

CD11b+ миелоидные клетки селезенки при карциномах

Е.С. Андрюхова¹, Л.А. Таширева¹, С.В. Вторушин^{1,2}, С.Г. Афанасьев¹,
А.В. Августинович¹, М.В. Завьялова^{1,2}, В.М. Перельмутер¹

¹ ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Научно-исследовательский институт онкологии, Томск, Россия

² ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

Резюме. Введение. Миелоидные элементы селезенки представлены моноцитами и миелоидными супрессорными клетками, которые депонируются в ней и рекрутируются в очаги хронического воспаления, участки репаративной регенерации ткани и в микроокружение опухолей. Изучение роли селезенки в развитии злокачественных опухолей и их прогрессии ограничивается экспериментами *in vivo* и исследованиями групп пациентов со спленэктомией. Важными, не изученными к настоящему моменту аспектами являются характеристика миелоидных элементов, имеющих общий маркер CD11b, располагающихся в разных морфофункциональных зонах селезенки, и их ассоциация с метастазированием. Цель исследования – сравнение количества и фенотипических особенностей CD11b+ миелоидных клеток, учитывая их локализацию в разных морфофункциональных зонах селезенки, в когортах пациентов без злокачественного новообразования и с таковым, а также в зависимости от гематогенного и лимфогенного метастазирования у пациентов с карциномами разных локализаций. **Материалы и методы.** Исследована удаленная в ходе хирургического лечения селезенка 35 пациентов с карциномами различных локализаций и восьми пациентов без опухолевых и острых воспалительных процессов, составивших группу сравнения. Для оценки количества CD11b+ клеток с разными вариантами экспрессии CD45, CD34 и CD90 использовался метод TSA – модифицированного многоцветного иммунофлуоресцентного окрашивания. В обеих группах количество клеток каждого фенотипа рассчитывалось на 1 мм² площади фолликулярной, маргинальной зон и красной пульпы селезенки. В группе пациентов со злокачественными новообразованиями изучена ассоциация количества клеток с лимфогенным и гематогенным метастазированием.

Результаты. Популяция CD11b+ миелоидных клеток селезенки гетерогенна, представлена клетками разных стадий дифференцировки моноцитов/MDSC, количество которых преобладает в красной пульпе. Наличие карцином разных нозологических форм ассоциировано с увеличением в красной пульпе промоноцитов (в 17 раз) и уменьшением числа клеток-предшественников миелопоэза в маргинальной зоне (в 2 раза), незрелых моноцитоподобных клеток/монобластов в маргинальной зоне (в 5 раз) и красной пульпе селезенки (в 12,5 раза). При наличии лимфогенных метастазов количество CD11b+ миелоидных клеток с такими фенотипами уменьшалось в еще большей степени. Ассоциация количества CD11b+ миелоидных клеток с гематогенным метастазированием не обнаружена.

Заключение. Количество CD11b+ миелоидных клеток разных фенотипов в различных морфофункциональных зонах селезенки ассоциировано с развитием у пациентов карцином независимо от их нозологической принадлежности и связано с лимфогенным метастазированием.

Ключевые слова: селезенка, миелоидные клетки, CD11b, карциномы, метастазирование

Для корреспонденции: Елена Сергеевна Андрюхова. E-mail: elenasergeevna9607@gmail.com

Для цитирования: Андрюхова Е.С., Таширева Л.А., Вторушин С.В., Афанасьев С.Г., Августинович А.В., Завьялова М.В., Перельмутер В.М. CD11b+ миелоидные клетки селезенки при карциномах. Клини. эксп. морфология. 2024;13(2):26–35. DOI: 10.31088/CEM2024.13.2.26-35.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-15-00135.

Статья поступила 28.07.2023. Получена после рецензирования 21.08.2023. Принята в печать 20.11.2023.

CD11b+ splenic myeloid cells in carcinoma patients

E.S. Andryukhova¹, L.A. Tashireva¹, S.V. Vtorushin^{1,2}, S.G. Afanasyev¹,
A.V. Augustinovich¹, M.V. Zavyalova^{1,2}, V.M. Perelmuter¹

¹ Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Cancer Research Institute, Tomsk, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Abstract. Introduction. Splenic myeloid cells include monocytes and myeloid suppressor cells, which are deposited in the spleen and recruited to the sites of chronic inflammation, reparative tissues, and tumor

microenvironment. *In vivo* experiments are mainly used to study the influence of the splenic system on the development and progression of the malignant neoplasm. The characteristics of myeloid elements with a common marker (CD11b) that are located in different splenic morphological and functional zones and their relation to metastases are still poorly studied. We aimed to compare the number and phenotypic features of CD11b⁺ myeloid cells considering their location in different splenic structural and functional areas in cohorts of patients with and without a malignant neoplasm, as well as depending on hematogenous and lymphogenous metastases in patients with carcinomas of various locations.

Materials and methods. To estimate the number of CD11b⁺ cells with different variants of CD45, CD34, and CD90 expression, we applied the TSA technique. The number of cells of each phenotype per 1 mm² of follicular, marginal, and red pulp areas was calculated in both groups. The association of cell number with lymphogenic and distant metastases was investigated in the group of patients with malignant neoplasms.

Results. The CD11b⁺ myeloid cell population is heterogeneous and represented by cells at different stages of monocyte/MDSC differentiation, whose numbers predominate in the red pulp. The following changes are associated with carcinomas: a 17-fold increase in the number of promonocytes in the red pulp, a 2-fold decrease in the number of myelopoiesis progenitors in the marginal zone, and a reduction in the quantity of immature monocytoid cells/monoblasts in the marginal zone and the red pulp (5- and 12.5-fold, respectively). The number of CD11b⁺ myeloid cells with such phenotypes decreased even more in the cases with lymphogenic metastases. No association was found with distant metastases.

Conclusion. The number of CD11b⁺ splenic myeloid cells is associated with carcinomas and lymphogenic metastases.

Keywords: spleen, myeloid cells, CD11b, carcinomas, metastasis

Corresponding author: Elena S. Andryukhova. E-mail: elenasergeevna9607@gmail.com

For citation: Andryukhova E.S., Tashireva L.A., Vtorushin S.V., Afanasyev S.G., Avgustinovich A.V., Zavyalova M.V., Perelmutter V.M. CD11b⁺ splenic myeloid cells in carcinoma patients. *Clin. exp. morphol.* 2024;13(2):26–35 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.2.26-35.

Funding. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 23-15-00135.

Received 28.07.2023. **Received in revised form** 21.08.2023. **Accepted** 20.11.2023.

Введение

Моноциты, макрофаги и миелоидные клетки-супрессоры составляют гетерогенную популяцию миелоидных клеток селезенки. Рекрутирование миелоидных клеток из селезенки закономерно происходит в очаги хронического воспаления, участки репаративной регенерации ткани и в микроокружение опухолей [1, 2]. CD11b обнаруживается на большинстве миелоидных клеток, включая макрофаги, моноциты, миелоидные клетки-супрессоры, нейтрофилы и некоторые субпопуляции дендритных клеток. CD11b представляет собой субъединицу интегрин альфа-M (α M CD11bCD18), которая является альфа-субъединицей гетеродимера α M β 2. Данный интегрин служит рецептором для фибриногена и для молекулы адгезии эндотелия ICAM-1. CD11b опосредует клеточную адгезию, хемотаксис, миграцию, фагоцитарную активность миелоидных клеток. CD11b ингибирует инициированные через толл-подобные рецепторы воспалительные реакции как *in vitro*, так и *in vivo* [3]. Миелоидные клетки, экспрессирующие CD11b, главной функцией которых является иммуносупрессия [4], объединяют термином myeloid-derived suppressor cells (MDSC). Они представляют собой гетерогенную популяцию миелоидных элементов на разных стадиях дифференцировки [5]. Выделяют две популяции MDSC с разными механизмами иммуносупрессии. PMN-MDSC (Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells) производят высокие уровни

активных форм кислорода и малое количество оксида азота, тогда как M-MDSC (Mononuclear myeloid-derived suppressor cells) имеют высокий уровень оксида азота, но низкие уровни активных форм кислорода. Обе популяции экспрессируют иммуносупрессивный фермент аргиназу-1 [6]. Полный спектр подавляющих функций MDSCs могут приобрести не в селезенке, а при рекрутировании в очаги воспаления [7].

Еще один механизм супрессии реализуется через способность MDSC рекрутировать T-регуляторные лимфоциты в опухоль зависимым от CCR5 механизмом и индуцировать их дифференцировку или пролиферацию с использованием различных механизмов, включая трансформирующий фактор роста бета [8, 9]. Эта способность индуцировать регуляторные T-лимфоциты свойственна только субпопуляции M-MDSC [10]. MDSC накапливаются в очагах воспаления и опухолях и блокируют функции иммунных клеток, ингибируя эффекторные функции T-клеток [11]. Циркулирующие MDSC накапливаются в субкапсулярной зоне красной пульпы селезенки, которая представляет собой депо для этих клеток. Следует отметить, что практически не изучено значение расположения CD11b⁺ миелоидных клеток в разных морфофункциональных зонах селезенки. Накопление MDSC в карциномах происходит благодаря секреции опухолевыми клетками хемокинов семейств CCL и CXCL [12]. Селезенка у пациентов с карциномами является источником большого

количества MDSCs, обладающих способностью подавлять ответы Т-клеток [13].

Целью исследования было сравнение количества и фенотипических особенностей CD11b+ миелоидных клеток, учитывая их локализацию в разных морфофункциональных зонах селезенки, в когортах пациентов без злокачественного новообразования и с таковым, а также в зависимости от гематогенного и лимфогенного метастазирования у пациентов с карциномами разных локализаций.

Материалы и методы

В исследование были включены 35 пациентов с установленным диагнозом рака желудка, кардиоэзофагеального перехода, рака поджелудочной железы, селезеночного угла толстой кишки, сигмовидной кишки, почки, яичника и матки. Пациентам в ходе хирургического этапа лечения была выполнена спленэктомия в связи с распространенностью процесса или интраоперационной травмой селезенки. Нозологическую принадлежность карцином устанавливали на основании стандартных клинических, морфологических и иммуногистохимических критериев. Неoadьювантную химиотерапию пациенты не получали, адьювантная химиотерапия назначалась по показаниям. Средний возраст составил $59,97 \pm 8,84$ года, стадии процессов T1–4N0–3M0–1, у 66% пациентов были обнаружены лимфогенные метастазы, у 28% гематогенные метастазы.

В группу сравнения включены восемь пациентов, средний возраст которых составил $58,13 \pm 7,14$ года. Им была проведена спленэктомия, не связанная со злокачественными новообразованиями или воспалительными процессами. Также по показаниям была выполнена спленэктомия у пациентов с кистой селезенки, кистой левой почки, хроническим панкреатитом, язвой желудка вне обострения, язвенной болезнью с декомпенсированным рубцовым стенозом двенадцатиперстной кишки и аневризмой селезеночной артерии. Критериями исключения пациентов из группы сравнения стали кровотечения, анемии любого генеза, инфекционные и аутоиммунные заболевания. Все этапы исследования одобрены локальным этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 11 от 10.04.2023).

Материалом исследования послужили фиксированные формалином и залитые в парафин срезы селезенки. Метод мультиплексной тирамидной амплификации сигнала (tyramide signal amplification, TSA) – модифицированной иммуногистохимии срезов ткани позволил идентифицировать и подсчитать CD11b+ миелоидные клетки селезенки. С помощью иммуноштейнера BOND RXm (Leica Biosystems, Германия) были проведены автоматическая депарафинизация, демаскировка и окрашивание ткани. Для окрашивания ткани использованы первичные антитела anti-CD45 Leucocyte Common Antigen (clones: 2B11, Dako, США, 1:10), anti-CD34 (clone: QVEnd, Dako, США, 1:10),

anti-CD90 (clone EPR3133, Abcam, США, 1:300), anti-CD11b (clone EPR1344, Abcam, США, 1:1000), anti-pan-CK (clone AE1AE3, Dako, США, 1:50) и набор Opal 6-color Automation IHC Kit (Akoya Bioscience, США). Для окрашивания ядер применяли ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, США).

Окрашенные срезы селезенки сканировали при $\times 200$ с использованием автоматизированной системы для мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа Vectra 3.0.3 (PerkinElmer, США) и изучали с помощью программного обеспечения для анализа изображений InForm (PerkinElmer, v2.4.2, США). Проводили сегментацию тканей, сегментацию клеток, фенотипирование клеток и оценку количества клеток с коэкспрессией искомым маркерам, подсчет клеток различных фенотипов.

Оценивались частота встречаемости и количество различных фенотипов CD11b+ клеток в фолликулах, маргинальной зоне и красной пульпе. Количество клеток рассчитывалось на 1 мм^2 площади каждой морфофункциональной зоны. Сочетание различных вариантов коэкспрессии CD45, CD34 и CD11b можно наблюдать на разных стадиях моноцитопоза [14] в макрофагах, а также в MDSC [15]. CD90 экспрессируется в гемопоэтических стволовых клетках [16] и, следовательно, может быть выявлен в незрелых CD11b+ миелоидных клетках. Обнаружено четыре фенотипа моноклеарных клеток с экспрессией CD11b. В силу высокой функциональной/фенотипической пластичности клеток каждый из выявленных фенотипов CD11b+ клеток не соответствовал строго ни одной из стадий моноцитопоза по С. Lambert et al. (2017) [14]. Четыре фенотипа клеток в нашем исследовании можно отнести к моноцитам/макрофагам разной степени зрелости или MDSC. Типы CD11b+ миелоидных клеток, выявленных в селезенке (рис. 1 А, В), приведены в таблице 1.

Сравнение количества клеток исследуемых фенотипов в зависимости от наличия или отсутствия гематогенных метастазов проводили у пациентов с карциномами, находившихся под наблюдением в течение 3–12 лет.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью GraphPad Prism 8.3.1 (GraphPad Software, США). Исследуемые параметры не подчинялись нормальному закону распределения и были описаны с помощью медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q1–Q3). Оценку различий параметров между двумя независимыми выборками осуществляли при помощи критерия Манна–Уитни; для оценки различий между двумя зависимыми группами был использован Т-критерий Уилкоксона. Для оценки различий частот встречаемости признаков использовали точный критерий Фишера. ROC-анализ использовали для оценки прогностической ценности параметров. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (5%).

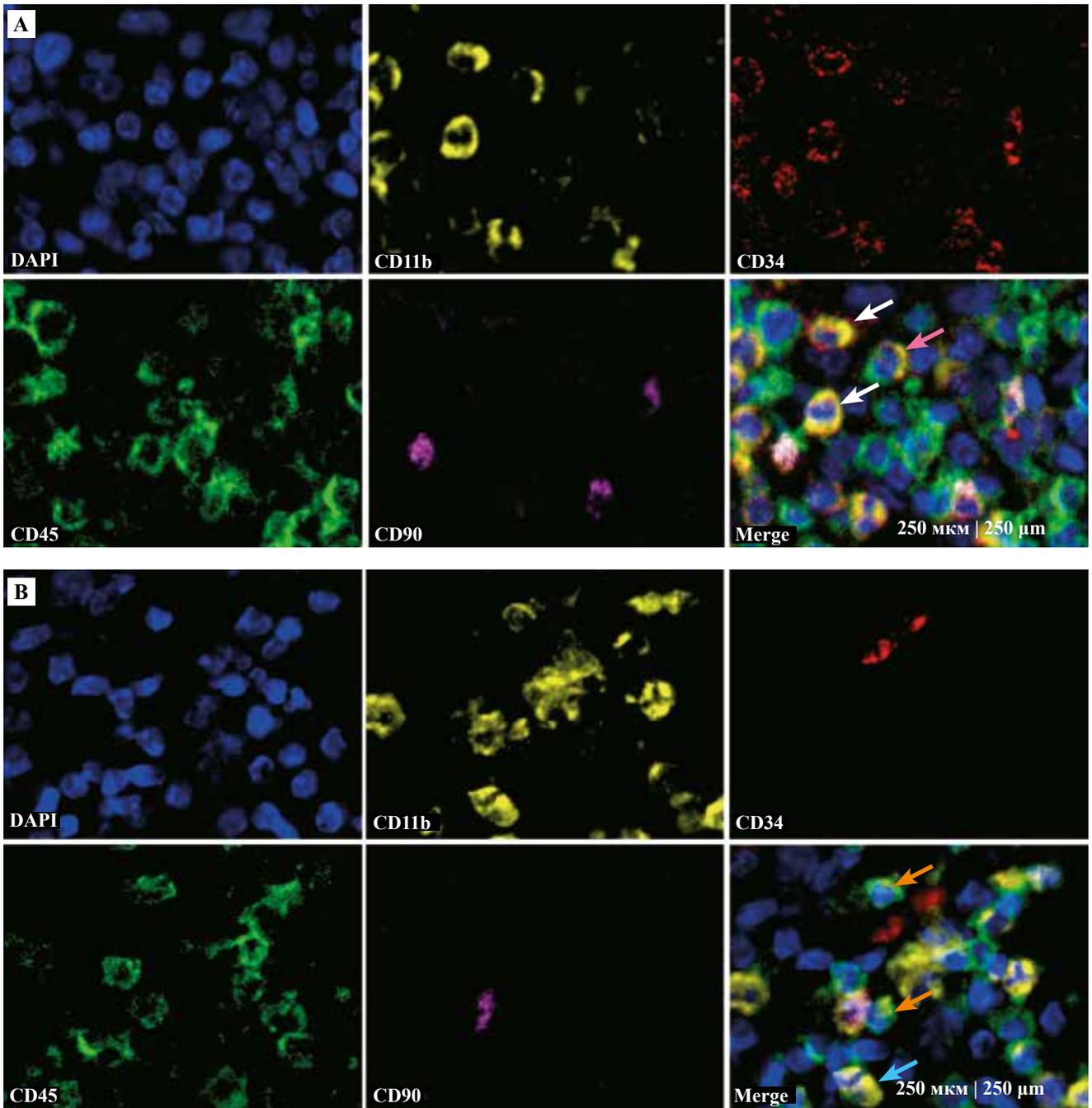


Рис. 1. TSA – модифицированное многоцветное иммунофлуоресцентное окрашивание красной пульпы селезенки.

А: белые стрелки – CD45–CD90–CD34+CD11b+ (№ 1), розовая стрелка – CD45+CD90–CD34+CD11b+ (№ 2).

В: оранжевые стрелки – CD45+CD90–CD34–CD11b+ (№ 3), голубая стрелка – CD45–CD90–CD34–CD11b+ (№ 4)

Fig. 1. TSA-modified multicolor immunofluorescence staining of the red pulp. A: CD45–CD90–CD34+CD11b+ (No. 1, white arrows), CD45+CD90–CD34+CD11b+ (No. 2, pink arrow) B: CD45+CD90–CD34–CD11b+ (No. 3, orange arrows), CD45–CD90–CD34–CD11b+ (No. 4, blue arrow)

Результаты

Общей закономерностью распределения CD11b+ миелоидных клеток в селезенке пациентов с карциномами являлось их максимальное количество в красной пульпе, промежуточное в маргинальной зоне и наименьшее в лимфоидных фолликулах. Различия количества CD45–CD90–CD34+CD11b+ (№ 1) и CD45–CD90–CD34–CD11b+ (№ 4) клеток были значимыми между

всеми морфофункциональными зонами. Количество CD45+CD90–CD34+CD11b+ (№ 2) и CD45+CD90–CD34–CD11b+ (№ 3) клеток было больше в красной пульпе по сравнению с их количеством в маргинальной зоне и лимфоидных фолликулах. В группе сравнения различия в количестве исследуемых клеток в разных морфофункциональных зонах были менее выражены. Отмечены только различия количества

CD45⁺CD90⁺CD34⁺CD11b⁺ (№ 1) клеток между всеми морфофункциональными зонами (рис. 2).

Опухолевые процессы в исследованных случаях сопровождаются изменением количественных характеристик клеток, экспрессирующих CD11b. Различия

касаются трех фенотипов (табл. 2). В селезенке при наличии опухолевого процесса у пациентов было значительно меньше клеток с фенотипом предшественников моноцитов с признаками созревания (№ 1) в лимфоидном фолликуле и маргинальной зоне. Кроме того,

Таблица 1 | Table 1

Фенотипы CD11b⁺ миелоидных клеток в селезенке | Phenotypes of CD11b⁺ myeloid cells in the spleen

Фенотип Phenotype	Типы клеток, в которых может наблюдаться данный экспрессионный профиль Cell types in which this expression profile can be observed	Источники литературы Reference
CD45 ⁺ CD90 ⁺ CD34 ⁺ CD11b ⁺ (№ 1)	Предшественник моноцитов с признаками созревания Monocyte precursor with signs of maturation	[14]
CD45 ⁺ CD90 ⁺ CD34 ⁺ CD11b ⁺ (№ 2)	Незрелая моноцитоподобная клетка/монобласт с признаками созревания или незрелая MDSC Immature monocytoïd cell/monoblast with signs of maturation or immature MDSC	[14, 15]
CD45 ⁺ CD90 ⁺ CD34 ⁺ CD11b ⁺ (№ 3)	Промоноцит, моноцит, макрофаг или зрелая MDSC Promonocyte, monocyte, macrophage, or mature MDSC	[14, 15]
CD45 ⁺ CD90 ⁺ CD34 ⁺ CD11b ⁺ (№ 4)	Промоноцит с сохранением признаков незрелости (с отсутствием экспрессии CD45) Promonocyte with retained signs of immaturity (no CD45 expression)	[14]

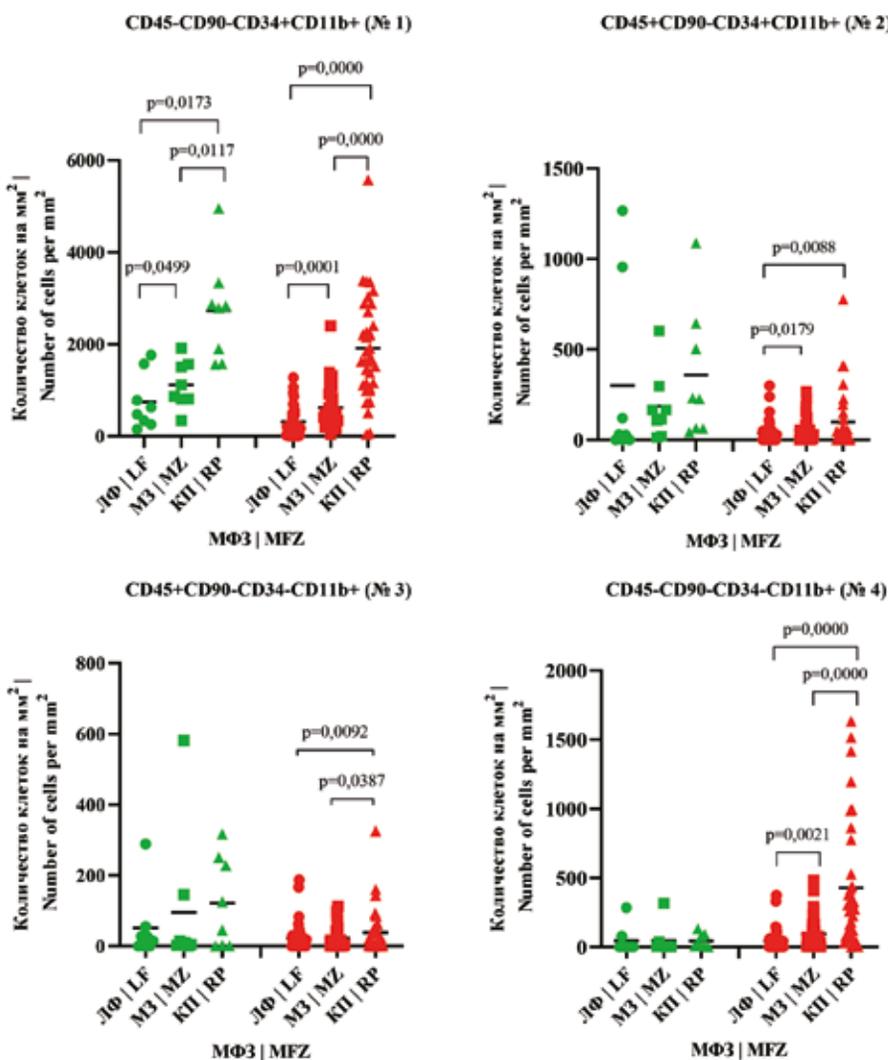


Рис. 2. Количество CD11b⁺ клеток разных фенотипов в разных морфофункциональных зонах селезенки в группах «контроль» (зеленый цвет) и «карциномы» (красный цвет). МФЗ – морфофункциональная зона, ЛФ – лимфоидный фолликул, МЗ – маргинальная зона, КП – красная пульпа

Fig. 2. The number of CD11b⁺ cells of different phenotypes in different morphofunctional zones of the spleen in the “control” (green) and “carcinoma” (red) groups MFZ – morphological and functional zone, LF – lymphoid follicle, MZ – marginal zone, RP – red pulp

Таблица 2 | Table 2

Изменения количества CD11b+ клеток в разных морфологических зонах селезенки при карциномах (на 1 мм²) |
The changes in the number of CD11b+ cells in different morphological zones of the spleen in carcinomas (per 1 mm²)

Фенотип Phenotype	МФЗ MFZ	Контроль (n=8) Control (n=8)	Опухоль (n=35) Tumor (n=35)	Результаты ROC-анализа ROC analysis results
CD45–CD90– CD34+CD11b+ (№ 1)	1	556,3 (298,9–1180,4)	199,9 (50,6–472,3) p=0,016	–
	2	2817,8 (1742,1–3106,5)	1689,7 (1114,6–2714,5) p=0,102	–
	3	992,8 (808,7–1537,3)	499,9 (272,7–917,3) p=0,012	0,782 (ДИ 95% 0,617–0,947), p=0,014, Cut off <790,4, Se 71,43%, Sp 87,50%
CD45+CD90– CD34+CD11b+ (№ 2)	2	230,9 (63,9–574,6)	18,5 (2,5–114,9) p=0,003	0,83 (ДИ 95% 0,702–0,962), p=0,004, Cut off <62,3, Se 68,57%, Sp 87,5%
	3	141,1 (64,9–231,9)	29,5 (0,0–75,8) p=0,009	0,793 (ДИ 95% 0,627–0,959), p=0,011, Cut off <97,40, Se 80,00%, Sp 75,0%
CD45+CD90–CD34– CD11b+ (№ 3)	2	85,8 (1,9–239,7)	11,79 (1,5–49,9) p=0,211	–
	3	7,1 (3,1–80,4)	4,8 (0,0–39,3) p=0,381	–
CD45–CD90–CD34– CD11b+ (№ 4)	2	17,2 (6,9–87,8)	289,8 (77,9–527,9) p=0,001	0,866 (ДИ 95% 0,754–0,978), p=0,001, Cut off >133,3, Se 71,40%, Sp 100,0%
	3	4,0 (1,0–21,7)	41,1 (2,7–146,9) p=0,141	–

МФЗ – морфофункциональная зона, 1 – лимфоидный фолликул, 2 – красная пульпа, 3 – маргинальная зона,

Se – чувствительность, Sp – специфичность

MFZ – morphological and functional zone, 1 – lymphoid follicle, 2 – red pulp, 3 – marginal zone, Se – sensitivity, Sp – specificity,

ДИ – confidence interval

в маргинальной зоне и красной пульпе уменьшено количество незрелых моноцитоидных клеток/монобластов с признаками созревания (или незрелых MDSC) (№ 2). Вместе с тем в красной пульпе значимо (в 17 раз) увеличено количество предшественников моноцитов с признаками созревания (№ 4).

Значимость ассоциации количества исследованных фенотипов CD11b+ клеток селезенки с развитием карцином подтверждена результатами ROC-анализа (табл. 2).

Наличие гематогенных метастазов никак не отражалось на количестве клеток с изучаемыми фенотипами в красной пульпе и маргинальной зоне селезенки.

В отличие от гематогенного метастазирования наличие синхронных лимфогенных метастазов сочеталось с меньшим количеством в красной пульпе предшественников моноцитов с признаками созревания (CD45–CD90–CD34+CD11b+[№ 1]) и незрелых MDSC (CD45+CD90–CD34+CD11b+[№ 2]) (табл. 3).

Результаты ROC-анализа подтверждают связь предшественников моноцитов с признаками созревания CD45–CD90–CD34+CD11b+ (1) и незрелых MDSC с фенотипом CD45+CD90–CD34+CD11b+ (2) с на-

личием лимфогенных метастазов, выявленных на период проведения операции. Пороговое значение для CD45–CD90–CD34+CD11b+ клеток составило меньше 1629 клеток на 1 мм² (площадь под кривой 0,772 (ДИ 95% 0,551–0,993), p=0,049, чувствительность 63,16%, специфичность 83,33%), для CD45+CD90–CD34+CD11b+ клеток меньше 42,3 клетки на 1 мм² (площадь под кривой 0,772 (ДИ 95% 0,554–0,990), p=0,049, чувствительность 68,4%, специфичность 83,33%) (рис. 3).

Обсуждение

Обнаруженные нами в селезенке четыре фенотипа CD11b+ мононуклеарных миелоидных клеток можно рассматривать как отражение разных этапов дифференцировки моноцитов/MDSC. Вместе с тем сопоставление фенотипов со схемами моноцитопозеза, например по С. Lambert et al. [14], показывает множество несовпадений. Это касается экспрессии интегрин CD11b, которая должна происходить только на стадии промоноцита-моноцита, однако в нашем наблюдении он коэкспрессируется с маркером стволовости CD34, экспрессия которого прекращается именно на этих стадиях.

Изменения количества CD11b+ клеток в разных морфологических зонах селезенки при лимфогенном метастазировании карцином (на 1 мм²) | The changes in the number of CD11b+ cells in different morphological zones of the spleen in carcinomas with lymphogenic metastases (per 1 mm²)

Фенотип Phenotype	МФЗ MFZ	Отсутствие лимфогенных метастазов, n=11 No lymphogenic metastases, n=11	Наличие лимфогенных метастазов, n=22 Presence of lymphogenic metastases, n=22
CD45-CD90- CD34+CD11b+ (№ 1)	1	2232,8 (1631,7-3358,4)	1573,5 (1048,6-2213,0) p=0,048
	2	354,1 (314,2-966,1)	540,8 (227,3-917,2) p=0,866
CD45+CD90- CD34+CD11b+ (№ 2)	1	64,8 (6,2-407,9)	15,8 (1,2-61,6) p=0,040
	2	49,0 (5,4-84,9)	9,9 (0,0-75,7) p=0,317
CD45+CD90-CD34- CD11b+ (№ 3)	1	2,5 (1,5-52,7)	12,6 (3,6-49,8) p=0,560
	2	4,7 (0,0-43,8)	5,5 (0,0-39,2) p=0,925
CD45-CD90-CD34- CD11b+ (№ 4)	1	180,9 (56,5-354,5)	302,5 (121,5-527,9) p=0,510
	2	43,0 (2,7-163,5)	58,4 (12,0-146,9) p=0,778

МФЗ – морфофункциональная зона, 1 – красная пульпа, 2 – маргинальная зона
MFZ – morpho-functional zone, 1 – red pulp, 2 – marginal zone

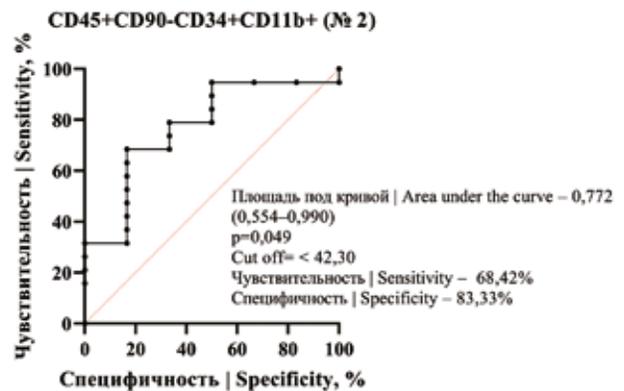
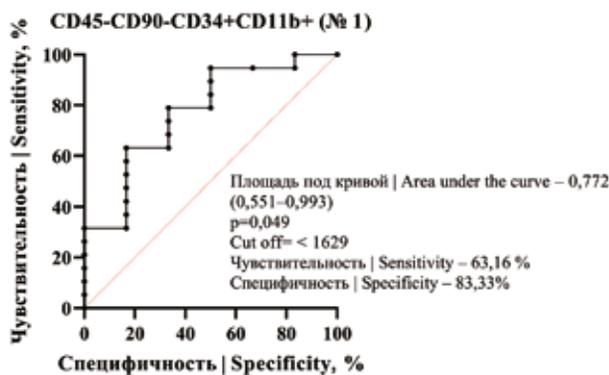


Рис. 3. Кривые значимости связи количества клеток указанных фенотипов в красной пульпе селезенки с наличием синхронных лимфогенных метастазов при карциномах разного нозологического профиля

Fig. 3. Significance curves of the relationship between the number of cells of the indicated phenotypes in the red pulp and the presence of synchronous lymphogenic metastases in carcinomas of different nosological profile

Другое несовпадение – сочетание экспрессии CD11b с отсутствием экспрессии CD45, которая, наоборот, должна сочетаться с экспрессией CD45. По-видимому, описанные несовпадения являются отражением более сложного механизма дифференцировки незрелых клеток миелоидного ряда, при которой на определенных этапах может совмещаться экспрессия маркеров незрелых и зрелых моноцитов/MDSC. Вероятно, данный процесс не является линейным, и использованная нами

панель маркеров позволила выявлять клетки на промежуточных стадиях созревания.

Известно, что развитие злокачественных опухолей происходит на фоне стимуляции миелопоэза, который способствует росту опухоли, причем селезенка опосредует такой ответ гемопоэтических клеток [17, 18]. Селезенка представляет собой депо как для моноцитов, так и для MDSC, откуда они могут рекрутироваться в опухоль в ответ на хемокины [12]. Гемопоэтические

стволовые клетки селезенки служат источником миелоидных элементов, которые впоследствии мигрируют в опухоль [19]. Результаты опубликованных исследований свидетельствуют, что миелопоэз в селезенке, источником которого являются гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники, процесс универсальный, поскольку отмечен у пациентов при раке желудка, поджелудочной железы, почки, гепатоцеллюлярной карциноме [18]. В функциональном отношении макрофаги, которые дифференцируются из мононуклеарных MDSC, обладают такими же иммуносупрессорными функциями [20]. Это позволяет предполагать, что значительная доля CD11b+ клеток селезенки может вызывать иммуносупрессорные эффекты. Иммуносупрессия CD11b+ миелоидными клетками проявляется подавлением адаптивного противоопухолевого иммунитета, ингибированием функции Т-клеток и стимуляцией и рекрутированием Т-регуляторных клеток [21, 22].

Полагают, что в опухоли макрофаги могут взаимодействовать с MDSC, при этом развивается иммунный ответ Th2 типа, сопровождающийся усилением продукции IL-10, а также понижением секреции IL-12, что стимулирует рост опухоли [23]. Миелоидные клетки способствуют прогрессированию опухоли, поддерживая ангиогенез, стволовость и эпителиально-мезенхимальный переход [24]. Противоопухолевый иммунный ответ может тормозиться в микроокружении селезенки за счет развития толерантности к антигенам новообразования. Поскольку метастазы в селезенке возникают крайне редко, можно полагать, что специфические иммунные реакции не играют существенной роли в предотвращении роста метастазов карцином в селезенке [25].

Количество CD11b+ миелоидных клеток в селезенке зависит от поступления из периферической крови, пролиферации местных клеток и миграции в кровь в ответ на хемотаксические факторы, источником которых являются очаги воспаления, репаративной регенерации и карциномы. Результаты нашего исследования демонстрируют одинаковое распределение CD11b+ клеток в морфофункциональных зонах селезенки как у пациентов группы контроля, так и у пациентов с опухолями. Наибольшее число CD11b+ миелоидных клеток обнаруживается в красной пульпе, меньше в маргинальной зоне и минимальное количество в лимфоидных фолликулах.

Количество CD11b+ миелоидных клеток в селезенке оказалось сложным образом ассоциировано с наличием карцином разной локализации. Эти изменения разнонаправлены. В группе пациентов с карциномами по сравнению с группой контроля меньше количество клеток-предшественников миелопоэза в маргинальной зоне (в 2 раза), незрелых моноцитоподобных клеток/монобластов в маргинальной зоне (в 5 раз) и красной пульпе селезенки (в 12,5 раза), причем это уменьшение более выражено при лимфогенном метастазировании.

В противоположность этому в красной пульпе при карциномах увеличивается количество промоноцитов с признаками незрелости (в 17 раз), поскольку отсутствовала экспрессия CD45. Не удалось обнаружить связь между количеством разных фенотипов CD11b+ миелоидных клеток в селезенке и гематогенным метастазированием. Эти результаты свидетельствуют о сложном характере реагирования CD11b+ миелоидных клеток в селезенке на развитие у пациентов карцином, которое не описывается только констатацией усиления экстрамедуллярного миелопоэза.

Заключение

Использование технологии TSA – ассоциированного иммунофлуоресцентного исследования позволило показать, что характер распределения миелоидных CD11b+ клеток в разных морфофункциональных зонах селезенки одинаков у пациентов контрольной группы и у пациентов со злокачественными новообразованиями. Выявленные четыре фенотипа CD11b+ миелоидных клеток, с одной стороны, отражают гетерогенность этой популяции клеток, с другой – демонстрируют в части фенотипов необычное сочетание маркеров высокой дифференцировки CD11b+ и CD45+ с наличием маркера стволовости CD34. Сравнение количества разных фенотипов CD11b+ миелоидных клеток в селезенке пациентов с разными карциномами показывает сложный характер ассоциации с карциномами. Количество незрелых CD11b+ миелоидных клеток в селезенке убывает, в то время как число более зрелых клеток, наоборот, увеличивается. Не исключено, что частично это обусловлено дифференцировкой первых во вторые. Уменьшение тех же незрелых фенотипов CD11b+ миелоидных клеток в селезенке у пациентов с карциномами при наличии лимфогенных метастазов может быть связано с их миграцией из селезенки и развитием иммуносупрессивного эффекта в преметастатических нишах лимфатических узлов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – В.М. Перельмутер, Л.А. Таширева.

Сбор и обработка материала – Е.С. Андриюхова.

Написание текста – Е.С. Андриюхова, В.М. Перельмутер.

Редактирование – Л.А. Таширева, С.В. Вторушин, М.В. Завьялова.

Проведение оперативного лечения, динамическое наблюдение пациентов – С.Г. Афанасьев, А.В. Августинович.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – V.M. Perelmuter, L.A. Tashireva.

Collected the data and performed the analysis – E.S. Andryukhova.

Wrote the paper – E.S. Andryukhova, V.M. Perelmuter.

Edited the manuscript – L.A. Tashireva, S.V. Vtorushin, M.V. Zavyalova.

Conducting surgical treatment, dynamic observation of patients – S.G. Afanasyev, A.V. Avgustinovich.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

- Voronina EI, Ageeva TA, Ryzhova MV. Особенности микроокружения и возможности иммунотерапии злокачественных глиальных опухолей. Клиническая и экспериментальная морфология. 2020;9(2):5–10. DOI: 10.31088/CEM2020.9.2.5-10.
Voronina EI, Ageeva TA, Ryzhova MV. Features of microenvironment and possibility of immunotherapy in malignant gliomas. Clinical and experimental morphology. 2020;9(2):5–10 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.2.5-10.
- Андрюхова Е.С., Таширева Л.А., Вторушин С.В., Завьялова М.В., Перельмутер В.М. Макрофаги селезенки: особенности популяционного состава и функции. Цитология. 2022;64(1):14–25. DOI: 10.31857/S0041377122010023.
Andryuhova ES, Tashireva LA, Vtorushin SV, Zavyalova MV, Perelmutter VM. Spleen macrophages: features of population composition and function. Tsitologiya = Cytology. 2022;64(1):14–25 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0041377122010023.
- Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. Nat Immunol. 2010;11(8):734–42. DOI: 10.1038/ni.1908.
- Schmid MC, Khan SQ, Kaneda MM, Pathria P, Shepard R, Louis TL et al. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. Nat Commun. 2018;9(1):5379. DOI: 10.1038/s41467-018-07387-4.
- Youn JI, Gabrilovich DI. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. Eur J Immunol. 2010;40(11):2969–75. DOI: 10.1002/eji.201040895.
- Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. J Immunol. 2008;181(8):5791–802. DOI: 10.4049/jimmunol.181.8.5791.
- Haverkamp JM, Crist SA, Elzey BD, Cimen C, Ratliff TL. In vivo suppressive function of myeloid-derived suppressor cells is limited to the inflammatory site. Eur J Immunol. 2011;41(3):749–59. DOI: 10.1002/eji.201041069.
- Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. Cancer Res. 2006;66(2):1123–31. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1299.
- Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V et al. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. J Immunol. 2012;189(12):5602–11. DOI: 10.4049/jimmunol.1201018.
- Hoechst B, Gamrekelashvili J, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. Blood. 2011;117(24):6532–41. DOI: 10.1182/blood-2010-11-317321.
- Bird L. MDSC metabolite stuns T cells. Nat Rev Immunol. 2020;20(6):352–3. DOI: 10.1038/s41577-020-0336-z.
- Di Mitri D, Toso A, Alimonti A. Molecular pathways: targeting tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells for cancer therapy. Clin Cancer Res. 2015;21(14):3108–12. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2261.
- Jordan KR, Kapoor P, Spongberg E, Tobin RP, Gao D, Borges VF et al. Immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells are increased in splenocytes from cancer patients. Cancer Immunol Immunother. 2017;66(4):503–13. DOI: 10.1007/s00262-016-1953-z.
- Lambert C, Preijers FWMB, Yanikkaya Demirel G, Sack U. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2017;92(3):180–8. DOI: 10.1002/cyto.b.21280.
- Romano A, Parrinello NL, Vetro C, Forte S, Chiarenza A, Figuera A et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical outcome in Hodgkin Lymphoma patients treated up-front with a risk-adapted strategy. Br J Haematol. 2015;168(5):689–700. DOI: 10.1111/bjh.13198.
- Christopher AC, Venkatesan V, Karuppusamy KV, Srinivasan S, Babu P, Azhagiri MKK et al. Preferential expansion of human CD34+CD133+CD90+ hematopoietic stem cells enhances gene-modified cell frequency for gene therapy. Hum Gene Ther. 2022;33(3–4):188–201. DOI: 10.1089/hum.2021.089.
- Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. J Immunol. 2001;166(1):678–89. DOI: 10.4049/jimmunol.166.1.678.
- Wu C, Ning H, Liu M, Lin J, Luo S, Zhu W et al. Spleen mediates a distinct hematopoietic progenitor response supporting tumor-promoting myelopoiesis. J Clin Invest. 2018;128(8):3425–38. DOI: 10.1172/JCI97973.
- Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(7):2491–6. DOI: 10.1073/pnas.1113744109.
- Kwak T, Wang F, Deng H, Condamine T, Kumar V, Perego M et al. Distinct populations of immune-suppressive macrophages differentiate from monocytic myeloid-derived suppressor cells in cancer. Cell Rep. 2020;33(13):108571. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108571.
- Yang Z, Guo J, Weng L, Tang W, Jin S, Ma W. Myeloid-derived suppressor cells – new and exciting players in lung cancer. J Hematol Oncol. 2020;13(1):10. DOI: 10.1186/s13045-020-0843-1.
- Wu WC, Sun HW, Chen J, OuYang HY, Yu XJ, Chen HT et al. Immunosuppressive immature myeloid cell generation is controlled by glutamine metabolism in human cancer. Cancer Immunol Res. 2019;7(10):1605–18. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0902.
- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. Semin Cancer Biol. 2012;22(4):275–81. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.01.011.
- Safarzadeh E, Orangi M, Mohammadi H, Babaie F, Baradaran B. Myeloid-derived suppressor cells: important contributors to tumor progression and metastasis. J Cell Physiol. 2018;233(4):3024–36. DOI: 10.1002/jcp.26075.
- Ugel S, Peranzoni E, Desantis G, Chioda M, Walter S, Weinschenk T et al. Immune tolerance to tumor antigens occurs in a specialized environment of the spleen. Cell Rep. 2012;2(3):628–39. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.08.006.

Информация об авторах

Елена Сергеевна Андрухова – младший научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Любовь Александровна Таширева – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной терапии рака НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Сергей Владимирович Вторушин – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН, заведующий патологоанатомическим отделением клиник Сибирского государственного медицинского университета, профессор кафедры патологической анатомии Сибирского государственного медицинского университета.

Сергей Геннадьевич Афанасьев – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением абдоминальной онкологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Александра Владимировна Августинович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения абдоминальной онкологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Марина Викторовна Завьялова – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии Сибирского государственного медицинского университета; ведущий научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Владимир Михайлович Перельмутер – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Author information

Elena S. Andryukhova – Junior Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center.

<https://orcid.org/0000-0003-0909-9206>

Lyubov A. Tashireva – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center.

<https://orcid.org/0000-0003-2061-8417>

Sergey V. Vtorushin – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center; Head of the Pathology Department of the Clinics Siberian State Medical University, Professor, Department of Pathology, Siberian State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-1195-4008>

Sergey G. Afanasyev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Abdominal Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center.

<https://orcid.org/0000-0002-4701-0375>

Alexandra V. Avgustinovich – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Abdominal Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center.

<https://orcid.org/0000-0001-7301-7581>

Marina V. Zavyalova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University; Leading Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center.

<https://orcid.org/0000-0001-9429-9813>

Vladimir M. Perelmutter – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center.

<https://orcid.org/0000-0002-7633-9620>