

Сведения о выполненных работах в 2020 году
по проекту **«Роль программирования моноцитов в формировании про- и противоопухолевых фенотипов опухолеассоциированных макрофагов и эффективности химиотерапии при раке кишечника»**,
поддержанному Российским научным фондом
Соглашение № 19-15-00151

Руководитель Кжышковска Юлия Георгиевна, канд. биол. наук

Терапевтическая чувствительность опухолей существенно зависит от сложного взаимодействия раковых клеток с различными компонентами микроокружения опухоли (ТМЕ), особенно с опухолеассоциированными макрофагами (ОАМ) (Larionova I., et al., *Cancers*, 2020). Химиотерапия может стимулировать противоопухолевый иммунитет, тем самым увеличивая полный патологический ответ на лечение. С другой стороны, ОАМ могут накапливаться в опухоли после химиотерапии и обеспечивать устойчивость к лечению и способствовать прогрессии опухоли путем подавления Т-клеточного иммунитета, поддержания выживания опухолевых клеток и стимуляции ревазуляризации опухоли (Larionova I., et al., *Oncoimmunology*, 2019). Однако для достижения максимальной эффективности химиотерапии необходимо исследовать молекулярные механизмы взаимодействия химиотерапевтического агента с ОАМ, что позволит разработать стратегии программирования противоопухолевой активности ОАМ. Чрезвычайно важным фактором, определяющим функциональное программирование ОАМ в опухолевом очаге, является программирование моноцитов крови, которые инфильтрируют в опухоль и являются главным пластическим ресурсом ОАМ. Вопрос о влиянии программирования моноцитов крови (предшественников макрофагов) на развитие последующей про- либо противоопухолевую активности ОАМ является наиболее актуальным и практически не исследован. При различных типах рака ОАМ имеют специфичные фенотипы и могут быть представлены специфическими гетерогенными популяциями (Larionova I., *Frontiers in Oncology*, 2020). Отдельные фенотипы ОАМ определяются набором маркеров, которые не обязательно дают четкую классификацию на М1 и М2 субпопуляции. В случае рака кишечника, существуют противоречивые данные о способности ОАМ как поддерживать развитие опухоли, так и оказывать противоопухолевое действие (Larionova I., *Frontiers in Oncology*, 2020).

В течение первого и второго года проекта нами была сформирована уникальная коллекция образцов моноцитов периферической крови и опухолевой ткани пациентов с раком толстой кишки (РТК) для сравнительного анализа моноцитов и опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) для каждого отдельного пациента. Принципиальным моментом нашего проекта является то, что из группы больных раком толстой кишки были сформированы 2 группы пациентов с опухолью прямой и ободочной кишки, что дает возможность впервые проанализировать различия в транскриптомном профиле моноцитов при разной локализации РТК. В течение второго года проекта нами выявлены основные функциональные группы

дифференциально экспрессированных генов: 1) отличающих моноциты онкологических пациентов и здоровых доноров; 2) отличающих моноциты пациентов с опухолью прямой кишки и с опухолью ободочной кишки; 3) отличающих моноциты пациентов с раком прямой кишки до и после химиотерапии; 4) отличающих моноциты пациентов с раком прямой кишки до и после операции; 5) отличающих моноциты пациентов с раком ободочной кишки до и после операции. Сравнение транскриптомного профиля моноцитов здоровых доноров и больных колоректальным раком (рак прямой кишки и рак сигмовидной кишки) было проведено при помощи высокопроизводительного полнотранскриптомного секвенирования (на платформе Illumina NextSeq500). Было установлено, что в моноцитах больных активируются следующие программы: транспорт железа, IL-4-зависимый ответ, INFgamma-зависимый ответ, ангиогенез, клеточная адгезия, миграция, хемотаксис, формирование коллагена. В моноцитах пациентов с КРР подавлялись программы ацетилирования гистонов и хроматиновой перестройки. Бионформатический анализ транскрипционного профиля моноцитов пациентов с раком прямой кишки или раком сигмовидной кишки при независимом сравнении этих групп с моноцитами здоровых доноров выявил аналогичные группы дифференциально экспрессированных генов. Профиль моноцитов больных раком прямой кишки до и после неoadъювантной химиотерапии имел четкие отличия, что говорит о том, что химиотерапия может влиять на программирование моноцитов крови. Так, у пациентов с раком прямой кишки в моноцитах после НАХТ по сравнению с моноцитами до НАХТ подавляются программы: эндоцитоз, гипоксия, MTORC1-сигналинг, эпителиально-мезенхимальный переход, апоптоз, метаболизм жирных кислот, ангиогенез, транспорт железа, IL-10 сигналинг, IL-4-зависимый ответ. В то же время после НАХТ активируются программы – WNT-beta-катениновый сигналинг, NOTCH сигналинг и ДНК репарация. Наши данные показали, что моноциты после операции имеют аналогичные с моноцитами после НАХТ изменения экспрессии функциональных групп генов. Анализ фенотипических особенностей моноцитов при КРР с помощью проточной цитометрии выявил, что клетки, экспрессирующие CD163+ и CCR2+, наиболее информативны для изучения роли моноцитов в патогенезе КРР и исследования их диагностической и предсказательной ценности. Минорные субпопуляции моноцитов отличаются большей чувствительностью к распространению опухолевого процесса. Резекция опухоли и оперативное вмешательство активировали миграционный потенциал моноцитов за счет повышения CD14+CD16-CCR2+ субпопуляции. Было показано, что миграционная способность моноцитов больных с КРР выше по сравнению с моноцитами здоровых доноров, как в случае базовой миграционной активности, так и в случае индуцированной хемокинами миграции. Полученные данные совместно с данными РНК секвенирования позволят нам выявить механизмы программирования функций моноцитов самой опухолью у пациентов с КРР и механизмы программирования под влиянием противоопухолевой терапии. В свою очередь, установление данных механизмов позволит выявить терапевтические мишени для программирования противоопухолевой активности ОАМ. При помощи ИГХ анализа опухолевой ткани рака толстой кишки было обнаружено, что SPP1 является негативным

прогностическим маркером в отношении лимфогенного и гематогенного метастазирования у пациентов с раком прямой кишки. В то время как, наоборот, экспрессия S100A4 оказалась благоприятным прогностическим фактором в отношении рецидивирования и гематогенного метастазирования в группах пациентов с раком ободочной кишки, раком прямой кишки и раком поперечно-ободочной кишки. При помощи конфокальной микроскопии мы выявили, что основным источником этих белков являлись опухолеассоциированные макрофаги вне зависимости от их дальнейшей поляризации (M1 или M2). Также полученные при помощи ПЦР в режиме реального времени данные указывают на негативную роль IL-12A в отношении гематогенного метастазирования у больных с КРР. В прошлом году нами на ретроспективной выборке пациентов с раком кишки было показано, что снижение уровня белковой экспрессии CD8 и IL35 (IL-12A) указывает на плохой прогноз и повышение вероятности лимфатического, но не гематогенного метастазирования. Таким образом, при помощи полнотранскриптомного секвенирования моноцитов периферической крови мы выявили функционально значимые различия в профиле моноцитов больных КРР и здоровых доноров. Также мы показали, что химиотерапия и резекция опухоли изменяют транскриптомный профиль моноцитов у больных с раком прямой кишки, однако профиль моноцитов скорее всего не зависит от локализации опухоли в кишечнике. На гистологическом материале от больных КРР нам удалось выявить новые маркеры прогноза в отношении лимфогенного и гематогенного метастазирования при КРР. В течение третьего года проекта мы установим механизмы эпигенетического программирования моноцитов больных КРР на уровне гистонового кода. Мы завершим валидацию результатов полнотранскриптомного секвенирования, полученных в 2020 году, как на проспективной независимой выборке с использованием моноцитов периферической крови больных КРР, так и на ретроспективной выборке больных КРР с использованием операционного опухолевого материала.