

Сведения о выполненных работах в 2022 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 Кжышковска Юлия Георгиевна, д-р биол. наук

Данные, полученные ранее в рамках проекта РНФ (2019-2021 гг.) в результате полнотранскриптомного секвенирования и ПЦР валидации профиля моноцитов больных раком ободочной кишки (РОК) и раком прямой кишки (РПК) RT-PCR позволили нам впервые идентифицировать специфическую повышенную регуляцию гликолитического активатора PFKFB3 у пациентов с раком ободочной кишки по сравнению со здоровыми донорами и пациентами с раком прямой кишки. Наши данные впервые продемонстрировали, что моноциты пациентов с раком ободочной кишки реагируют на развитие опухоли значительными изменениями транскриптома, связанными как с про-воспалительным программированием, так и с изменением метаболизма. Принципиальной находкой, сделанной за период 2019-2021 гг. было значительное повышение экспрессии PFKFB3 в моноцитах пациентов с раком ободочной кишки. Более того, конфокальная микроскопия показала, что PFKFB3-положительные моноциты, которые являются предшественниками ОАМ, массово инфильтрируют опухолевую массу у пациентов с раком ободочной кишки. Эти данные вошли в публикацию *Frontiers in Immunology* (IF 8,6), <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1080501/abstract>).

В течение этого отчетного периода нами была проведена оценка белковой экспрессии PFKFB3 в опухолевой ткани больных РОК и РПК, был проведен анализ секвенирования единичных клеток (моноцитов) больных КРР и доноров, определен метаболом моноцитов больных КРР, а также в системе *in vitro* проведен анализ экспрессии PFKFB3 при стимуляции различными про-воспалительными и опухолеассоциированными факторами.

При помощи количественной ИГХ нами было выявлено, экспрессия PFKFB3 была статистически значимо выше у пациентов с РОК, по сравнению с экспрессией в РПК, что соответствует нашему предположению о том, что PFKFB3 может быть значимым клиническим фактором именно в РОК, а не в РПК. С помощью корреляционного анализа было выявлено, что экспрессия PFKFB3 у пациентов с КРР статистически значимо связана с экспрессией CD68 ($p < 0,05$, $r = 0,2$). Было также показано, что уровень белковой экспрессии PFKFB3 у пациентов с доброкачественными новообразованиями кишечника значительно выше, чем у пациентов с колоректальным раком. Как у пациентов с РПК, так и у пациентов с РОК наблюдалась схожая тенденция при сравнении экспрессии PFKFB3 с доброкачественными новообразованиями кишки.

Далее нами использовались данные атласа генома рака (TCGA) для изучения анализа генной экспрессии PFKFB3 в опухолевой ткани больных КРР с параметрами выживаемости. Высокий уровень экспрессии PFKFB3 был достоверно ассоциирован с рецидивами у больных КРР. Такая же тенденция была обнаружена для рака ободочной кишки, но не для рака прямой кишки. Более того, экспрессия PFKFB3 повышалась у пациентов с раком ободочной кишки с большим размером опухоли (Т3-4) по сравнению с пациентами с меньшим размером опухоли (Т1-2). Показатели общей и безрецидивной выживаемости в группе больных с низким PFKFB3 были выше, чем в группе с высоким PFKFB3. В когорте рака прямой кишки PFKFB3 не был значимо связан с исходом. Таким образом, уровень экспрессии PFKFB3 в опухолевой ткани может быть использован как прогностический фактор возникновения рецидива опухоли и неблагоприятного исхода у больных раком ободочной кишки, но не раком прямой кишки.

Анализ результатов пространственного транскриптомного анализа, полученные при помощи технологии Nanostring GeoMx-DSP, продемонстрировал, что экспрессия PFKFB3 сильно коррелирует с экспрессией CD14 (маркер моноцитов), CD163 (маркер моноцитов и незрелых макрофагов, происходящих из моноцитов) и маркерами-рецепторами M2 поляризации: CD206 [MRC1], CD204 [MSR1] и MARCO. При раке прямой кишки обнаружена корреляция экспрессии PFKFB3 с CD14, но не с M2 маркерами. Интересно, что обогащение опухолевой ткани макрофагами и моноцитами было более выраженным при раке ободочной кишки по сравнению с раком прямой кишки.

Далее, биоинформатический анализ результатов секвенирования единичных клеток позволил идентифицировать три кластера, которые являются разными генерациями общего пула CD14⁺ моноцитов и не дифференцируются один из другого. Для одного из кластеров выявлено обогащение транскриптами комплекса HLA-DR (HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DPB1, HLA-DRB1 и CD74), отвечающими за антиген-презентирующую функцию клеток и соответствующими молекулярными путями. Второй кластер отличался повышенной экспрессией генов S100A, причем S100A8, S100A9, S100A12, что характерно для процесса дегрануляции моноцитов и нейтрофилов, предшествующей миграции этих клеток через эндотелий из сосудов в ткань. Наименее малочисленный кластер характеризовался экспрессией генов IFIT1, IFIT3 и SIGLEC1 и обогащенных молекулярных путей, вовлеченных в реализацию про-воспалительной программы моноцитов. Анализ дифференциальной экспрессии между моноцитами больных КРР и здоровыми донорами выявил значимое увеличение экспрессии гена PFKFB3 в CD14⁺ моноцитах больных КРР, что согласуется с результатами проекта, полученными нами при проведении РНК секвенирования в общей популяции CD14⁺ клеток.

Метаболомный анализ моноцитов больных КРР выявил четыре аминокислоты (аргинин, пролин, тирозин и лизин) и 18 липидов, уровни которых статистически значимо отличаются в моноцитах пациентов с КРР от моноцитов здоровых доноров. Обнаруженные изменения содержания аминокислот и липидов в моноцитах могут свидетельствовать о влиянии опухолевых процессов не только на микроокружение,

но и опосредованно на отдаленных участников иммунной системы. На основании найденных отличий была предложена модель, позволяющая диагностировать КРР по аминокислотному или липидному профилю моноцитов.

В системе *in vitro* мы показали, что экспрессия PFKFB3 статистически значимо понижается при добавлении к не стимулированным макрофагам (M0) фактора M2-поляризации макрофагов IL-4. При стимуляции M0 макрофагов IFNg (M1-поляризационный фактор), наоборот, была тенденция к увеличению экспрессии PFKFB3. Интересно, что образцы кондиционированной среды (опухолевые супернатанты) клеток КРР (Caco2), с помощью которых были получены модельные опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) *in vitro*, значительно стимулировали экспрессию PFKFB3. При стимуляции M0 макрофагов IL-10, LPS, S100A4, EGF, TGFb и SPP1 статистически значимых отличий не наблюдалось. В системе IFNg-стимулированных M1 макрофагов экспрессия PFKFB3 статистически значимо ингибировалась под влиянием LPS, и наблюдалась тенденция к статистически значимому снижению PFKFB3 экспрессии под влиянием M2 противовоспалительного маркера IL-10 и про-ангиогенного фактора SPP1. Однако, в системе IL-4-стимулированных M2 макрофагов, добавление SPP1, наоборот, стимулировало экспрессию PFKFB3. Интересно, что опухолевые супернатанты повышали экспрессию PFKFB3, однако в самих модельных ОАМ, стимулированных опухолевыми супернатантами, ни один из факторов не показал дополнительной активации PFKFB3 экспрессии.