

Сведения о ходе выполнения проекта
**«Молекулярный механизм действия регуляторных белков макрофагов второго
типа на формирование опухолевого микроокружения и прогрессию опухолей»**
поддержанного Российским научным фондом

Соглашение № 14-15-00350

Руководитель д-р биол. наук Кжышковска Юлия Георгиевна

2014 год

С целью разработки модельной системы функционального анализа человеческих макрофагов, ассоциированных с опухолью (MAO), была разработана клеточная система *in vitro*. Были подобраны культуральные условия стимуляции цитокинами и кондиционированной средой опухолевых клеточных линий для получения 3 типов MAO в культуре: MAO, специфичных для рака груди, рака кишечника и рака печени. Проведен анализ экспрессии стабиллина-1, SI-CLP и YKL39 в различных типах MAO в культуре. Установлено, что стабиллин-1, SI-CLP и YKL39 экспрессируются во всех трех типах MAO в культуральных условиях, но в различных соотношениях. Так как TGFbeta известен на настоящий момент как основной фактор, выделяемый опухолевыми клетками и влияющий на формирование MAO, был проанализирован эффект TGFbeta на экспрессию стабиллина-1, YKL39, SI-CLP и YKL-40. Установлено, что TGFbeta активирует экспрессию стабиллина-1 и YKL39. Экспрессия стабиллина-1 также активировалась IL-4, в то время, как экспрессия YKL39 специфически активировалась TGFbeta. Было установлено, что YKL39 является высокоспецифичным биомаркером ответа макрофагов на TGFbeta в опухолевом микроокружении. Нами обнаружен новый тип TGFbeta-индуцируемого сигналинга через Smad1/5, приводящего к инициации программы хронического воспаления в макрофагах 2 типа, что открывает новые перспективы для понимания роли MAO в опухолевой прогрессии. При помощи конфокальной микроскопии были установлены основные внутриклеточные типы локализаций для стабиллина-1 (ранние эндосомы и транс-Гольджи), YKL39 (ядро и секреторные везикулы), и SI-CLP (транс-Гольджи и лизосомы) в модели макрофагов 2 типа. С целью анализа роли SI-CLP и YKL39 в активации MAO получены клеточные линии для производства и очистки биологически активных человеческих SI-CLP и YKL39, и охарактеризована секреция SI-CLP и YKL39. Данные клеточные линии позволяют так же изучить молекулярный механизм секреции SI-CLP и YKL39. Методом иммуногистохимии была показана экспрессия M2 маркеров стабиллина-1, SI-CLP и YKL39 в образцах опухолей карциномы молочной железы, карциномы кишечника и гепатоцеллюлярной карциномы человека. В случаях с аденокарциномой молочной железы обнаружена обратная корреляция между размером новообразования, уровнем лимфогенного метастазирования и выраженностью экспрессии CD68 в клетках воспалительного инфильтрата, располагающихся в просвете опухолевых структур. Методом двойных и тройных иммунофлюоресцентных окрасок и конфокальной микроскопии было показано, что для каждой опухоли характерны специфические субпопуляции макрофагов 2 типа. Было установлено, что количество CD68+SI-CLP+ и уровень экспрессии SI-CLP+ в CD68+ макрофагах повышены в образцах карциномы молочной железы и гепатоцеллюлярной карциномы относительно количества в образцах карциномы сигмовидной кишки. Количество CD68+YKL39+ и уровень экспрессии YKL39+ в CD68+ макрофагах повышены в образцах карциномы кишечника и гепатоцеллюлярной карциномы относительно образцов карциномы молочной железы.

Данные, полученные при помощи конфокально-микроскопического анализа образцов человеческих опухолей, соответствовали данным, полученным на отработанной нами модели МАО в клеточной культуре. Важным результатом явилось обнаружение трех субпопуляций макрофагов CD68+стабилин-1-, CD68+стабилин-1+ и CD68-стабилин-1+ в образцах карциномы молочной железы, кишечника и печени. Данные субпопуляции обнаруживались во всех типах опухолей, но в разных количественных соотношениях. Установление ассоциации субпопуляций макрофагов 2 типа с клиническими параметрами роста и метастазирования опухолей молочной железы, кишечника и печени является перспективной задачей на следующем этапе проекта.