



На правах рукописи

Ларионова Ирина Валерьевна

ФЕНОТИП ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ РАКА МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ И РАКА ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ И
ХИМИОТЕРАПИИ

14.01.12 – онкология

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Научные руководители:

Кжышковска Юлия Георгиевна,
доктор биологических наук, профессор

Чердынцева Надежда Викторовна,
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Официальные оппоненты:

Уразова Ольга Ивановна

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической физиологии, заведующий кафедрой

Войцицкий Владимир Евгеньевич

доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра онкологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, г.Москва.

Защита состоится «__» _____ 2019 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.279.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу: г.Томск, ул. Савиных 12/1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://www.tnimc.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Фролова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Опухоль представляет собой сложную систему взаимодействий трансформированных клеток с окружающим гетерогенным клеточным и молекулярным микроокружением, которое влияет на ключевые свойства клеток опухоли, способствующие прогрессированию процесса, а также ее ответу на химиотерапию. В свою очередь, злокачественные клетки изменяют фенотип и функционал инфильтрирующих клеток и стромы для выживания и ухода из-под иммунного надзора (Fridman W.H., 2017; Egeblad M. et al., 2010; Balkwill F.R. et al., 2012).

Разнообразие вариантов воспаления в опухоли обусловлено преимущественным развитием в ней Th1 или Th2 типа иммунных реакций и связанных с ними M1 и M2 вариантами соответственно про- или противоопухолевой дифференцировки макрофагов (Mills C.D., 2015; Gordon S. and Mantovani A., 2011; Qian B.Z. and Pollard J.W., 2010).

Опухолоассоциированные макрофаги (ОАМ) являются основными клетками врожденного иммунитета, которые регулируют взаимоотношения инфильтрирующих иммунокомпетентных клеток с трансформированными клетками и с другими компонентами микроокружения, а также пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез, процессы диссеминации (Noy R., Pollard J.W., 2014; Riabov V., et al., 2014). Изучение их специфической поляризации показало, что ОАМ могут быть представлены M2-подобными макрофагами (Yang L. and Zhang Y., 2017; Fujimura T., et al., 2018). Установлено, что при многих злокачественных новообразованиях ОАМ способствуют росту опухоли и ангиогенезу, стимулируют миграцию и инвазию опухолевых клеток и участвуют в образовании метастатических ниш (Larionova I., et al., 2018; Mantovani A., et al., 2017; Qian B.Z., Pollard J.W., 2010). Высокая пластичность макрофагов в отношении изменения их поляризации под воздействием различных условий микроокружения открывает перспективы направленной дифференцировки макрофагов в противоопухолевый M1-фенотип или блокирования M2-поляризации.

В последние годы получены данные о вовлечении хитиназо-подобных белков в функционирование ОАМ. Хитиназо-подобные белки (ХПБ) – новый класс белков, относящихся к семейству Glyco_18 домен-содержащих белков, играющих важную роль в процессах воспаления (Sutherland T.E., 2018). У человека идентифицировано три хитиназо-подобных белка: YKL-40 (CHI3L1), YKL-39 (CHI3L2) и стабилин-1-взаимодействующий хитиназо-подобный белок (SI-CLP) (Kzhyshkowska J. et al., 2015, Ларионова И.В. и др., 2018). Наиболее исследованным является YKL-40, прогностическая роль которого была показана для ряда опухолей (Shao R., 2013; Jefri M., et al., 2015; Francescone R.A., et al., 2011; Xu et al., 2014). Однако, роль YKL-39 и SI-CLP в опухолевой прогрессии практически не изучена, и сведения о молекулярных механизмах действия этих ХПБ фрагментарны. Было показано, что секреция SI-CLP и YKL-39, по крайней мере, частично зависит от их транспорта в секреторные лизосомы, опосредованного стабилином-1, сквенджер рецептором M2-подобных ОАМ (Kzhyshkowska J. et al., 2006; Liu T. et al., 2018). Как известно, макрофаги способны регулировать опухолевое микроокружение посредством поглощения и внутриклеточного сортировки различных компонентов микроокружения, таких как цитокины, факторы роста, компоненты внеклеточного матрикса и других важных регуляторов опухолевого роста.

Изучение популяций макрофагов, несущих разные молекулы ХПБ, которые являются потенциальными регуляторами их функции, даст возможность идентифицировать дополнительно к M1 и M2 фенотипы ОАМ, функционально вовлеченные в опухолевую прогрессию и ответ на НАХТ, которые могут иметь маркерную значимость или служить мишенями для таргетного воздействия.

Функциональная активность разных субпопуляций макрофагов в существенной мере зависит от их локализации в опухолевом очаге, поскольку существует феномен

гетерогенности взаимоотношений клеток опухоли и микроокружения, и характер этих взаимодействий может определять особенности функционального статуса макрофагов, способного меняться в зависимости от условий. Для рака молочной железы и рака толстой кишки этот феномен описан М.В.Завьяловой и соавт. (Zavjalova M. et al, 2017).

Терапевтическая чувствительность опухолей также существенно зависит от сложного взаимодействия опухолевых клеток с различными компонентами микроокружения опухоли, особенно с иммунными клетками (Senthebane D.A. et al., 2017; Baghdadi M. et al., 2012; Stakheyeva M. et al., 2017). Недавние исследования показали, что макрофаги способствуют снижению эффективности химиотерапии (ХТ) и опухолевой прогрессии после химиотерапии следующими путями: активируют реваскуляризацию опухоли, подавляют цитотоксические Т-клетки и активируют антиапоптотическую программу в опухолевых клетках (Larionova I., et al., 2018; Ruffell B and Coussens L.M., 2015; Senthebane D.A. et al., 2017). Однако механизмы прямого действия химиотерапевтических препаратов на ОАМ остаются пока не изучены.

Установлено, что противоопухолевая терапия вызывает рекрутирование моноцитов в опухолевый сайт, в котором располагаются поврежденные химиотерапией клетки и который моноциты воспринимают как незаживающую рану, подлежащую восстановлению (Owen W. et al., 2009; Ireland L.V. and Mielgo A., 2018). В этом случае инфильтрирующие опухоль макрофаги запускают регенеративную программу, которая поддерживает пролиферацию опухолевых клеток (Wynn T.A. et al., 2016). Однако есть сведения о возможности формирования адаптивного иммунного ответа на клетки опухоли при использовании препаратов, вызывающих иммуногенную гибель опухолевых клеток (Zitvogel, et al, 2014). В этой связи актуально исследовать, каким образом меняется функциональная программа ОАМ при химиотерапии и каковы возможные механизмы реализации модулирующего влияния ОАМ на эффективность лечения. Пластичность функциональной активности макрофагов, гетерогенность характера взаимодействия микроокружения и опухоли предполагает возможности реализации проопухолевого либо противоопухолевого поведения макрофагов у разных индивидуумов. Назрела необходимость исследований для понимания механизма взаимодействия ОАМ и химиотерапевтических агентов с целью прогнозирования эффективности химиотерапии и разработки терапевтических схем, усиливающих противоопухолевую или ингибирующих проопухолевую активность ОАМ.

Степень разработанности темы исследования

Изучению ассоциаций маркеров ОАМ с опухолевой прогрессией и ответом опухоли на терапию при различных злокачественных новообразованиях посвящено немало исследований (Sugimura K. et al., 2015; Malesci A. et al., 2017; Zhang H. et al., 2015; Yafei Z. et al., 2016). Однако в приведенных авторами результатах исследований используются в большинстве случаев только маркеры двух основных изученных М1 и М2 субпопуляций макрофагов (Chen X. et al., 2017; Aljabery F. et al., 2018; Cheng Z. et al., 2010; Bögels M. et al., 2012), которые не в полной мере отражают всю гетерогенность макрофагов в опухолевом микроокружении. В связи с этим целесообразен поиск новых маркеров макрофагов, которые отражали бы функционально новые фенотипы, связанные с ключевыми процессами опухолевого роста и с эффективностью химиотерапии. Это делает актуальным исследование роли хитиназо-подобных белков в прогрессии опухолей и их вовлечения в эффект химиотерапии. Макрофаги обладают выраженной фенотипической пластичностью. Каждый из многочисленных фенотипических подтипов макрофагов формируется под влиянием совокупности цитокиновых воздействий в его микроокружении. Микроокружением макрофагов в опухоли выступает строма, при этом рыхлая неоформленная соединительная ткань потенциально является более полноценным депо цитокинов, продуцируемых клетками иммунно-воспалительного инфильтрата и воздействующих на макрофаги, определяя разнообразие их функционального статуса,

который может меняться в зависимости от окружающих условий. В грубоволокнистой соединительной ткани эти процессы резко ограничены. Подобное разделение стромы приемлемо для любого типа, подтипа, любой нозологической формы опухолей. Для рака молочной железы и толстой кишки морфологи Томского НИИ онкологии предложили классификацию таких компартментов, подробно представленную в описании методических подходов (Завьялова М.В., 2017).

Рак молочной железы (РМЖ) – гетерогенное заболевание. Общепринятая классификация РМЖ на молекулярные подтипы проводится на основе оценки рецепторов к эстрогенам и прогестерону, эпидермальному фактору роста, разные подтипы имеют разную чувствительность к гормоно- или цитостатической терапии, что позволяет дифференцировано назначать терапию и определять прогноз заболевания. Однако следует отметить, что нередко гетерогенность рецепторного статуса в одной и той же опухоли достигает 50% (Вторушин С.В., 2014), до 30% пациентов не имеет положительного результата от лечения, что указывает на возможность ошибочной диагностики подтипов. В литературе нет данных о функциональных различиях разных молекулярных подтипов РМЖ как источников цитокинов для программирования функционального статуса и характера поляризации макрофагов, не изучен этот вопрос для разных субтипов рака толстого кишечника (РТК). В предварительных собственных исследованиях мы не обнаружили существенных различий в экспрессии изучаемых нами маркеров в опухолях молочной железы разных молекулярных подтипов. В связи с этим мы сочли корректным рассматривать в качестве группирующих факторов не молекулярные подтипы РМЖ или нозологические варианты РТК, а состояние стромы, принимающей участие в формировании функционального статуса макрофагов.

Многочисленные сведения о вовлечении иммунной системы в уничтожение опухолевых клеток в условиях конвенциональной терапии химиопрепаратами, которые приводят к иммуногенной гибели клеток, делают актуальными исследования по изучению механизмов влияния (программирующего действия) ХТ на макрофаги для выявления точек приложения возможных иммуномодулирующих воздействий.

На сегодняшний день большая часть исследований направлена на изучение влияния ХТ агентов на M1 или M2 фенотип без выявления особенностей функционального программирования макрофагов (Dijkgraaf E.M. et al., 2013; Kroemer G. et al., 2013; Lagionova I., et al., 2018). Полное исследование функционального программирования ОАМ под влиянием ХТ с использованием транскриптомного секвенирования может обозначить механизмы вовлечения макрофагов в ответ опухоли на ХТ. В нашей работе в качестве химиотерапевтического агента был выбран цисплатин как препарат с генотоксическим действием, обеспечивающим иммуногенную гибель клеток опухоли (повреждение ДНК) и возможности распознавания неоантигенов иммунной системой с формированием адаптивного противоопухолевого ответа. Эта модель раскрывает механизмы регуляции функций макрофагов под влиянием химиопрепаратов такого рода.

Таким образом, современный этап изучения ОАМ определяется возросшим интересом к поиску маркеров макрофагов, характеризующих функционально разные субпопуляции, ассоциированные с опухолевой прогрессией и эффективностью химиотерапии, которые могут обозначить и потенциальные мишени для иммунотерапии.

Цель: Установить взаимосвязь фенотипа опухолеассоциированных макрофагов с опухолевой прогрессией и эффективностью химиотерапии и оценить влияние химиотерапии на функциональные характеристики и транскрипционный профиль модельных макрофагов рака молочной железы и рака толстого кишечника.

Задачи:

- 1) Выявить взаимосвязь различных субпопуляций ОАМ в опухолевых образцах рака молочной железы и рака толстого кишечника с проявлениями опухолевой прогрессии (лимфогенное и отдаленное метастазирование, рецидивирование, выживаемость без прогрессирования) с учетом их локализации в компартментах опухоли с разным состоянием стромально-воспалительного и паренхиматозного компонентов.
- 2) Установить ассоциацию различных субпопуляций ОАМ в опухолевых образцах рака молочной железы и рака толстого кишечника с ответом на неоадьювантную химиотерапию с учетом их локализации в компартментах опухоли с разным состоянием стромально-воспалительного и паренхиматозного компонентов.
- 3) Провести анализ функционального программирования модельных ОАМ рака молочной железы и рака толстого кишечника под влиянием цисплатина методом высокопроизводительного полно-транскриптомного секвенирования.
- 4) На основе биоинформатического анализа результатов секвенирования выявить гены ответной реакции модельных ОАМ рака молочной железы и рака толстого кишечника на химиотерапевтическое воздействие и проанализировать экспрессию кодируемых ими белковых продуктов *in situ* в опухолях человека.
- 5) Оценить влияние цисплатина на способность макрофагов эндцитировать регуляторные компоненты опухолевого микроокружения рака молочной железы и рака толстого кишечника.

Научная новизна

Впервые получены данные о связи специфических субпопуляций макрофагов, ассоциированных с хитиназо-подобными белками YKL-39 и SI-CLP, с проявлениями опухолевой прогрессии (лимфогенное и отдаленное метастазирование, выживаемость без прогрессирования) при раке молочной железы и раке толстого кишечника в зависимости от их функциональных характеристик (фенотипа макрофагов). При раке молочной железы выявлены разные закономерности связи ОАМ с клинико-морфологическими характеристиками процесса, зависящие от локализации макрофагов в определенных компартментах опухоли с особенностями состояния паренхиматозного и стромально-воспалительного компонентов. Показано, что инфильтрация CD68+ макрофагов в просветах опухолевых протоков и среди паренхиматозных элементов ассоциирована с отсутствием лимфогенных метастазов, а SI-CLP+ макрофагов, локализованных в нежно-волокнутой строме, сопряжена с наличием лимфогенного метастазирования. У больных РМЖ без метастазов в лимфоузлы низкий уровень инфильтрации CD68+ макрофагами связан с более продолжительной выживаемостью. Впервые выявлено, что высокий уровень экспрессии YKL-39 в макрофагах у больных раком толстого кишечника без предоперационного лечения ассоциирован с отсутствием лимфогенных метастазов и низким риском отдаленного метастазирования.

Получены новые данные о связи специфических макрофагальных субпопуляций с ответом опухоли на неоадьювантную химиотерапию при раке молочной железы и раке толстого кишечника в зависимости от их функциональных характеристик и локализации в опухоли с учетом состояния стромально-воспалительного и паренхиматозного компонентов. Выявлено, что у больных раком молочной железы, получавших неоадьювантную химиотерапию, высокое количество YKL-39-позитивных макрофагов в нежно-волокнутой строме и SI-CLP+ макрофагов в общем инфилtrate опухоли связано с отсутствием объективного ответа на неоадьювантную химиотерапию. В то же время высокая экспрессия YKL-39 в общем инфилtrate опухоли и высокая экспрессия стабиллина-1 в нежно-волокнутой строме у больных раком толстого кишечника связана с объективным ответом на неоадьювантную химиотерапию. Полученные результаты позволили выявить новые субпопуляции макрофагов, на основе которых могут быть

разработаны потенциальные маркеры опухолевой прогрессии и ответа опухоли на химиотерапию.

Получены новые данные о механизмах перепрограммирования ОАМ под влиянием химиотерапевтического агента цисплатина на основе оценки транскрипционного профиля ОАМ при помощи высокопроизводительного секвенирования. Используемый подход позволил выявить как общие механизмы, так и различия характера программирующего действия цисплатина на фенотип и функциональные особенности модельных макрофагов 2 типа аденокарциномы молочной железы и аденокарциномы толстого кишечника человека. Выявлено, что на транскрипционном уровне под влиянием цисплатина активируются программы хронического воспаления, про-апоптотическая программа, нарушается липидный обмен и процессы эндоцитоза. В макрофагах рака молочной железы активируется в большей степени про-опухолевая программа, в виду активации генов, поддерживающих M2 поляризацию. В макрофагах рака толстого кишечника отмечен дисбаланс экспрессии генов, регулирующих процессы ангиогенеза и кодирующих цитокины, хемокины, ростовые факторы, способные влиять на формирование сосудов, ингибированы гены, вовлеченные в процессы M2 поляризации.

Впервые определены перспективные белковые маркеры ответа макрофагов на воздействие цисплатином, ассоциированные с лимфогенным метастазированием и отсутствием объективного ответа на неoadъювантную химиотерапию. Маркерами неэффективности химиотерапии препаратами платины при раке молочной железы является экспрессия TRAIL и SPP1. В группе больных раком толстого кишечника, получавших цисплатин в схеме HAXT, отмечается высокая белковая экспрессия маркеров MX1, TNFSF10, CXCL10, IRF7, SPP1, которая соответствует повышенной экспрессии кодирующих их генов в модельной системе опухолеассоциированных макрофагов *in vitro*.

В работе впервые показано, что цисплатин нарушает в ОАМ механизм регуляции взаимодействия опухолевого микроокружения с опухолевыми клетками через ингибирование клиренса про-опухолевого фактора – эпидермального фактора роста (EGF). Выявлен механизм нарушения эндоцитоза под влиянием цисплатина, который приводит к нарушению гомеостатического баланса опухоли в ответ на цисплатин и который сопряжен с ингибированием экспрессии генов STX8, DENND1A, EHD1, DNM3, вовлеченных в рецептор-опосредованную интернализацию лигандов, эндосомальный транспорт, образование транспортных везикул.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные новые фундаментальные данные о взаимоотношениях специфических субпопуляций ОАМ, ассоциированных с хитиназо-подобными белками YKL-39 и SI-CLP, с проявлениями опухолевой прогрессии и эффективностью неoadъювантной химиотерапии в перспективе могут быть использованы для разработки критериев прогноза и стратегии лечения при помощи иммуномодуляции макрофагов. У больных раком молочной железы высокий уровень YKL-39-позитивных макрофагов может являться предсказательным маркером неэффективности химиотерапии, а у больных раком толстого кишечника - маркером объективного ответа на химиотерапию. Это указывает на разные механизмы вовлечения YKL-39-позитивных макрофагов в прогрессию рака молочной железы и рака толстого кишечника.

Установленные маркеры ответа ОАМ на воздействие цисплатином могут стать потенциальными биомаркерами для предсказания ответа опухоли на химиотерапевтическое лечение. Так, TRAIL и SPP1 перспективны в отношении прогноза риска неэффективности химиотерапии препаратами платины у больных раком молочной железы. Выявление механизмов функционального программирования ОАМ под влиянием химиотерапии позволит выявить мишени для терапевтического воздействия и создавать новые подходы в лечении онкологических больных, основанные на сочетании химиопрепаратов и иммуномодулирующих агентов, с целью активации иммунного ответа

на опухоль. Синергическое действие этих модальностей повысит эффективность противоопухолевой терапии.

Выявленный механизм нарушения эндцитоза ОАМ под влиянием цисплатина, основанный на ингибировании поглощения про-опухолевого эпидермального фактора роста EGF, может быть использован в качестве мишени для регуляции гомеостатического баланса опухоли в ответ на химиотерапевтическое воздействие.

Методология и методы исследования

Методология включала оценку ассоциативных связей изучаемых показателей ОАМ с особенностями клинического течения заболевания и ответа на терапию у пациентов с опухолями для определения их возможной прогностической и предсказательной маркерной ценности, а также их вовлечения в опухолевую прогрессию. В качестве проявлений опухолевой прогрессии рассматривалось наличие метастазов в лимфатических узлах, возникновение гематогенных метастазов в отдаленном периоде наблюдения, снижение показателей выживаемости пациентов без прогрессирования процесса (ретроспективное исследование). Изучение молекулярных механизмов влияния цисплатина на функциональные свойства ОАМ проведено методом высокопроизводительного секвенирования с использованием макрофагов, специфически запрограммированных в модельной системе. Биоинформатический анализ выявленных при секвенировании высокоэкспрессированных или ингибированных генов позволил обозначить сигнальные пути, которые были валидированы на клинических образцах рака молочной железы и рака толстого кишечника на белковом уровне иммуногистохимическим методом и показали потенциальную маркерную значимость в отношении предсказания эффективности терапии.

Работа выполнена с применением современных методов, позволяющих решить поставленные задачи, и которыми в полной мере владеет соискатель: полнотранскриптомное секвенирование, биоинформатический поиск с использованием современных баз данных, иммунофлюоресцентный анализ и конфокальная микроскопия, иммуногистохимический анализ, проточная цитометрия, ПЦР в режиме реального времени, тест на эндцитоз, апоптоз и выживаемость *in vitro*, ведение культур клеток. Соискатель работал с медицинской документацией для формирования баз данных пациентов, вовлеченных в исследование.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Характер связи опухолеассоциированных макрофагов с проявлениями опухолевой прогрессии и эффективностью химиотерапии зависит от их функциональных характеристик (фенотипа) и от локализации в компартментах опухоли с разным состоянием стромально-воспалительного и паренхиматозного компонентов. Экспрессия хитиназо-подобных белков YKL-39, SI-CLP и стабиллина-1 макрофагами при раке молочной железы и раке толстого кишечника ассоциирована с клинико-морфологическими характеристиками злокачественного процесса и ответом на химиотерапию.
2. Химиотерапевтический агент цисплатин модулирует функциональную активность модельных ОАМ путем стимуляции или ингибирования сигнальных путей, различных при раке молочной железы и раке толстого кишечника. Общие различия включают активацию генов, участвующих в процессах регенерации и воспаления. В макрофагах рака молочной железы активируются гены, отвечающие за про-опухолевую поляризацию, для макрофагов рака толстого кишечника характерен дисбаланс экспрессии генов, регулирующих ангиогенез, выраженное ингибирование факторов M2 поляризации.
3. Высокая экспрессия белковых продуктов, кодируемых генами ответа макрофагов на цисплатин (MX1, TNFSF10, CXCL10, IRF7, SPP1) *in situ* в образцах опухоли

больных раком толстого кишечника, получавших препараты платины в схемах НАХТ, соответствует повышенной генной экспрессии этих маркеров *in vitro*. У больных раком молочной железы высокая белковая экспрессия *in situ* маркеров ответа макрофагов на цисплатин (TRAIL, IRF7 и SPP1) ассоциирована с лимфогенным метастазированием и отсутствием объективного ответа на химиотерапию.

4. Воздействие цисплатина приводит к нарушению регуляции опухолевого микроокружения макрофагами, путем ингибирования функции клиренса (эндоцитоза) про-опухолевого эпидермального фактора роста EGF.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным клиническим материалом ретроспективного исследования, высоким методологическим и методическим уровнем с использованием современных информативных методов исследования: иммунологических, биоинформатических, молекулярно-генетических, морфологических, экспериментальных моделей *in vitro*. Обоснованность полученных результатов подтверждается корректной статистической обработкой материала.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации изложены и обсуждены на международном конгрессе Европейского сообщества по исследованию рака (Амстердам, 2018 год), всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2018 год), международном симпозиуме памяти Гейдельбергера (Томск, 2018 год), международном конгрессе Европейского сообщества медицинской онкологии (Мадрид, 2017 год, Барселона 2019 год), 5-ом форме Гейдельберга для молодых ученых (Гейдельберг, 2017 год), Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева, «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2017, 2018, 2019 годы), Международной конференции «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2017-2018 годы), Международном конгрессе сообщества по изучению дендритных клеток и макрофагов (Амстердам, 2016 год, Марсель 2019 год).

Публикации

По теме опубликовано 29 научных работ, в том числе 13 статей – в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 2 монографии. Получен 1 ноу-хау.

Внедрение результатов исследования

Основные положения работы внедрены в учебный план автономной магистерской программы «Трансляционные химические и биомедицинские технологии» Томского государственного университета. Материалы включены в лекции курса «Биомедицинские технологии контроля и диагностики клеточных систем». Внедрено 1 ноу-хау «Методика оптимизации анализа воздействия химиотерапевтических препаратов на жизнеспособность модельных опухолеассоциированных макрофагов карциномы молочной железы и аденокарциномы кишечника человека».

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в изучении и анализе литературы по теме диссертационного исследования. Соискатель самостоятельно проводил комплекс исследований по изучению влияния химиотерапевтического воздействия на макрофаги, включающие создание системы модельных ОАМ *in vitro*, полнотранскриптомное

секвенирование и биоинформатическую обработку данных, ПЦР в режиме реального времени, проточную цитометрию, конфокальную микроскопию, анализ на эндоцитоз, апоптоз и выживаемость *in vitro*. Иммуногистохимический анализ проводился совместно соискателем и сотрудниками отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Автором определен методологический подход, самостоятельно выполнен весь комплекс запланированных методов, проведена статистическая обработка данных, интерпретация результатов работы, подготовка их к публикации и оформление диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 159 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав (аналитического обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка условных сокращений, и указателя литературы, включающего 231 источник, из них 6 отечественных и 225 иностранных. Работа содержит 11 таблиц и 44 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего в исследования включены 149 больных раком молочной железы T1-3N0-3M0 и 115 больных раком толстого кишечника T1-3N0-3M0. Все пациенты были разделены на 3 группы: больные без предоперационного лечения; больные, получавшие до операции неoadъювантную химиотерапию по стандартным схемам (в данном исследовании любые схемы, не содержащие препараты платины); и больные, получавшие схемы НАХТ с препаратами платины.

Исследование проходило с разрешения локального этического комитета института, все пациенты подписали информированное согласие на исследование (протокол №15 от 05 декабря 2016 г.).

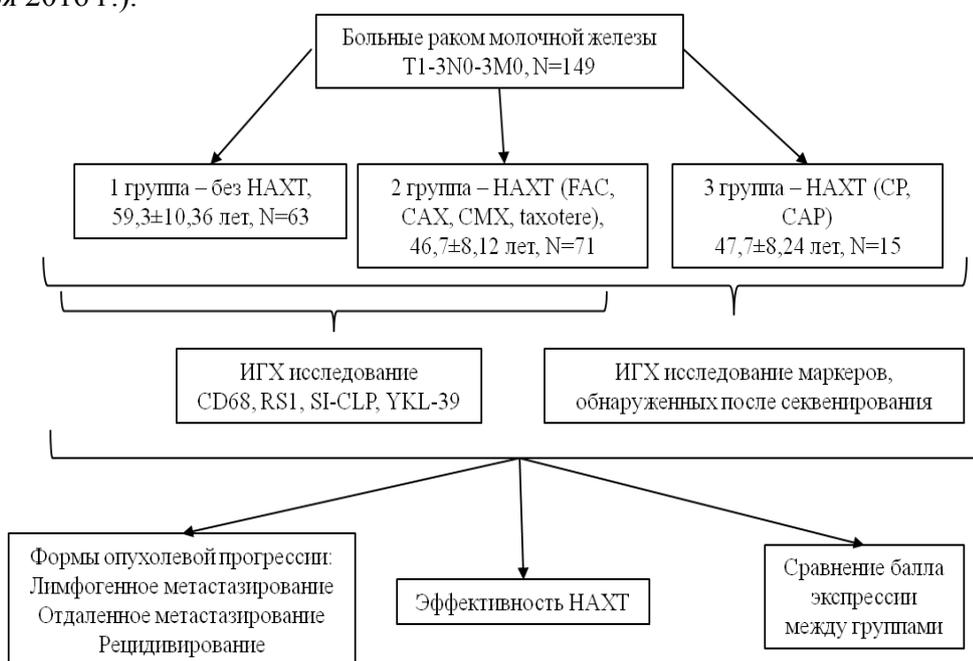


Рисунок 1. Дизайн исследования с вовлечением больных раком молочной железы

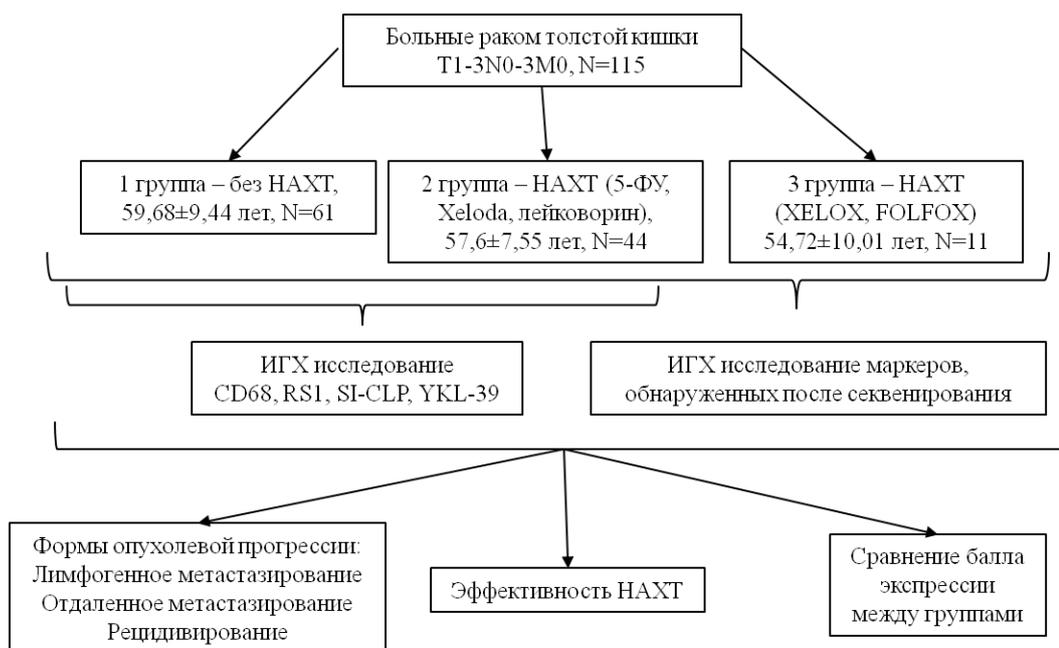


Рисунок 2. Дизайн исследования с вовлечением больных раком толстого кишечника

Больные РМЖ проходили лечение в Томском НИИ онкологии в период с 2006 по 2018 гг. Предоперационное лечение второй группы пациентов проходило по схемам FAC, CAH, CMH, taxotere. Предоперационное лечение третьей группы - препаратами платины по схемам CP, CAP (совместно с навельбином, таксотером, паклитакселом и адриамицином). Во всех случаях гистотип опухоли соответствовал инвазивной карциноме неспецифического типа. Все пациентки, прооперированные по поводу рака молочной железы, в послеоперационном периоде получали химиотерапию по схемам CMF, FAC, CAH.

Больные раком толстой кишки проходили лечение в Томском НИИ онкологии в период с 2005 по 2017 гг. Пациенты первой группы не получали предоперационной химиотерапии. Предоперационное лечение второй группы включало 5-фторурацил, кселоду, лейковорин, 3 группы - препараты платины по схемам XELOX, FOLFOX. В исследование включали только случаи, при которых гистологический тип опухоли соответствовал аденокарциноме толстого кишечника.

Характеристика модельной системы ОАМ и клеточных линий

В качестве модельной системы для получения опухолеассоциированных макрофагов была использована система стимуляции первичных макрофагов человека цитокином IL4 и супернатантами опухолевых клеток MCF7 (аденокарцинома молочной железы) и Colo206F (карцинома кишечника человека), разработанная коллективом Кжышкова Ю.Г. и оптимизированная соискателем.

Цисплатин (Teva Pharmaceutical Industries, Ltd., раствор для инъекций L01XA01) добавляли в концентрации 20 μ M на 6-й день дифференцировки макрофагов.

Имуногистохимический и иммунофлюоресцентный анализ

Наличие белковой экспрессии CD68, стабилина-1, YKL-39, SI-CLP в клетках воспалительного инфильтрата определяли при помощи иммуногистохимического исследования в разных сегментах опухоли: 1) в участках с нежнотовлокнистой стромой; 2) в участках с грубоволокнистой стромой; 3) в областях с «максимальным стромально-паренхиматозным взаимоотношением»; 4) среди паренхиматозных элементов; 5) в просветах протоковых опухолевых структур (Zavjalova M.et al., 2017)

Для белковых маркеров MX1, TNSFS10, CXCL10, MARCO, SPP1, IRF7 подсчитывался общий балл экспрессии в опухоли in situ.

Для иммунофлюоресцентного анализа в качестве вторичных антител использовались флюоресцентно-меченые антитела. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия модельных ОАМ и срезов опухолевых тканей была выполнена с помощью лазерного сканирующего спектрального конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Германия).

Тест на эндоцитоз и проточная цитометрия

Тест на эндоцитоз проводили в модельной системе ОАМ рака молочной железы и рака толстого кишечника. Для анализа эндоцитоза в культуру клеток добавляли флюоресцентно-меченные лиганды AlexaFluor488-AcLDL (Low density lipoprotein, acetylated) и AlexaFluor488-EGF (Epidermal Growth Factor) в концентрации 2 µg/mL. Количественную оценку связанных/интернализированных лигандов проводили с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter).

ПЦР в режиме реального времени

Уровень экспрессии генов AREG, CXCL10, FAS, IRF7, GBP4, MDM2, MX1, PCNA, TNFSF10, ACAT2, CCND2, DHCR7, SPP1, CD70 и MARCO оценивали при помощи количественной обратной-транскриптазной ПЦР на амплификаторе AriaMx Real-Time PCR (Agilent Technologies). Относительная экспрессия генов была оценена с помощью метода 2-ΔΔCT (Livak).

Высокопроизводительное секвенирование и биоинформатический анализ

Полнотранскриптомное секвенирование проводилось на 72 образцах макрофагов, полученных от 6 доноров (3 донора с супернатантами MCF-7 и 3 донора с супернатантами Colo206F). Подготовленные библиотеки пулировали и секвенировали на приборе Illumina NextSeq500. Проводили обогащение по биохимическим и регуляторным путям с использованием списков генов, ранжированных по уровню экспрессии и pvalue. Для эксперимента использовали базы данных Hallmark gene sets, Reactome, KEGG.

Методы статистической обработки данных

Статистический анализ проводился при помощи программы STATISTICA 8.0 for Windows (StatSoft Inc., USA). Для определения статистически значимых различий в независимых группах использовали критерии Хи-квадрат и Манна-Уитни. Для анализа выживаемости использовались кривые, построенные по методу Каплана-Майера. Указывались статистически значимые различия при следующих уровнях значимости ***p<0,001, ** p<0,01 и * p<0,05. Данные с тенденцией к статистически значимым событиям (p value <0.1) также обсуждались.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ассоциация экспрессии маркеров макрофагов с проявлениями опухолевой прогрессии рака молочной железы и рака толстого кишечника

Нами был проведен иммуногистохимический анализ экспрессии CD68, стабиллина-1, YKL-39, SI-CLP в клетках воспалительного инфильтрата в разных сегментах опухоли с разным соотношением паренхиматозного и стромально-воспалительного компонентов. Анализ экспрессии CD68 в опухоли молочной железы показал, что у пациентов с лимфогенным метастазированием средний балл экспрессии CD68 в просветах опухолевых протоков оказался ниже (1,4±0,5), чем у больных с отсутствием лимфогенных метастазов (3,1±1,0, p=0,007). У больных раком молочной железы, получавших НАХТ, высокий уровень инфильтрации CD68+ макрофагов среди паренхиматозных элементов был связан с отсутствием лимфогенных метастазов (4,0±0,0 vs. 2,0±1,8, p=0,03).

Анализ выживаемости показал, что у больных с метастазами в лимфоузлы низкий уровень экспрессии CD68 (1-2 балла) был ассоциирован с более продолжительным периодом выживаемости до прогрессии (медиана 79 месяцев) по сравнению с высокой экспрессией CD68 (3-4 балла) (медиана 65 месяцев) (Рисунок 3).

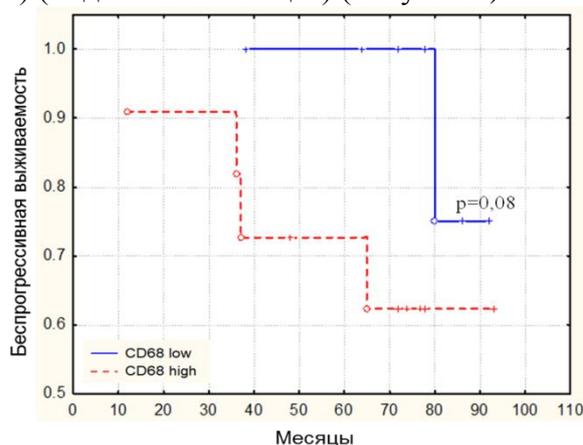


Рисунок 3 – Выживаемость до прогрессии у больных РМЖ в группе с лимфогенным метастазированием в зависимости от экспрессии CD68

Было обнаружено, что количество SI-CLP-позитивных макрофагов в нежно-волоконистой строме в пределах опухоли молочной железы было статистически значимо выше в группе с лимфогенным метастазированием ($2,25 \pm 0,7$) по сравнению с группой пациенток без лимфогенных метастазов ($1,4 \pm 1,0$, $p=0,007$).

У больных раком толстого кишечника без предоперационного лечения экспрессия YKL-39 была статистически значимо ниже в группе пациентов с наличием как лимфогенных ($1,71 \pm 0,75$), так и отдаленных метастазов ($1,33 \pm 0,5$) по сравнению с группой без метастазов ($2,8 \pm 0,91$, $p=0,03$ и $2,57 \pm 0,93$, $p=0,048$, соответственно). Кроме того, экспрессия YKL-39 негативно коррелировала с количеством лимфатических узлов с метастазами ($R=-0,89$). В группе пациентов с НАХТ экспрессия YKL-39 была значимо более низкой при наличии лимфогенных метастазов ($1,83 \pm 0,83$ vs. $2,44 \pm 0,58$, $p=0,027$).

Взаимосвязь экспрессии хитиназо-подобных белков с эффективностью НАХТ

У больных раком молочной железы с предоперационной химиотерапией экспрессия YKL-39 в нежно-волоконистой строме и SI-CLP в общем инфильтрате опухоли оказалась выше у пациенток с отсутствием объективного ответа на НАХТ ($2,64 \pm 1,15$ и $2,16 \pm 0,93$, соответственно) по сравнению с группой с объективным ответом ($1,42 \pm 1,13$, $p=0,02$, и $1,67 \pm 0,94$, $p=0,034$).

При раке толстого кишечника наблюдалась тенденция к повышению экспрессии YKL-39 при наличии объективного положительного эффекта НАХТ по сравнению с отсутствием ответа ($2,42 \pm 0,58$, vs. $1,93 \pm 0,86$, $p=0,075$). Также у пациентов с раком толстого кишечника с наличием объективного ответа на НАХТ в воспалительном инфильтрате опухоли, расположенном в нежно-волоконистой строме, была обнаружена более высокая экспрессия стабиллина-1 ($2,3 \pm 0,73$) по сравнению с пациентами, не отвечающими на НАХТ ($1,5 \pm 0,72$, $p=0,02$).

В группе пациентов с раком толстого кишечника, получавших НАХТ, низкий балл экспрессии CD68 был ассоциирован с более продолжительным периодом выживаемости до прогрессии (медиана 66 месяцев) по сравнению с высокой экспрессией CD68 (3-4 балла) (медиана 51,5 месяцев) (Рисунок 4).

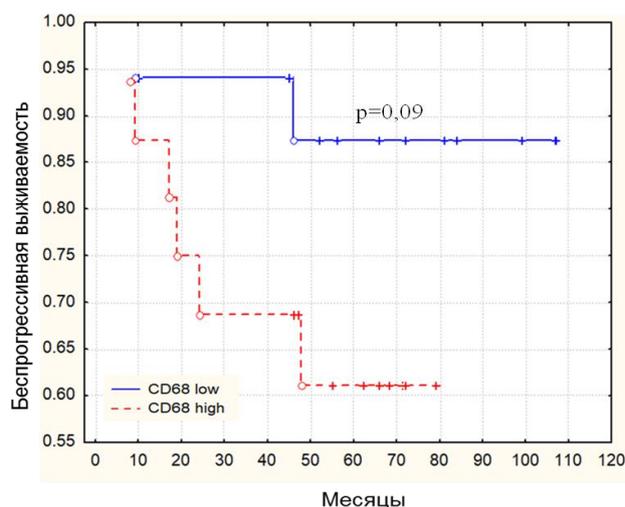


Рисунок 4 – Выживаемость до прогрессии у больных раком толстого кишечника, получавших НАХТ, в зависимости от экспрессии CD68

Анализ влияния цисплатина на транскрипционную программу модельных ОАМ рака молочной железы и рака толстого кишечника

Для поиска функционально значимых маркеров ответа опухоли на химиотерапию было проведено полнотранскриптомное секвенирование образцов модельных ОАМ, подвергшихся воздействию химиопрепарата цисплатина. Использовалась модельная система ОАМ, стимулированных цитокином М2-поляризации (IL4) и супернатантами опухолевых клеток MCF7 (аденокарцинома молочной железы) и Colo206F (карцинома кишечника человека). Для начала в модельной системе был проведен анализ жизнеспособности макрофагов после добавления цисплатина в разных концентрациях, который показал, что цисплатин имеет четкий дозозависимый эффект, и оптимальная концентрация для дальнейших экспериментов составила 20 μ M.

После секвенирования в ходе биоинформатического анализа все гены были разделены по биохимическим и функциональным путям. Гены были выбраны в соответствии с их функциональной составляющей и наибольшим значением дифференциальной экспрессии (показатели $\log_2\text{FoldChange}$ не менее 2, $p\text{-value} < 0,0001$). Было обнаружено, что на транскрипционном уровне значительно повышалась экспрессия генов, вовлеченных в воспалительный ответ, интерферон-зависимые пути, p53-зависимый апоптоз, генов, отвечающих за репарацию ДНК. Понижалась экспрессия генов, вовлеченных в метаболизм липидов и жирных кислот, гомеостаз холестерина, гликолиз, окислительное фосфорилирование, эндоцитоз.

Результаты биоинформатического анализа позволили сделать вывод, что в ОАМ наблюдалась активация программ заживления ткани и воспаления, активация про-апоптотической программы, нарушение липидного обмена (мембранный биогенез и транспорт, сигналинг через вторичные мессенджеры, энергетический запас клетки), нарушение эндоцитоза (Рисунок 5). Кроме отмеченных общих закономерностей показаны выраженные различия в профиле ОАМ рака молочной железы и рака толстой кишки.



Рисунок 5 – Функциональные пути в макрофагах после добавления цисплатина. Верхняя панель – активируемые пути, нижняя панель - подавляемые пути. Черные столбики показывают пути, общие для макрофагов РМЖ и РТК, серые - для РТК и белые - для РМЖ

Было показано, что макрофаги рака молочной железы имеют 150 уникальных ингибированных под воздействием цисплатина транскриптов, ответственных за программы рибосомального биогенеза, трансляцию, биосинтез и метаболизм РНК, белковый метаболизм. В то же время активированные транскрипты (n=97) были в большей степени связаны с трансмембранным транспортом и рецепторной активностью. В образцах ОАМ рака молочной железы происходила активация в большей мере проопухолевой программы. Образцы макрофагов рака толстого кишечника имели 690 ингибированных и 818 активированных уникальных транскриптов. В этих образцах наблюдались изменения в следующих процессах: дисбаланс в экспрессии генов ангиогенной системы, выраженное ингибирование генов, участвующих в M2 поляризации. Более значимо активировались гены, участвующие в регуляции клеточного цикла, а подавлялись гены эпителиально-мезенхимального перехода, ангиогенеза, гипоксии (Рисунок 5).

В итоге биоинформатического поиска значимых дифференциально экспрессируемых транскриптов был обозначен финальный набор генов. Экспрессия AREG, CXCL10, FAS, IRF7, GBP4, MDM2, MX1, STAT4, TNFSF10 повышалась под воздействием цисплатина, в то время как экспрессия PCNA, ACAT2, CCND2, DHCR7, SPP1, MARCO, CD70 значительно снижалась при добавлении агента. Валидация результатов полнотранскриптомного секвенирования ОАМ была проведена при помощи ПЦР в режиме реального времени на независимых донорах и позволила полностью подтвердить результаты секвенирования.

Изучение экспрессии маркеров ответа ОАМ на цисплатин в клинических образцах опухолевой ткани молочной железы и рака толстого кишечника

На следующем этапе, чтобы показать потенциальную маркерную значимость отобранных генов, валидированных на предыдущем этапе при помощи ПЦР, в клинических образцах опухолевой ткани рака молочной железы и рака толстого кишечника *in situ* были проанализированы белковые продукты этих генов, и проведена ассоциация их экспрессии с опухолевой прогрессией и эффективностью НАХТ. Это белки MX1, TNFSF10, CXCL10, IRF7, SPP1, MARCO. Для ИГХ анализа были сформированы 3 группы пациентов: пациенты без НАХТ; пациенты, получавшие НАХТ по стандартной схеме без препаратов платины; пациенты, получавшие препараты платины в схеме НАХТ.

Было показано, что у больных раком толстого кишечника наблюдалась высокая белковая экспрессия сразу нескольких маркеров (MX1, TNFSF10, CXCL10, IRF7, SPP1) в группе пациентов, леченных препаратами платины, по сравнению с двумя остальными группами пациентов. Высокие уровни экспрессии этих белков в опухолевой ткани больных раком толстого кишечника подтверждали данные, полученные в результате высокопроизводительного секвенирования на модели ОАМ *in vitro*.

У больных раком молочной железы в группе, получавших препараты платины в схеме НАХТ, такая тенденция наблюдалась только для одного белкового продукта: средний балл экспрессии TNFSF10 был выше относительно группы, получавшей НАХТ без препаратов платины.

У больных раком молочной железы в группе, леченной препаратами платины, при наличии лимфогенного метастазирования балл экспрессии TRAIL ($3,42 \pm 0,97$), IRF7 ($3,0 \pm 0,07$) и SPP1 ($2,42 \pm 0,97$) был выше по сравнению со случаями отсутствия лимфогенных метастазов ($2,0 \pm 1,0$, $p=0,03$; $1,6 \pm 0,89$, $p=0,017$ и $1,0 \pm 0,0$, $p=0,031$, соответственно). Более того, в этой же группе пациентов экспрессия TRAIL и SPP1 была выше у пациенток с отсутствием ответа на НАХТ ($4,0 \pm 0,0$ и $2,75 \pm 0,95$) по сравнению с группой пациентов с объективным ответом на лечение ($2,75 \pm 1,25$, $p=0,045$ и $1,0 \pm 0,0$, $p=0,026$, соответственно).

Было отмечено, что скавенджер-рецептор M2 макрофагов MARCO практически не экспрессировался в опухолях молочной железы, что соответствовало результатам секвенирования (низкий уровень экспрессии при добавлении цисплатина в модели *in vitro*). Так, из 20 нелеченых пациенток отсутствовала экспрессия MARCO в опухолях 14 пациентов (70%), из 36 леченных - у 29 (80,5%), из 12 пациенток, леченных препаратами платины, отсутствовала экспрессия у 6 пациенток (50%). Также у нелеченых пациенток с РМЖ был обнаружен низкий балл экспрессии MX1 при наличии лимфогенного метастазирования ($1,75 \pm 0,88$, vs. $3,07 \pm 1,26$, $p=0,018$).

У больных раком толстого кишечника наблюдалась тенденция к повышению экспрессии SPP1 в группе нелеченых пациентов с наличием лимфогенных метастазов ($2,67 \pm 1,15$) по сравнению с группой без метастазов ($1,42 \pm 0,53$, $p=0,058$). У леченых больных раком толстого кишечника в группе без лимфогенных метастазов экспрессия MARCO была статистически значимо выше ($3,33 \pm 0,65$ vs. $1,33 \pm 0,57$, $p=0,0076$).

Таким образом, была продемонстрирована потенциальная прогностическая значимость обнаруженных при помощи высокопроизводительного секвенирования маркеров ответа ОАМ на цисплатин в отношении распространенности опухолевого процесса и эффективности НАХТ.

Цисплатин подавляет клиренс компонентов микроокружения опухолеассоциированными макрофагами

Известно, что ОАМ могут регулировать микроокружение опухоли не только за счет высвобождения факторов роста, цитокинов и компонентов внеклеточного матрикса, но также за счет поглощения этих факторов скавенджер-рецепторами, которые они экспрессируют у себя на поверхности.

Было проанализировано влияние цисплатина на скавенджер-рецепторную функцию макрофагов как механизм регуляции опухолевого микроокружения. Была использована система модельных ОАМ. Эпидермальный фактор роста (EGF), который является ключевым фактором для прогрессирования рака толстой кишки и рака молочной железы, был использован в качестве опухолеспецифического лиганда.

При помощи проточной цитометрии было показано, что поглощение общего лиганда скавенджер-рецепторов aсLDL и опухолеспецифического лиганда EGF скавенджер-рецептором стабилином-1 в модельных ОАМ значительно уменьшалось в присутствии цисплатина. В то же время было продемонстрировано, что экспрессия стабилена-1 существенно не изменялась после обработки цисплатином в ОАМ.

Добавление цисплатина приводило к значительному снижению интернализации и доставки как acLDL, так и EGF к EEA1+ ранним эндосомам. Цисплатин также ингибировал транспорт стабиллина-1 в эндоцитарные везикулы, но не оказывал влияния на везикулярную локализацию EEA1 в макрофагах.

Для определения механизма действия цисплатина в отношении эндоцитоза патогенетически значимого лиганда ОАМ был проведен биоинформатический анализ результатов полнотранскриптомного секвенирования и было обнаружено, что цисплатин приводит к подавлению 635 белков, функционально участвующих в процессах трансмембранного транспорта, вовлеченных в рецептор-опосредованную интернализацию лигандов, эндосомальный транспорт, образование транспортных везикул. При помощи ПЦР в режиме реального времени нами было подтверждено, что экспрессия генов STX8, DENND1A, EHD1, DNМ3, вовлеченных в эти процессы, понижалась при добавлении цисплатина. Выявлен механизм нарушения патогенетически значимого звена эндоцитоза под влиянием цисплатина, который приводит к нарушению регуляции макрофагами опухолевого микроокружения посредством ингибирования сквенджинг функции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе были изучены новые маркеры ОАМ, которые свидетельствуют о наличии функционально различных субпопуляций макрофагов и имеют разную ассоциацию с проявлениями опухолевой прогрессии и с эффективностью химиотерапии. Полученные результаты также свидетельствуют о том, что макрофаги одного фенотипа могут иметь различную маркерную значимость в зависимости от их локализации в участках опухоли молочной железы с разным соотношением паренхиматозного и стромально-воспалительного компонентов. В частности, показано, что высокая экспрессия белка YKL-39 в макрофагах у больных раком молочной железы связана с отсутствием объективного ответа пациентов на НАХТ, тогда как у больных раком толстого кишечника высокий уровень экспрессии указанного белка наряду со стабиллином-1 идентифицируется у пациентов с клиническим ответом на химиотерапию.

Изучение популяций макрофагов, несущих разные молекулы хитиназо-подобных белков, регулирующие функции макрофагов, дало возможность идентифицировать дополнительно к M1 и M2 фенотипы ОАМ, функционально вовлеченные в опухолевую прогрессию и ответ на неoadьювантную химиотерапию, которые могут иметь маркерную значимость.

Терапевтический результат, наряду с лекарственной чувствительностью (резистентностью) опухолей, также существенно зависит от сложного взаимодействия опухолевых клеток с различными компонентами микроокружения опухоли, особенно с иммунными клетками. Неоднозначность сведений о механизмах вовлечения макрофагов опухоли в процессы реализации эффективности химиотерапии, ведущих либо к ингибированию терапевтического действия, либо, напротив, к активации иммунного ответа на опухоль, сделала актуальными исследования влияния химиопрепаратов, в частности цисплатина как агента, вызывающего иммуногенную гибель опухолевых клеток, на функционирование макрофагов.

Метод полнотранскриптомного секвенирования, показывающий, какие клеточные процессы активны в данный момент, позволил выявить механизмы функционального программирования ОАМ под влиянием цисплатина. С использованием данного подхода были обнаружены как общие механизмы, так и различия программирующего действия цисплатина на фенотип и функциональные особенности модельных ОАМ рака молочной железы и рака толстого кишечника человека. В итоге биоинформатического поиска значимых дифференциально экспрессируемых транскриптов был обозначен финальный набор генов. Экспрессия AREG, CXCL10, FAS, IRF7, GBP4, MDM2, MX1, STAT4, TNFSF10 повышалась под воздействием цисплатина, в то время как экспрессия PCNA,

ACAT2, CCND2, DHCR7, SPP1, MARCO, CD70 значительно снижалась при добавлении этого агента. Валидация результатов полнотранскриптомного секвенирования ОАМ была проведена при помощи ПЦР в режиме реального времени на независимых донорах и позволила полностью подтвердить результаты секвенирования. Обозначены перспективные патогенетически значимые маркеры ответа ОАМ на воздействие цисплатином, ассоциированные с лимфогенным метастазированием и отсутствием объективного ответа на НАХТ на уровне белковой экспрессии.

В работе также показано, что цисплатин приводит к нарушению регуляции опухолевого микроокружения макрофагами, путем ингибирования клиренса про-опухолевого эпидермального фактора роста EGF. Поскольку EGF является одним из ключевых регуляторов роста опухоли, нарушение рецептор-зависимого клиренса такого фактора, поддерживающего опухоль, цисплатином может привести к опосредованному макрофагами нарушению гомеостатического баланса опухоли в ответ на цисплатин.

Полученные результаты открывают перспективу разработки новых терапевтических подходов к лечению злокачественных новообразований, основанных на сбалансированном синергическом действии цитостатических агентов и инновационных иммуномодулирующих подходов.

ВЫВОДЫ

1. У больных раком молочной железы высокая инфильтрация CD68+ макрофагами в просветах опухолевых протоков и среди паренхиматозных элементов ассоциирована с отсутствием лимфогенных метастазов. У пациентов без метастазов в лимфоузлы высокие показатели выживаемости до прогрессии (79 месяцев против 65 месяцев) ассоциированы с низким баллом экспрессии CD68 (1-2 балла). Высокая экспрессия SI-CLP в ОАМ, локализованных в нежно-волоконистой строме, ассоциирована с наличием лимфогенного метастазирования.
2. Высокий уровень экспрессии YKL-39 макрофагами у больных раком толстого кишечника без предоперационного лечения ассоциирован с отсутствием метастазов в лимфоузлы и с низким риском отдаленного метастазирования. Экспрессия YKL-39 макрофагами негативно коррелирует с количеством лимфатических узлов с метастазами ($R=-0,89$). Низкий балл экспрессии CD68 (1-2 балла) в ОАМ у больных раком толстого кишечника, получавших НАХТ, ассоциирован с длительной выживаемостью до прогрессии (медиана 65 месяцев против 51,5 месяцев).
3. У больных раком молочной железы, получавших НАХТ, высокая экспрессия YKL-39 в нежно-волоконистой строме и SI-CLP в общем инфильтрате опухоли связана с отсутствием объективного ответа на НАХТ. У больных раком толстого кишечника высокая экспрессия YKL-39 в общем инфильтрате опухоли и высокая экспрессия стабиллина-1 в нежно-волоконистой строме связаны с объективным клиническим ответом на НАХТ.
4. Под влиянием цисплатина в модельной системе макрофагов рака молочной железы и рака толстого кишечника *in vitro* на транскрипционном уровне активируются гены, обладающие регенераторной и про-воспалительной активностью, про-апоптотические гены, и, напротив, ингибируются гены, вовлеченные в регуляцию липидного обмена, окислительного фосфорилирования, эндоцитоза.
5. В ОАМ рака молочной железы под воздействием цисплатина активируются гены, отвечающие за про-опухолевую поляризацию. В ОАМ рака толстого кишечника нарушается баланс экспрессии факторов, регулирующих ангиогенез, происходит выраженное ингибирование факторов M2 поляризации.
6. В группе больных раком толстого кишечника, получавших цисплатин в схеме НАХТ, высокая экспрессия белковых продуктов, кодируемых генами ответа на

цисплатин MX1, TNFSF10, CXCL10, IRF7, SPP1, в опухоли in situ соответствует их повышенной генной экспрессии в модельной системе OAM in vitro. У больных раком молочной железы высокая экспрессия белков TRAIL и SPP1 ассоциирована с отсутствием объективного ответа на НАХТ.

7. Цисплатин in vitro ингибирует скавенджинг функцию OAM и вызывает снижение макрофаг-ассоциированного клиренса про-опухолевого эпидермального фактора роста EGF.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Уровни экспрессии хитиназо-подобных белков YKL-39 и SI-CLP в опухоли могут быть использованы как дополнительные маркеры для предсказания эффективности неoadьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы и раком толстого кишечника. У больных РМЖ высокую экспрессию YKL-39 и SI-CLP в макрофагах рекомендуется использовать как предсказательную в отношении отсутствия объективного ответа на НАХТ, а у больных РТК возможно использование высокой экспрессии YKL-39 при прогнозировании объективного ответа на НАХТ.

Высокие уровни экспрессии белков TRAIL и SPP1 в макрофагах рекомендуется применять как дополнительные факторы предсказания отсутствия объективного ответа на НАХТ при включении цисплатина в схему лечения у больных раком молочной железы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Митрофанова, И.В. Иммунная система и эффективность противоопухолевого лечения [Текст] / Ю.Г. Кжышковска, М.Н. Стахеева, Н.В. Литвяков, О.Е. Савельева, И.В. Митрофанова, И.В. Степанов, А.Н. Грачев, Т.С. Геращенко, М.В. Завьялова, Н.В. Чердынцева // Томск: Изд-во Том. ун-та – 2015. – 164 с.
2. Митрофанова, И.В. Оценка функционального взаимодействия хитиназоподобного белка YKL39 с макрофагами и его роль при опухолевом росте [Текст] / И.В. Митрофанова, Т. Лиу, М.А. Булдаков, Н.В. Чердынцева, Ю.Г. Кжышковска // Материалы IX съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, Минск, 15-17 июня, 2016 г. // Евразийский онкологический журнал. – 2016. – Т. 4, № 2 – С.639.
3. Митрофанова, И.В. Функциональное взаимодействие хитиназоподобного белка YKL39 с опухоль-ассоциированными макрофагами [Текст] / И.В. Митрофанова, М.А. Булдаков // Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2016. – с.124-127.
4. Митрофанова, И.В. Хитиназоподобный белок YKL39 стимулирует миграцию моноцитов ex vivo и негативно коррелирует с лимфогенным и гематогенным метастазированием при раке молочной железы [Текст] / И.В. Митрофанова, М. В. Завьялова, Н. В. Литвяков, Н. В. Чердынцева, Ю. Г. Кжышковска // Материалы II Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, Москва, 6-8 декабря 2016 г. / Успехи молекулярной онкологии – 2016. - Т.3, №4, - С. 23.
5. **Mitrofanova, I. Role of chitinase-like proteins in cancer [Текст] / J. Kzhyshkowska, S. Yin, T. Liu, V. Riabov, I. Mitrofanova // Biol. Chem. – 2016. – Vol. 397, № 3. – P. 231-47.**
6. Митрофанова, И.В. Опухольассоциированные макрофаги [Текст] / Ю.Г. Кжышковска, И.В. Митрофанова, М.В. Завьялова, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева // М.: Наука – 2017. – 224 с.
7. **Митрофанова, И.В. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии [Текст] / Н.В. Чердынцева, И.В. Митрофанова, М.А.**

- Булдаков, М.Н. Стахеева, М.Р. Патышева, М.В. Завьялова, Ю.Г. Кжышковска // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 16, № 4. – Стр. 61-74.
8. Митрофанова, И.В. Экспрессия макрофаг-ассоциированных генов в опухоли молочной железы: связь с опухолевой прогрессией [Текст] / Н.В. Литвяков, М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимов, И.В. Дерюшева, П.В. Казанцева, И.В. Митрофанова, И.Г. Фролова, М.А. Булдаков, Е.М. Слонимская, Е.Л. Чойнзон, Ю.Г. Кжышковска, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. 2017. – Т. 16, № 6. – С. 47-56.
 9. Mitrofanova, I. Role of the Immune Component of Tumor Microenvironment in the Efficiency of Cancer Treatment: Perspectives for the Personalized Therapy [Текст] / M. Stakheyeva, V. Riabov, I. Mitrofanova, N. Litviakov, E. Choinzonov, N. Cherdyntseva, J. Kzhyshkowska // Curr Pharm Des. – 2017. – Vol. 23, № 32. – P. 4807-4826.
 10. Mitrofanova, I. CD68+, but not stabilin-1+ tumor associated macrophages in gaps of ductal tumor structures negatively correlate with the lymphatic metastasis in human breast cancer [Текст] / M. Buldakov, M. Zavyalova, N. Krakhmal, N. Telegina, S. Vtorushin, I. Mitrofanova, V. Riabov, S. Yin, B. Song, N. Cherdyntseva, J. Kzhyshkowska // Immunobiology. – 2017. - Vol. 222, № 1. – P. 31–38.
 11. Mitrofanova, I. Tumor-associated macrophages in human breast cancer parenchyma negatively correlate with lymphatic metastasis after neoadjuvant chemotherapy [Текст] / I. Mitrofanova, M. Zavyalova, N. Telegina, M. Buldakov, V. Riabov V, N. Cherdyntseva, J. Kzhyshkowska // Immunobiology. – 2017. – Vol. 222, № 1. – P. 101-09.
 12. Mitrofanova, I. Effect of neoadjuvant chemotherapy on correlation of tumor-associated macrophages with angiogenesis and lymphangiogenesis in human breast cancer [Текст] / I. Mitrofanova, M. Zavyalova, M. Buldako, N. Cherdyntseva, J. Kzhyshkowska // Annals of Oncology. -2017. – V. 28, №. 5.
 13. Mitrofanova, I. YKL-39 induces monocytes migration and angiogenesis and inversely correlates with metastasis in patients with breast cancer [Текст] / I. Mitrofanova, L. Tengfei, M. Zavyalova, N. Litviakov, M. Buldakov, N. Cherdyntseva, J. Kzhyshkowska // Annals of Oncology. -2017. – V. 28, №. 5.
 14. Митрофанова, И.В. Связь хитиназоподобного белка YKL-39 с процессами ангиогенеза при злокачественном росте [Текст] / И.В. Митрофанова, Н.В. Крахмаль, Т.А. Дронова, М.А. Булдаков // Сборник материалов XII Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева / Томск: Изд-во Том. Ун-та, 2017. – С. 83-85.
 15. Митрофанова, И.В. Связь хитиназо-подобных белков с метастазированием у больных раком молочной железы [Текст] / И.В. Митрофанова, М.М. Цыганов, Н.С. Телегина // Сборник научных трудов XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых / Томск: Изд-во Том. Ун-та, 2017. – С. 112-114.
 16. Митрофанова, И.В. Оптимизация метода получения моноцитов для культивирования и программирования in vitro [Текст] / А.С. Шляхтун, И.В. Митрофанова, Е.Г. Шаповалова // Сборник научных трудов XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Томск, 25-28 апреля 2017 г. / под ред. И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск: Изд-во – Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 2017. – С. 181-183.
 17. Larionova, I. Tumor-associated macrophages in human breast cancer produce new monocyte attracting and pro-angiogenic factor YKL-39 indicative for increased metastasis after neoadjuvant chemotherapy [Текст] / T. Liu, I. Larionova, N. Litviakov, V. Riabov, M. Zavyalova, M. Tsyganov, M. Buldakov, B. Song, K. Moganti, P. Kazantseva, E. Slonimskaya, E. Kremmer, A. Flatley, H. Klüter, N. Cherdyntseva, J. Kzhyshkowska // Oncoimmunology. – 2018. – V.7, № 6.

18. Larionova, I. Expression of M2 macrophage markers YKL-39 and CCL18 in breast cancer is associated with the effect of neoadjuvant chemotherapy [Текст] / N. Litviakov, M. Tsyganov, I. Larionova, M. Ibragimova, I. Deryusheva, P. Kazantseva, E. Slonimskaya, I. Frolova, E. Choinzonov, N. Cherdyntseva, J. Kzhyshkowska // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 82, № 1. – P. 99-109.
19. Mitrofanova, I. The effect of neoadjuvant chemotherapy on the correlation of tumor-associated macrophages with CD31 and LYVE-1 [Текст] / I. Mitrofanova, M. Zavyalova, V. Ryabov, N. Cherdyntseva, J. Kzhyshkowska // *Immunobiology.* – 2018. – Vol. 223, № 6-7. – P. 449-459.
20. Larionova, I. Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs [Текст] / E. Nikitina, I. Larionova, E. Choinzonov, J. Kzhyshkowska // *Int J Mol Sci.* – 2018. – V. 19, № 9.
21. Ларионова, И.В. Хитиназоподобные белки как перспективные маркеры при злокачественных новообразованиях [Текст] / И.В. Ларионова, Т.Н. Севастьянова, А.А. Ракина, Н.В. Чердынцева, Ю.Г. Кжышковска // *Сибирский онкологический журнал.* – 2018. – Т. 17, № 4. – С. 99-105.
22. Ларионова, И.В. Ассоциация экспрессии хитиназоподобных белков с ответом на неoadъювантную химиотерапию у пациентов с колоректальным раком [Текст] / И.В. Ларионова, М.В. Завьялова, Н.В. Чердынцева, Е.О. Казакова, Ю.Г. Кжышковска // *Материалы IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, Москва, 17-19 декабря 2019 г. / Успехи молекулярной онкологии – 2018. - Т.5, №4, - С. 157-158.*
23. Ларионова, И.В. Сравнительная оценка субпопуляций опухолеассоциированных макрофагов при раке молочной железы в зависимости от ответа на химиотерапию [Текст] / Д.С. Халяпин, И.В. Ларионова // *Перспективы развития фундаментальных наук: Сборник научных трудов XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Томск, 24-27 апреля 2018 г. / Томск: Издательский дом Томского государственного университет, 2018. – С. 161-163.*
24. Ларионова, И.В. Активация провоспалительной программы в модельных опухолеассоциированных макрофагах под воздействием цисплатина [Текст] / И.В. Ларионова, Т.А. Дронова, Т.Лиу, В.Б. Рябов, А.М. Киселев, Е.В. Денисов, Д.С. Халяпин, Н.В. Чердынцева, Ю.Г. Кжышковска // *Материалы IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, Москва, 17-19 декабря 2018 г. / Успехи молекулярной онкологии – 2018. - Т.5, №4, - С. 23.*
25. Ларионова, И.В. Изменение экспрессии рецепторов опухолеассоциированных макрофагов под воздействием цисплатина [Текст] / И.В. Ларионова, Т. Лиу, В. Рябов // *Перспективы развития фундаментальных наук: Сборник научных трудов XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Томск, 24-27 апреля 2018 г. / Томск: Издательский дом Томского государственного университет, 2018. – С. 96-98.*
26. Ларионова, И.В. Анализ влияния цисплатина на экспрессионный и секреторный профиль модельных опухолеассоциированных макрофагов [Текст] / И.В. Ларионова // *Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых, 24-25 мая 2018 г. - Томск: Изд-во Том.ун-та, 2018. - С.266-267.*
27. Larionova, I. Cisplatin induces pro-inflammatory program and modulates pro-angiogenic potential of human tumor-associated macrophages [Текст] / I. Larionova, T. Liu, V. Riabov, N. Cherdyntseva, J. Kzhyshkowska // *ESMO Open* 2018;3:doi: 10.1136/esmoopen-2018-EACR25.780.

28. Larionova, I. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy [Текст] / I. Larionova, N. Cherdyntseva, T. Liu, M. Patysheva, M. Rakina, J. Kzhyshkowska // *Oncoimmunology*. – 2019. – V.8, № 7.
29. Ларионова, И.В. Моноциты при злокачественных новообразованиях: перспективы и точки приложения для диагностики и терапии [Текст] / М.Р. Патышева, М.Н. Стахеева, И.В. Ларионова, Н.А. Тарабановская, Е.С. Григорьева, Е.М. Слонимская, Ю.Г. Кжышковска, Н.В. Чердынцева // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 60-75.

Список сокращений

НАХТ – неоадьювантная химиотерапия
ОАМ - опухолеассоциированные макрофаги
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РМЖ – рак молочной железы
РТК – рак толстого кишечника
ХПБ – хитиназо-подобные белки
ХТ - химиотерапия
acLDL – ацетилированный липопротеин низкой плотности
СНО (Chinese hamster ovary cells) – клетки яичника китайского хомячка
EGF – эпидермальный фактор роста
IL-4 – интерлейкин 4
LPS - липополисахарид
M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор
TGFb – трансформирующий фактор роста бета
SI-CLP - стабиллин-1-взаимодействующий хитиназо-подобный белок
YKL-39 (CHI3L2) – хитиназо-3-подобный белок 2

Благодарности

Выражаем благодарность за помощь в работе сотрудникам отдела общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ Завьяловой М.В., Перельмутеру В.М., Бондарь С.А., отдела общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ Слонимской Е.М., абдоминального отдела НИИ онкологии Томского НИМЦ Афанасьеву С.Г., лаборатории биологии опухолевой прогрессии НИИ онкологии Томского НИМЦ Денисову Е.В, Патышевой М.Р., Дроновой Т.А., отдела врожденного иммунитета Университета Гейдельберга Лиу Т, Рябову В., Моссель М., Национального медицинского исследовательского центра имени В. А. Алмазова Киселева А.М., лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ТГУ Казаковой Е.О.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (соглашение №14-15-00350) и гранта ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России” (соглашение № 14.575.21.0140, уникальный идентификатор RFMEFI57517X0140).