

Сведения о выполненных работах в 2019 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 канд. биол. наук Кжышковска Юлия Георгиевна

Эффективность химиотерапии, несмотря на развитие новых химиотерапевтических агентов при раке толстой кишки (РТК), достигает не более 50 %. Хеморезистентность опухолевых клеток только частично объясняет уровень эффективности химиотерапии. В настоящее время в международном научном сообществе существуют данные о том, что макрофаги опухолевого микроокружения могут, как сотрудничать с химиотерапевтическими агентами, так и снижать эффективность их действия (Larionova I., et al., *Oncoimmunology*, 2019). В настоящее время опухолеассоциированные (ОАМ) рассматриваются как очень перспективная мишень для химиотерапии (Kzhyshkowska J., et al., Springer Nature, 2020). Актуальной является задача выяснить, какие субпопуляции ОАМ существуют при РТК, как они взаимодействуют с химиотерапией и влияют на течение и исход заболевания. Наиболее общепринятой является точка зрения, что опухолеассоциированные макрофаги поддерживают опухолевый рост и способствуют эффективному метастазированию (Kzhyshkowska J., et al., *J Immunology*, 2019). В случае рака кишечника существуют противоречивые данные о способности ОАМ как поддерживать развитие опухоли, так и оказывать противоопухолевое действие. Чрезвычайно важным фактором, определяющим поведение ОАМ в опухолевом очаге, является состояние моноцитов крови, которые инфильтрируют в опухоль и являются главным пластическим ресурсом ОАМ (Patusheva M., et al., 2019). Однако, влияние программирования моноцитов на формирование ОАМ с про- и противоопухолевыми свойствами практически не изучено.

В первый год выполнения проекта 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 проекта является то, что в ходе реализации из группы больных раком толстой кишки были сформированы 2 группы пациентов с опухолью прямой и ободочной кишки, что позволило впервые выявить различия в транскриптомном профиле моноцитов при разной локализации РТК. Была сформирована проспективная база данных пациентов с раком прямой и ободочной кишки. В течение всего проекта (до 2021) создается биобанк образцов, в котором образцы моноцитов пациентов получены А) для рака прямой кишки: 1) до лечения; 2) после завершения НАХТ (перед операцией); 3) на 7-10 сутки после операции; 4) через 3 месяца после операции; Б) для рака ободочной кишки: 1) до лечения;

2) на 7-10 сутки после операции; 3) через 3 месяца после операции. На сегодняшний день в исследование включены 23 пациента, из них 8 получали НАХТ и 15 не получали НАХТ.

На проспективном материале был проведен анализ субпопуляционного состава моноцитов периферической крови у пациентов с раком прямой кишки и ободочной кишки и здоровых доноров. Соотношение субпопуляций CD14+CD16⁻; CD14+CD16⁺ и CD14⁻CD16⁺ не отличалось в группах здоровых доноров и пациентов с раком толстого кишечника.

Далее при помощи метода секвенирования следующего поколения был исследован транскриптомный профиль моноцитов периферической крови у пациентов с раком прямой и ободочной кишки до лечения и у здоровых доноров. Были выявлены основные функциональные биохимические и молекулярные сигнальные пути и, соответственно, 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. Главные различия в транскрипционном профиле моноцитов наблюдались между больными РТК и здоровыми донорами с высокой степенью статистической достоверности и большим уровнем значимости, который выражался в показателях p -value и $\log_2\text{FoldChange}$ (p value < 0,000001, $\log_2\text{FC} > 2$). Основные отличия в моноцитах пациентов с раком толстой кишки по сравнению со здоровыми донорами относились к активации программ, ответственных за эстрогеновый ответ, эпителиально-мезенхимальный переход, WNT-beta катениновый путь, NOTCH4 сигнальный путь, заживление ран (регенерация), деацетилирование гистонов, и подавлению программ, ответственных за оксидативное фосфорилирование, метаболизм жирных кислот, mTOR сигналинг, гипоксию, ROS сигнальный путь в фагоцитах, презентация антигена, метилирование ДНК. В моноцитах больных с раком прямой кишки и ободочной кишки наблюдаются дополнительные отличия. Так, в моноцитах крови больных раком прямой кишки дифференциально активировались следующие транскрипционные программы, отвечающие за скавенджинг и TGF β сигналинг, а в моноцитах больных раком ободочной кишки – интерферон гамма-зависимый путь, активация лейкоцитов, ангиогенез. Для дальнейшего анализа на следующем этапе проекта (2020-2021 гг) будет выбран набор генов, дифференциальная экспрессия которых достигала статистически достоверной разницы (p -value = $1 \cdot 10^{-5}$, $\log_2\text{FC}$ = 6-8) и которые были интересны в связи с их функциональной активностью в поляризации моноцитов и макрофагов, а также в прогрессии ряда опухолей, в том числе при РТК. Данные гены относятся к функциональным группам эпителиально-мезенхимального перехода, модификации гистонов, WNT-beta катенинового пути, NOTCH4 сигнального пути, mTOR сигналинга, ROS сигнального пути.

Далее на ретроспективном материале в опухоли толстого кишечника при помощи иммуногистохимического анализа была показана прогностическая значимость CD8 и IL35 в отношении лимфогенного метастазирования и рецидивирования. Высокая экспрессия как CD8, так и IL35 ассоциировалась с низким уровнем лимфогенного

метастазирования и рецидивирования у больных как общей группы с раком толстого кишечника, так и больных с локализацией опухоли в прямой кишке. Интересно, что у пациентов с раком прямой кишки экспрессия CD8 негативно коррелировала с экспрессией маркеров M2 макрофагов CD163 и стабилином-1, для которого показали новую функцию сквенджинга EGF (Larionova et al., Cells, submitted). Было также отмечено, что экспрессия стабилина-1 у больных с предоперационной химиотерапией была статистически значимо ниже по сравнению с группой пациентов без НАХТ. Стабилин-1 играет роль сквенджер-рецептора в опухолевом микроокружении, который поглощает различные компоненты микроокружения и регулирует гомеостатический баланс опухоли, и его снижение под влиянием химиотерапии может приводить, соответственно, к дисбалансу про- и противоопухолевых факторов.

Более того, высокая экспрессия IL35 была ассоциирована с менее злокачественным фенотипом. Наоборот, экспрессия основного маркера M2 CD206 оказалась выше в группе с более злокачественным фенотипом (при 3 стадии заболевания по сравнению со 2 стадией). У больных раком ободочной кишки повышение уровня экспрессии CD206 было ассоциировано с наличием лимфогенного метастазирования. Эти результаты говорят о способности M2 макрофагов поддерживать прогрессию рака толстой кишки.

Кроме того, при помощи конфокальной микроскопии образцов опухоли толстой кишки был обнаружен потенциальный маркер противоопухолевой активности макрофагов при раке толстой кишки - IL35. Мы проанализировали иммунный статус опухолей толстого кишечника и установили, что снижение уровня CD8 и IL35 указывает на плохой прогноз и повышение вероятности лимфогенного, но не гематогенного метастазирования. Более того, было показано, что IL35 (признанный маркер регуляторных лимфоцитов) экспрессируется в опухолиассоциированных макрофагах в раке толстого кишечника.

Таким образом, был проанализирован иммунный статус опухолей толстого кишечника и установили, что снижение уровня CD8 и IL35 указывает на плохой прогноз и повышение вероятности лимфатического, но не гематогенного метастазирования. Далее установлено, что транскрипционный профиль циркулирующих моноцитов пациентов с раком толстого кишечника имеет значительные функциональные отличия от моноцитов здоровых доноров. В моноцитах больных активируются транскрипционные программы, связанные с гормональной регуляцией, ремоделированием тканей, клеточной дифференцировкой и миграцией. Основным отличием между двумя локализациями рака толстого кишечника: раком прямой и ободочной кишки, являются активация противоопухолевых программ, отвечающих за сквенджинг и TGFb сигналинг, в моноцитах пациентов с раком прямой кишки, а в моноцитах больных раком ободочной кишки – провоспалительных программ интерферон гамма-зависимого пути и активации лейкоцитов.

Результаты исследований отражены в следующих публикациях:

- 1) Kzhyshkowska J., Larionova I., Liu T. YKL-39 as a potential new target for anti-angiogenic therapy in cancer *Frontiers in Immunology*.
- 2) Kzhyshkowska J., Grigoryeva E., Larionova I. Targeting the tumor-associated macrophages for 'normalizing' cancer. *Network-based Pharmacology and Personalized Systems Approach in Bio-medicine: Approaching Human Complex Diseases* (Springer Nature, принята в печать, 2020 г.)
- 3) I. Larionova, N. Cherdyntseva, T. Liu, M. Patysheva, M. Rakina, J. Kzhyshkowska. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy // *Oncoimmunology*. – 2019. – V.8, № 7.
- 4) Patysheva M., Stakheyeva M., Larionova I., Fedorov A., Kzhyshkowska J., Cherdyntseva N. Cytostatic cancer therapy modulates monocyte-macrophage cell functions: how it impacts on treatment outcomes. *Experimental oncology*. – 2019. - 41 (3). – P. 248-253.
- 5) Irina Larionova, Tengfei Liu, Marina Patysheva, Alexey Sergushichev, Dieuwertje M. Mossel, Vladimir Riabov, Artem Kiselev, Elena Kazakova, Evgeny Denisov, Nikolai Litviakov, Nadezhda Cherdyntseva, Julia Kzhyshkowska. Stabilin-1 mediated clearance of EGF by tumor-associated macrophage is suppressed by chemotherapeutic agent cisplatin (подана в журнал *Cells*, 2020).
- 6) Larionova I.V., Liu T., Riabov V., Mossel D.M., Patysheva M.R., Kiselev A.M., Kazakova E.O., Cherdyntseva N.V., Kzhyshkowska J. The clearance of EGF by tumor-associated macrophages is suppressed by chemotherapeutic agent cisplatin. *Annals of Oncology*, Volume 30, Issue Supplement_5, October 2019, mdz269.043, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz269.043>
- 7) Larionova I., Kiselev A., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. Differences in the effect of cisplatin on the transcriptional profile of tumor-associated macrophages of breast cancer and colon cancer in vitro. *EMDS* 2019.
- 8) Patysheva M., Larionova I., Zavyalova M., Grigorieva E., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. The association of chitinase-like protein YKL-39 with locoregional and distant metastases in human colorectal cancer. *EMDS* 2019.