // *Immunopharmacol Immunotoxicol.* – 2010. – Vol. 32, N 1. – P. 160–164.
157. Sharon, N. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules / N. Sharon, H. Lis // *Glycobiology.* – 2004. – Vol. 14, N 11. – P. 53–62.
158. Smyth, M.J. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity / M.J. Smyth, G.P. Dunn, R.D. Schreiber // *Adv Immunol.* – 2006. – Vol. 90. – P. 1–50.
159. Spurrell, E.L. Adaptive immunity in cancer immunology and therapeutics / E.L. Spurrell, M. Lockley // *Ecancermedicalsecience.* – 2014. – Vol. 8. – P. 441.
160. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes / K. Samaras, N.K. Botelho, D.J. Chisholm, R.V. Lord // *Obesity (Silver Spring).* – 2010. – Vol. 18, N 5. – P. 884–889.
161. Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression / M.R. Girotti, M. Salatino, T. Dalotto-Moreno, G.A. Rabinovich // *J Exp Med.* – 2020. – Vol. 217, N 2. – P. e20182041.
162. Tang, D. High expression of Galectin-1 in pancreatic stellate cells plays a role in the development and maintenance of an immunosuppressive microenvironment in pancreatic cancer / D. Tang, Z. Yuan, X. Xue [et al.] // *Int J Cancer.* – 2012. – Vol. 130, N 10. – P. 2337–2348.

163. Targeting galectin-1 inhibits pancreatic cancer progression by modulating tumor-stroma crosstalk / C.A. Orozco, N. Martinez-Bosch, P.E. Guerrero [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2018. Vol. 115, N 16. – P. 3769–3778.
164. Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease / T. Dalotto-Moreno, D.O. Croci, J.P. Cerliani [et al.] // Cancer Res. – 2013. – Vol. 73, N 3. – P. 1107–1117.
165. Tay, R.E. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy –new insights into old paradigms / R.E. Tay, E.K. Richardson, H.C. Toh // Cancer Gene Ther. – 2020. – Vol. 28, N. 1-2. – P. 5–17.
166. T Cell Dysfunction in Cancer Immunity and Immunotherapy / A. Xia, Y. Zhang, J. Xu [et al.] // Front Immunol. – 2019. – Vol. 10. – P. 1719.
167. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma / P. Juszczynski, J. Ouyang, S. Monti [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – Vol. 104, N 32. – P. 13134–13139.
168. The clinical importance of serum galectin-3 levels in breast cancer patients with and without metastasis / T.O. Topcu, H. Kavgaci, M. Gunaldi [et al.] // J Cancer Res Ther. – 2018. – Vol. 14. – P. 583–586.
169. The frequency of Th17 and Th22 cells in patients with colorectal cancer at pre-operation and post-operation / L. Ling, P. Zhao, G. Yan [et al.] // G, Immunol Invest. – 2015. – Vol. 44, N 1. – P. 56–69.
170. The infiltration, and prognostic importance, of Th1 lymphocytes vary in molecular subgroups of colorectal cancer / A. Ling, I.V. Lundberg, V. Eklöf [et al.] // J Pathol Clin Res. – 2015. – Vol. 2, N 1. – P. 21–31.
171. The Role of Galectins in Tumor Progression, Treatment and Prognosis of Gynecological Cancers / M. Chetry, S. Thapa, X. Hu [et al.] // J Cancer. – 2018. – Vol. 9, N 24. – P. 4742–4755.
172. The role of heme iron molecules derived from red and processed meat in the pathogenesis of colorectal carcinoma / S.M.K. Gamage, L. Dissabandara, A.K.Y. Lam, V. Gopalan // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2018. – Vol. 126. – P. 121–128.

173. The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design / C.P. Modenutti, J.I.B. Capurro, S. Di Lella, M.A. Martí // *Front Chem.* – 2019. – Vol. 7. – P. 823.
174. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity / C. Zhu, A.C. Anderson, A. Schubart [et al.] // *Nat Immunol.* – 2005. – Vol. 6, N 12. – P. 1245-1252.
175. Thiemann, S. Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do? / S. Thiemann, L.G. Baum // *Annu Rev Immunol.* – 2016. – Vol. 20, N 34. – P. 243–264.
176. Thijssen, V.L. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells / V.L. Thijssen, S. Hulsmans, A.W. Griffioen // *Am J Pathol.* – 2008. – Vol. 172, N 2. – P. 545–453.
177. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells / W. Peng, H.Y. Wang, Y. Miyahara [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, N 17. – P. 7228–7236.
178. Tumor biology and cancer therapy - an evolving relationship / T. Seufferlein, J. Ahn, D. Krndija [et al.] // *Cell Commun Signal.* – 2009. – Vol. 7. – P. 19.
179. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity / V.L. Thijssen, B. Barkan, H. Shoji [et al.] // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70, N 15. – P. 6216–6224.
180. Tumor galectin-1 mediates tumor growth and metastasis through regulation of T-cell apoptosis / A. Banh, J. Zhang, H. Cao [et al.] // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71, N 13. – P. 4423–4431.
181. 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.] // *Int J Cancer.* – 2003. – Vol. 103, N 3. – P. 370–379.
182. van den Brûle, F. Expression of galectins in cancer: a critical review / F. van den Brûle, S. Califice, V. Castronovo // *Glycoconj J.* – 2002. – Vol. 19(7-9). – P. 537–542.

183. Vladoiu, M.C. Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy (Review) / M.C. Vladoiu, M. Labrie, Y. St-Pierre // *Int J Oncol.* – 2014. – Vol. 44, N 4. – P. 1001–1014.
184. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again / S. Di Lella, V. Sundblad, J.P. Cerliani [et al.] // *Biochemistry.* – 2011. – Vol. 50, N 37. – P. 7842–7857.
185. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Expert Report 2018. Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer [Electronic resource]. URL: dietandcancerreport.org (дата обращения: 08.12.2020).
186. Yang, R.Y. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis / R.Y. Yang, D.K. Hsu, F.T. Liu // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. – Vol. 93, N 13. – P. 6737–6742.
187. Yang, R.Y. Galectins: structure, function and therapeutic potential / R.Y. Yang, G.A. Rabinovich, F.T. Liu // *Expert Rev Mol Med.* – 2008. – Vol. 10. – P. e17.
188. Yu, L.G. Circulating galectin-3 in the bloodstream: An emerging promoter of cancer metastasis / L.G. Yu // *World J Gastrointest Oncol.* – 2010. – Vol. 2, N 4. – P. 177–180.
189. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity / C. Zhu, A.C. Anderson, A. Schubart [et al.] // *Nat Immunol.* – 2005. – Vol. 6, N 12. – P. 1245-1252.