

Сведения о выполненных работах в 2018 году  
по проекту **«Молекулярный механизм действия регуляторных белков макрофагов второго типа на формирование опухолевого микроокружения и прогрессию опухолей»**, поддержанному Российским научным фондом

Соглашение № 14-15-00350

Руководитель д-р биол. наук Кжышковска Юлия Георгиевна

Повышение эффективности противоопухолевой терапии является наиболее актуальной задачей в клинической онкологии (Чердынцева и др., 2017). Терапевтическая чувствительность опухолей существенно зависит от сложного взаимодействия опухолевых клеток с различными компонентами микроокружения опухоли, в частности с иммунными клетками (Larionova I., 2019, обзор отправлен в журнал *Oncoimmunology*). Было показано, что эффективное цитостатическое лечение связано с проявлением цитотоксической активности опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) в опухоли, которая может быть индуцирована химиотерапией (Stakheeva M., et al., 2017). Однако, также было обнаружено, что миелоидные клетки, в частности ОАМ, обычно накапливаются в опухолях после химиотерапии (ХТ) и способствуют рецидиву опухоли и опухолевой химиорезистентности. На сегодняшний день систематично не изучены механизмы взаимодействия химиотерапевтических агентов и макрофагов, а также механизмы химиорезистентности, обусловленной действием ХТ на ОАМ в опухолях.

Методом секвенирования следующего поколения нами было впервые установлено глобальное влияние цисплатина на транскрипционный профиль модельных опухолеассоциированных макрофагов человека. Было установлено, что цисплатин вызывает перепрограммирование модельных ОАМ рака молочной железы и рака толстого кишечника. Были получены уникальные данные, показывающие, что основными группами генов, активированными цисплатином являются гены, вовлеченные в воспалительный ответ, интерферон-зависимые пути, р53-зависимый апоптоз, генов, отвечающих на репарацию ДНК, отторжение трансплантата. Подавляющее действие цисплатина оказывал на экспрессию генов, вовлеченных в метаболизм липидов и жирных кислот, гомеостаз холестерина, окислительное фосфорилирование. Данный подход позволил выявить как общие механизмы, так и различия программирующего действия химиотерапевтических агентов на модельные опухолеассоциированные макрофаги 2 типа (ОАМ) карциномы молочной железы и аденокарциномы кишечника человека. В 2018 году был проведен углубленный анализ генов, экспрессия которых изменилась на транскрипционном уровне под воздействием химиотерапевтического агента. Было обнаружено, что в модельных ОАМ рака молочной железы под воздействием цисплатина запускались программы трансмембранного транспорта и рецепторной активности, а экспрессия генов, вовлеченных в рибосомальный биогенез, трансляцию, биосинтез и метаболизм РНК, белковый метаболизм – подавлялась. В модельных ОАМ рака толстого кишечника более значимо активировались гены, участвующие в регуляции клеточного цикла, а подавлялись гены эпителиально-мезенхимального перехода, ангиогенеза, гипоксии.

В 2018 при помощи ПЦР в режиме реального времени были полностью подтверждены результаты секвенирования следующего поколения показавшие влияние цисплатина на дифференциальную экспрессию генов в ОАМ. Так, экспрессия AREG, CXCL10, FAS, IRF7, GBP4, MDM2, MX1, STAT4, TNFSF10 и MARCO повышалась под воздействием цисплатина, в то время как экспрессия PCNA, ACAT2, CCND2, DHCR7, SPP1, CD70 значительно снижалась при добавлении агента (Larionova I., et al., 2019, манускрипт готовится для отправки в Journal of Experimental Medicine).

На клиническом материале, взятом от пациентов с раком молочной железы (PMЖ) было установлено, что белковая экспрессия обнаруженных при помощи секвенирования следующего поколения маркеров MX1, CCND2, и TNFSF10 детектируется в опухолеассоциированных макрофагах у пациентов без неoadъювантной химиотерапии и сохраняется в макрофагах после НАХТ. Гены MX1, CCND2, TNFSF10 могут указывать на про-опухолевую активацию макрофагов, т.к. они экспрессируются в макрофагах первичной опухоли. Экспрессия данных генов стимулируется прямым воздействием химиотерапевтического агента *in vitro*. Экспрессия MX1, CCND2 и TNFSF10 после НАХТ указывает на сохранение про-опухолевого фенотипа в ОАМ. Было также показано, что в случае с прогрессированием (отрицательный ответ на НАХТ) средний балл экспрессии CXCL10 был выше по сравнению с полной регрессией (положительный ответ на НАХТ) ( $p = 0,045$ ). Средний балл экспрессии VEGF был выше в случае стабилизации процесса (плохой ответ на НАХТ) по сравнению с частичной регрессией (хороший ответ на НАХТ) ( $p = 0,039$ ).

В отчетном 2018 году на модели ОАМ было изучено влияние химиотерапевтического агента цисплатина на скавенджинг-функцию макрофагов. При помощи добавления в культуру ОАМ флуоресцентно-меченных лигандов и проточной цитометрии, было показано, что цисплатин снижает способность макрофагов эндоцитировать как классический лиганд acLDL, так и опухолеспецифический фактор эпидермальный фактор роста (EGF) (Larionova I., International Journal of Cancer, 2019, манускрипт подготовлен к отправке в журнал Int. J of Cancer). Проанализирована генная экспрессия скавенджер рецепторов M2 макрофагов стабиллин-1 и CD36 при помощи ПЦР в режиме реального времени. Было обнаружено разнонаправленное действие цисплатина на экспрессию перечисленных генов. Так, цисплатин увеличивал экспрессию CD36 (скавенджер рецептор В класса), в то время как экспрессия стабилина-1 оставалась практически неизменной. В прошлом году было показано, что экспрессия CD206 и CD163, которые также являются скавенджер рецепторами M2-макрофагов, снижалась под воздействие цисплатина. Ранее была продемонстрирована функция стабилина-1 как эндоцитарного рецептора для acLDL. В настоящем исследовании с использованием модельной клеточной CHO-K1, стабильно экспрессирующей рекомбинантный стабиллин-1, показано, что EGF является лигандом стабилина-1, и стабиллин-1 отвечает за эндоцитоз EGF. При помощи конфокальной микроскопии показано, что цисплатин нарушал комплекс рецептор-лиганд и распределение везикул в ОАМ. Также в макрофагах было обнаружено

сниженное количество везикул, содержащих лиганд, под воздействием цисплатина, в то время как ЕЕА1-позитивные эндосомы оставались неизменными.

В рамках данного проекта ранее было установлено, что хитиназо-подобные белки (ХПБ) являются маркерами ОАМ и контролируют процессы хемотаксиса моноцитов и ангиогенеза (Larionova I., et al., *Siberian Journal of Oncology*, 2018). Было показано, что YKL-39 является прогностическим фактором снижения выживаемости и повышения вероятности метастазирования при раке молочной железы (Liu T., Larionova I., et al., 2018; Litviakov N., et al., *Cancer Chemother Pharmacol.* 2018; патент № 2623869 <http://www.findpatent.ru/patent/262/2623869.html>; патент № 2632115 <http://www.findpatent.ru/patent/263/2632115.html>; патент № 2659676 <http://www.findpatent.ru/patent/265/2659676.html>). Более того, YKL-39 про-ангиогенным и хемотактическим фактором, что было показано в экспериментах *in vitro* (Liu T., Larionova I., et al., 2018). В отчетный период 2018 года было показано, что YKL-39 оказывает соизмеримый с VEGF эффект на ангиогенез, однако, меньший эффект, чем его белковый аналог хитиназо-подобный белок YKL-40, который также является про-ангиогенным фактором. Также было показано, что другой хитиназо-подобный белок SI-CLP ингибирует опухолевой рост в мышинной модели рака молочной железы за счет подавления рекрутинга моноцитов в опухолевый сайт (Yin S., et al., *Int. J. of Cancer*, 2019, на рецензии).