

Сведения о выполненных работах в 2017 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

Использование химиотерапевтических агентов является наиболее эффективным подходом для лечения основных онкологических нозологий (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28714406>). Было показано, что повышенное количество опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) коррелирует с плохим ответом на неoadъювантную терапию при раке груди (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27510849>). Необходимым этапом для усиления эффективности действия химиотерапевтических препаратов, выявления новых механизмов отсутствия ответа на химиотерапию и механизмов, усиливающих данный эффект, а также разработки персонализированных схем терапии, применяемых для лечения рака груди и рака толстого кишечника, является выявление фенотипических и функциональных особенностей ОАМ в условиях терапии. В рамках данного проекта нами было ранее установлено, что хитиназо-подобные белки являются маркерами ОАМ и контролируют процессы хемотаксиса моноцитов и ангиогенеза. Было показано, что хитиназо-подобные белки являются прогностическими факторами выживаемости и метастазирования при раке молочной железы (патент № 2623869 <http://www.findpatent.ru/patent/262/2623869.html>, патент № 2632115 <http://www.findpatent.ru/patent/263/2632115.html>). За отчетный период на модели ОАМ было изучено влияние химиотерапевтических агентов флуороурацила и цисплатина на жизнеспособность и активацию провоспалительных, проангиогенных и скавенджинг-функций макрофагов. Было установлено, что флуороурацил практически подавляет жизнеспособность макрофагов, в то время как цисплатин вызывает их перепрограммирование. Методом ПЦР в режиме реального времени и иммуноферментного анализа было показано, что цисплатин стимулирует продукцию спектра провоспалительных цитокинов (IL1beta, IL6, IL8, TNFalpha) и изменяет профиль экспрессии про-ангиогенных факторов, увеличивая экспрессию VEGF и TGFbeta и снижая экспрессию YKL-40 в модельных ОАМ как рака груди, так и рака кишечника. Методом ПЦР в режиме реального времени и конфокальной микроскопии было показано, что цисплатин оказывал подавляющее действие на экспрессию скавенджер-рецепторов стабиллина-1, CD206 и CD163. Основным отличием между эффектом цисплатина на модельные опухолеассоциированные макрофаги рака груди и рака кишечника является снижение хитиназо-подобных белков YKL-39 и SI-CLP в раке кишечника и отсутствие этого эффекта в раке груди. В рамках Проекта было ранее установлено, что YKL-39 является про-ангиогенным фактором и хемоаттрактантом для моноцитов, способствующим метастазированию. Более того, мы обнаружили, что у пациентов с РМЖ повышенный уровень генной экспрессии YKL-39 после НАХТ указывал на высокий риск метастазирования и плохой ответ на химиотерапию. Наши данные позволяют предположить, что в раке кишечника

цисплатин оказывает дополнительное противоопухолевое действие, снижая экспрессию YKL-39.

Далее методом секвенирования следующего поколения было впервые установлено глобальное влияние химиотерапевтических агентов на транскрипционный профиль модельных опухолеассоциированных макрофагов. Биоинформатический анализ был проведен с помощью программы fgsea (<https://www.biorxiv.org/content/early/2016/06/20/060012>), по которой проводили обогащение по биохимическим и регуляторным путям с использованием списков генов, рассортированных по уровню экспрессии и p-value. Для эксперимента использовали базы данных Hallmark gene sets, Reactome, KEGG. Были получены уникальные данные, показывающие, что основными группами генов, активированными цисплатином являются гены, вовлеченные в воспалительный ответ, интерферон-зависимые пути, p53-зависимый апоптоз, генов, отвечающих на репарацию ДНК. Подавляющее действие цисплатин оказывал на экспрессию генов, вовлеченных в метаболизм липидов и жирных кислот, гомеостаз холестерина, окислительное фосфорилирование, MTORC1 сигналинг, NOTCH сигналинг, что указывает на то, что под воздействием химиотерапевтического агента изменяется метаболизм макрофагов в сторону ингибирования, главным образом, обмена жирных кислот. Данный подход позволил выявить как общие механизмы, так и различия программирующего действия химиотерапевтических агентов на модельные макрофаги 2 типа (ОАМ) карциномы молочной железы и аденокарциномы кишечника человека. Наиболее выраженными отличиями являлись стимуляция цисплатином генов протоонкогена KRAS сигнального пути, активация регуляторного фактора интерферона IRF7, ДНК репарации и подавление цисплатином системы ангиогенеза, гликолиза, метаболизма глюкозы, гипоксии, инсулинового обмена, активации тромбоцитов, эпителиально-мезенхимального перехода в опухолеассоциированных макрофагах аденокарциномы кишечника. В ОАМ карциномы молочной железы больше активировались пути, связанные с рецептором, сопряженным с G-белком (передача сигнала в клетке), эпителиально-мезенхимального перехода, подавлялась активность путей протоонкогенного белка MYC, метаболизма РНК, в том числе мРНК, регуляции трансляции, регуляция митохондриального транспорта.

Было установлено, что, по данным как секвенирования следующего поколения, так и данным анализа отдельных генов методом ПЦР, ответ макрофагов на цисплатин имеет большое сходство с противовирусным ответом и может вызывать активацию воспалительной программы противоопухолевой направленности. Однако, на уровне отдельных генов было показано, что цисплатин может оказывать также активацию про-опухолевой программы, повышая продукцию цитокинов, стимулирующих привлечение иммуносупрессорных клеток, поддерживающих выживание стволовых раковых клеток, подавляющих антигенную презентацию. Цисплатин приводил к изменению баланса продукции про-ангиогенных факторов (повышение продукции VEGF, снижение продукции YKL-39 и YKL-40), что может влиять на эффективность опухолевого ангиогенеза.

На клиническом материале, взятом от онкологических больных с раком кишечника, был проведен иммуногистохимический и конфокально-микроскопический анализ и было показано, что в группе больных с хорошим эффектом на неoadъювантную химиотерапию (НАХТ) реже обнаруживаются клетки воспалительного инфильтрата с позитивной экспрессией про-ангиогенного хитиназо-подобного белка YKL-40, располагающегося в участках с нежнволокнуистой стромой. В то же время, в группе больных с хорошим ответом на НАХТ обнаруживается более интенсивная экспрессия стабилина-1 и хитиназо-подобного белка SI-CLP, что соответствует обнаруженному нами ранее негативному эффекту SI-CLP на хемотаксис моноцитов как возможному механизму противоопухолевого действия SI-CLP-секретирующих МАО. Также показано, что уровень экспрессии маркеров CCL18 и YKL-39, определяющие присутствие M2 фенотипа макрофагов в опухоли, коррелируют с ухудшением ответа на НАХТ у пациентов с раком молочной железы. На основе этих данных подана патентная заявка.

Таким образом, установлено, что опухолеассоциированные макрофаги могут быть перепрограммированы химиотерапевтическими агентами. Наиболее выраженными и принципиальными для опухолевой прогрессии отличиями в ответе на химиотерапевтический агент модельных ОАМ рака кишечника по сравнению с ОАМ рака молочной железы были: усиленный воспалительный ответ и специфическое подавление части про-ангиогенной программы. Также показано, что все три хитиназо-подобных белка SI-CLP, YKL-39 и YKL-40 имеют прогностическое значение для предсказания ответа опухоли на химиотерапевтическое воздействие, что соответствует основным функциям хитиназо-подобных белков.

Результаты исследований опубликованы в научных журналах, индексируемых в базах данных «Сеть науки» (Web of Science) или «Скопус» (Scopus), а также представлены на международных и всероссийских конференциях:

1) Mitrofanova I., Zavyalova M., Riabov V., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. The effect of neoadjuvant chemotherapy on the correlation of tumor-associated macrophages with CD31 and LYVE-1. Immunobiology (2018 г.) <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298517302000>

2) Liu T., Mitrofanova I., Litviakov N., Riabov V., Zavyalova M., Tsyganov M., Buldakov M., Song B., Moganti K., Kazantseva P., Slonimskaya E., Kremmer E., Flatley A., Klüter H., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. Tumor-associated macrophages in human breast cancer produce new monocyte attracting and pro-angiogenic factor YKL-39 indicative for increased metastasis after neoadjuvant chemotherapy OncoImmunology (2018 г.) – находится на рецензии.

3) Чердынцева Н.В., Митрофанова И.В., Булдаков М.А., Стахеева М.Н., Патышева М.Р., Завьялова М.В., Кжышковска Ю.Г. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии. Бюллетень сибирской медицины. 2017; 16 (4):60-73.

4) Litviakov N., Tsyganov M., Mitrofanova I., Deryusheva I., Kazantseva P., Slonimskaya E., Frolova I., Choinzonov E., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. Expression of M2 macrophage markers YKL-39 and CCL18 in breast cancer is associated with the effect of neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (2018 г.) – находится на рецензии.

5) I. Mitrofanova, M. Zavyalova, M. Buldakov, N. Cherdyntseva, J. Kzhyshkowska. Effect of neoadjuvant chemotherapy on correlation of tumor-associated macrophages with angiogenesis and lymphangiogenesis in human breast cancer *Annals of Oncology*. 2017, p.581-582.

[https://academic.oup.com/annonc/article/28/suppl\\_5/mdx390.027/4109697?searchresult=1](https://academic.oup.com/annonc/article/28/suppl_5/mdx390.027/4109697?searchresult=1)

6) Mitrofanova I., Liu T., Zavyalova M., Litviakov N., Buldakov M., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. YKL-39 induces monocytes migration and angiogenesis and inversely correlates with metastasis in patients with breast cancer. *Annals of Oncology* 2017, p.580.

[https://academic.oup.com/annonc/article/28/suppl\\_5/mdx390.022/4109692](https://academic.oup.com/annonc/article/28/suppl_5/mdx390.022/4109692)

7) Kzhyshkowska J, Mitrofanova I, Liu T., Zavyalova M, Litviakov N, Buldakov M, Cherdyntseva N. Modulation of the immune component of the tumor microenvironment: perspectives for personalized cancer therapy *EPMA Journal* (2017 г.).

<https://link.springer.com/article/10.1007/s13167-017-0108-4>

8) Митрофанова И.В., Крахмаль Н.В., Дронова Т.А., Булдаков М.А. Связь хитиназоподобного белка YKL-39 с процессами ангиогенеза при злокачественном росте Сборник материалов XII Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева. Издательство: Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск. 2017; стр.83-85.

[http://www.tnimc.ru/upload/publications/proceedings/2017\\_proc\\_young.pdf](http://www.tnimc.ru/upload/publications/proceedings/2017_proc_young.pdf)

Получены патенты на изобретение:

9) Кжышковска Ю.Г., Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В., Завьялова М.В., Слонимская Е.М., Цыганов М.М., Митрофанова И.В., Григорьева Е.С. Способ прогнозирования пятилетней безметастатической выживаемости у больных раком молочной железы на основе экспрессии генов белков YKL-39 и CCL18 (2017 г.). (Подана патентная заявка).

10) Крахмаль Н.В., Слонимская Е.М., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Кжышковска Ю.Г., Митрофанова И.В., Цыганов М.М. Способ прогнозирования безрецидивной выживаемости у больных раком молочной железы (патент № 2623869 <http://www.findpatent.ru/patent/262/2623869.html>)

11) Крахмаль Н.В., Слонимская Е.М., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Кжышковска Ю.Г., Митрофанова И.В., Цыганов М.М. Способ прогнозирования риска лимфогенного метастазирования при раке молочной железы на основе экспрессии гена белка ykl-39 (патент № 2632115 <http://www.findpatent.ru/patent/263/2632115.html>)