

Сведения о выполненных работах
в период с 27.07.2023 г. по 30.06.2024 г.

по проекту **«Изучение функционального программирования
опухолеассоциированных макрофагов в прогрессии рака яичников и
ответа опухоли на химиотерапию с целью рационализации
противоопухолевого лечения»**,

поддержанному Российским научным фондом

Соглашение № 21-75-10021

Руководитель: Ларионова Ирина Валерьевна, канд. мед. наук

За предыдущий период нами были получены данные о макрофагах с пенистой цитоплазмой, которые аккумулировались в опухоли, главным образом, после химиотерапии. Анализ экспрессии макрофагальных маркеров и морфологическая оценка расположения макрофагов в первичной опухоли яичника и сальнике с канцероматозом на расширенной выборке показал, что обильная инфильтрация пенистыми макрофагами именно в сальнике в совокупности с наличием неоадьювантной химиотерапии (НАХТ) и диссеминированной стадией ассоциировано с наихудшим прогнозом заболевания. В канцероматозных очагах сальника экспрессия CD68 была значимо выше в опухолях с наличием гигантских многоядерных клеток и наличием кристаллов холестерина, а также наблюдалась тенденция к статистической значимости связи экспрессии CD68 с фиброзом стромы и наличием третичных лимфоидных структур. Эти зависимости вполне логичные, потому что именно в сальнике наблюдалось наибольшее скопление пенистых макрофагов и их связь с НАХТ и худшей выживаемостью пациентов. По литературным данным, пенистые клетки могут свидетельствовать о нарушении липидного обмена и могут накапливаться в зоне неразрешенного воспаления. В рамках отчета нами был проведен комплексный анализ накопленных литературных данных по современному состоянию вопроса о фенотипическом разнообразии ОАМ в опухолях различных локализаций (Rakina M., Larionova I., Kzhyshkowska J., Heliyon. 2024 Apr 15; 10(7): e28332, 2024). Описаны новые маркеры на основе фенотипического разнообразия макрофагов. Был выявлен и описан интересный фенотип так называемых липид-ассоциированных макрофагов. Мы хотели проверить гипотезу того, являются ли эти ОАМ теми пенистыми макрофагами, которые мы видим в опухоли. Для этого мы и выбрали главную генную сигнатуру липид-ассоциированных ОАМ, содержащую выше перечисленные маркеры. В выборе мы также ориентировались на данные, полученные нами в результате анализа пространственной транскриптомики. Было также выявлено, что белковая экспрессия стабилина-1 в опухоли яичника выше у больных с наличием асцита по сравнению с больными без асцита. Такая же тенденция к статистической значимости наблюдалась также для CD206. Экспрессия CD206 была достоверно повышена в опухоли яичников с микронекрозом по сравнению с опухолью с крупными очагами некроза. Белковая экспрессия CD163 была статистически значимо ассоциирована с микрососочковым паттерном.

Далее, с помощью технологии пространственной транскриптомики Nanostring GeoMx мы прицельно профилировали макрофагальные инфильтраты в первичной опухоли яичника и сальника с канцероматозом, акцентируя особое внимание на пенистых макрофагах. Было получено 6 кластеров ROI: 1, 2, 3 – кластеры богатые ОАМ и 0, 4, 5 – кластеры богатые опухолевыми клетками. Далее с помощью метода клеточной деконволюции в пакете SpatialDecon получили распределение клеточных типов в ROI различных компартментов РЯ. Результаты клеточной деконволюции позволяют охарактеризовать полученные кластеры ROI различных компартментов ОАМ. Кластер «0» представляет собой опухолевые клетки с низким содержанием иммунного и стромального инфильтрата. Кластер «1» – компартмент ОАМ богатый лимфоцитами (особенно CD8 Т-клетками). Кластер «2» – компартмент ОАМ с наличием моноцитарного инфильтрата. Кластер «3» – компартмент ОАМ и фибробластов. Кластер «4» – компартмент ОАМ и опухолевых клеток. Кластер «5» – компартмент ОАМ, опухолевых клеток и В-лимфоцитов. Анализ дифференциальной экспрессии генов для каждого из выявленных кластеров ОАМ и опухоли показали, что ОАМ кластера 1 характеризуются генами антигенной презентации, а кластера 2 – ранее обнаруженными маркерами липидных макрофагов (APOC1, APOE, FABP4, CD36). В результате биоинформатического анализа данных, полученных с помощью технологии Nanostring GeoMX и 10x Genomics Visium был выбран список биомаркеров, ассоциированных с субпопуляцией пенистых макрофагов: CCL18, TREM2, GPNMB, SPP1, LYZ, CSTB, APOC1, APOE, C1QC. В совокупности с маркером макрофагов CD68 была оценена их ко-локализация в ОАМ опухолевой ткани. В препаратах цитоспинов клеток асцитической жидкости больных РЯ также была подтверждена экспрессия изучаемых маркеров в макрофагах.

Суммарно, наши данные согласуются как друг с другом при использовании различных методических подходов к анализу фенотипа пенистых макрофагов, так и с литературными данными. Однако, для рака яичника мы первые, кто провел такой комплексный анализ фенотипов ОАМ в ткани яичника и сальника (Larionova I., et al., submitted, данные будут обнародованы в 2024 году уже после сдачи отчета и будут иметь обязательную ссылку на грант).

Мы завершили работу по анализу субпопуляционного состава моноцитов периферической крови и макрофагов асцитической жидкости больных раком яичников. В периферической крови, как по общей популяции моноцитов, так и по субпопуляциям наблюдалась схожая картина – снижение CD163- и CD206-экспрессирующих клеток у больных РЯ по сравнению со здоровыми донорами. Интересные наблюдения были сделаны для CCR2-экспрессирующих моноцитов – большинство моноцитов больных РЯ были CCR2-положительными. Мы отметили интересную тенденцию: как CD163+, так и CD206+ моноциты, экспрессирующие одновременно CCR2, в количественном эквиваленте были больше представлены в группе больных РЯ. Мы обнаружили, что доля CCR2+ моноцитов, но не CCR2-моноцитов, выше в группе больных РЯ по сравнению со здоровыми донорами. Такой же характер распределения экспрессии наблюдался для Tie2-положительных моноцитов. То есть маркерными для опухоли являются те моноциты, у которых есть

потенция к миграции. Мы также рассмотрели, как химиотерапия влияет на фенотип циркулирующих моноцитов. Оказалось, что неоадьювантная химиотерапия (НАХТ) приводит к увеличению процента CCR2-экспрессирующих моноцитов, особенно была заметна разница для CD14+CD163+CCR2+ моноцитов. Процент моноцитов, экспрессирующих CD206 и Tie2 был ниже в группе с НАХТ по сравнению с контрольной группой. Тенденция сохраняется во всех субпопуляциях моноцитов при сравнении онкологической группы с контрольной группой.

В асцитической жидкости в группе с НАХТ доля CD45+CD14+CD163+CD206+ макрофагов была ниже по сравнению с нелеченой группой. В группе с НАХТ доля макрофагов, экспрессирующих CD206, была меньше по сравнению с группой без НАХТ. У пациенток с НАХТ понижалась также и доля CD45+CD11b+CD163+CD206+ макрофагов. Содержание CD206-экспрессирующих CD11b+ макрофагов различных субпопуляций в группе с НАХТ была ниже по сравнению с группой без НАХТ.

Нами была проведена связь различных фенотипов макрофагов асцитической жидкости с наличием прогрессии у пациенток с раком яичников. Так, в группе пациенток с прогрессией повышалось содержание CD45+CD14+CD163+CD206+ макрофагов по сравнению с группой без прогрессии. Также содержание CD45+CD14+CD163+Tie2+ и CD45+CD14+CCR2+Tie2+ макрофагов в асците больных с прогрессией было выше по сравнению с группой без прогрессии. Для CD11b-экспрессирующих макрофагов асцитической жидкости наблюдалась похожая закономерность.

Исследования *in vitro* продемонстрировали, что химиотерапия и асцитическая жидкость влияют на активность макрофагов, снижая их фагоцитарную активность по отношению к опухолевым клеткам при раке яичника. Химиотерапия также ингибировала способность макрофагов влиять на миграционную активность опухолевых клеток яичника, без влияния на инвазивную способность. Также химиотерапии не оказывала влияния на ангиогенный потенциал макрофагов. Интересные наблюдения были сделаны для клеток HUVEC, стимулированных асцитической жидкостью больных РЯ: они отличались широким основанием образующихся трубочек, при этом по всей поверхности лунки отмечалось множество незамкнутых структур. Структуры же, сформировавшиеся под влиянием макрофагов без химиотерапии и макрофагов с химиотерапией, были похожи на трубочки, образовавшиеся под влиянием пустой среды ЕМВ-2: тонкие, вытянутые трубочки, присутствовали не полностью замкнутые структуры, сеть трубочек была неплотная.

В целом, на третий год выполнения проекты мы завершили все запланированные работы по оценке ОАМ в опухоли яичника и канцероматозного сальника, а также асцитической жидкости, и моноцитов периферической жидкости. Обнаруженные данные являются интересными с точки зрения ответов на существующие клинические вопросы при раке яичников. Мы верим, что в сумме полученные данные помогут нам приблизиться к разработке новых таргетов для иммунотерапии при раке яичников, которая на сегодняшний день является большой нерешенной клинической проблемой.