

Сведения о выполненных работах в 2016 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

За отчетный период нами были установлены новые функции хитиназо-подобных белков SI-CLP и YKL-39, экспрессирующихся в макрофагах, ассоциированных с опухолью (МАО), а также ассоциации уровня хитиназо-подобных белков YKL-40, SI-CLP и YKL-39 с процессами, связанными с опухолевой профессией. С использованием функциональных модельных систем *in vitro*, основанных на добавлении в культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC очищенных рекомбинантных хитиназо-подобных белков человека, было показано, что YKL-39 усиливает формирование капилляро-подобных структур *in vitro* (ангиогенез) в 4-5 раз по сравнению с контрольной группой. Таким образом, мы выдвигаем гипотезу о возможной способности YKL-39 стимулировать ангиогенное переключение в эндотелиальных клетках сосудов. Образование капилляро-подобных структур эндотелиальных клеток при стимуляции свидетельствует о том, что эндотелиальные клетки отвечают на YKL-39, а Ж1-39 может обладать проангиогенной активностью.

На клиническом опухолевом материале, взятом от онкологических больных с раком молочной железы, раком толстого кишечника и раком печени, были проведены иммуногистохимические окраски и изучение корреляционных связей экспрессии маркеров эндотелиальных клеток микрососудов CD31 и лимфатических сосудов LYVE1 в ткани опухоли с экспрессией CD68, стабилена-1 (RS1), YKL-39, YKL-40, SI-CLP. Была выявлена тенденция к прямой корреляционной зависимости между экспрессией CD31 (плотностью микрососудов) в участках опухоли с нежнотоволокнистой стромой и выраженностью (средний балл) экспрессии YKL39 в клетках воспалительного инфильтрата в участках с грубоволокнистой стромой ($r = 0,38$; $p = 0,07$). Эти данные подтверждают наши результаты, полученные *in vitro* при проведении теста на ангиогенез, о возможном вовлечении YKL-39 в процессы ангиогенного переключения. Однако, при исследовании частоты встречаемости гематогенных метастазов у пациенток больных раком молочной железы в зависимости от уровня экспрессии гена белка YKL-39 в опухолевой ткани было показано, что наибольшая частота развития, а, соответственно, более высокий риск возникновения гематогенных метастазов (более короткий период безрецидивной выживаемости) у пациенток с раком молочной железы после неoadъювантной химиотерапии сопряжены с низким уровнем экспрессии гена белка YKL-39 (уровень экспрессии YKL-39 < 1) в ткани новообразования ($p = 0,005$) (подана заявка на патент). Учитывая обнаруженную нами в течение второго года проекта (2015)

высокую хемотаксическую активность YKL-39, мы выдвигаем гипотезу, что YKL-39 способен программировать как опухолеассоциированные макрофаги, так и эндотелиальные клетки по направлению повышения чувствительности к химиотерапевтическим агентам.

При исследовании частоты встречаемости лимфогенных метастазов у пациенток с раком молочной железы в зависимости от уровня экспрессии гена белка YKL-39 в опухолевой ткани были получены результаты, свидетельствующие о более высоком риске возникновения лимфогенных метастазов, сопряженном с низким уровнем экспрессии в ткани новообразования гена белка YKL-39 (уровень экспрессии $YKL-39 < 1$) ($p = 0,036$) (подана заявка на патент). При помощи иммуногистохимического анализа нами также была выявлена обратная корреляционная зависимость между экспрессией LYVE1 в участках с нежнотоволокнистой стромой и выраженностью экспрессии YKL-39 в клетках воспалительного инфильтрата в участках с грубоволокнистой стромой ($r = -0,94$; $p = 0,05$). Полученные данные относительно лимфогенного метастазирования указывают на возможный протективный эффект хитиназо-подобного белка YKL-39 в опухолевой ткани молочной железы путем вовлечения в процессы ингибирования лимфогенного метастазирования или торможения лимфангиогенеза. Имеет ли YKL-39 эффект и на какой механизм действия это влияние направлено еще предстоит изучить.

При изучении степени инфильтрации CD68+ макрофагов в различных компартментах опухолевой ткани была обнаружена обратная корреляция CD68+ макрофагов среди паренхиматозных элементов с лимфогенным метастазированием у больных раком молочной железы с предоперационной химиотерапией (Mitrofanova I., et al., Immunobiology. 2016).

При исследовании генной экспрессии хитиназо-подобных белков YKL-39, YKL-40 и SI-CLP мы нашли прямую корреляцию уровня экспрессии YKL-40 с экспрессией макрофагального маннозного рецептора CD206, хемокина CCL8, скавенджер-рецептора стабилина-1, CD68, маркера эндотелиальных клеток сосудов CD31. Мы показали, что генная экспрессия SI-CLP также непосредственно коррелирует с этими маркерами: CD68, STAB1, CD31, CD206, CCL8.

При раке толстого кишечника при помощи иммунофлюоресцентных окрасок и конфокальной микроскопии было обнаружено 20% клеток, позитивных по YKL-39, и 15 % SI-CLP+ клеток, располагающихся вблизи CD31-позитивных микрососудов. Мы можем предположить, что при РТК хитиназо-подобные белки могут взаимодействовать с эндотелиальными клетками сосудов и/или участвовать в процессах ангиогенеза.

Таким образом, нами было впервые показано, что секретируемые MAO хитиназо-подобные белки могут обладать проопухолевой активностью или оказывать ингибирующий эффект на процессы диссеминации злокачественного процесса,

которые зависят от индивидуальных эффектов на клеточные функции (например, эффект на ангиогенез), от локализации SI-CLP+ и YKL-39+ макрофагов во внутриопухолевых компартментах, различающихся по соотношению паренхиматозных и стромально-воспалительных компонентов, а так же от типа опухолей.

1. I. Mitrofanova, M. Zavyalova, N. Telegina, M. Buldakov, V. Riabov, N. Cherdyntseva, J. Kzhyshkowska. Tumor-associated macrophages in human breast cancer parenchyma negatively correlate with lymphatic metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Immunobiology*. 2017 Jan; 222(1): 101-109. doi: 10.1016/j.imbio. 2016.08.001.

2. Marina Stakheyeva, Vladimir Riabov, Irina Mitrofanova, Nikolai Litviakov, Evgeny Choynzonov, Nadezhda Cherdyntseva, Julia Kzhyshkowska. "Role of the immune component of tumor microenvironment in the efficiency of cancer treatment: perspectives for the personalized therapy". Review article. Special Issue of Current Pharmaceutical Design 2016/2017 "Targeting of cancer cells and tumor microenvironment: perspectives for personalized therapy" Accepted for publication.

3. Подготовлена монография - Ю.Г. Кжышковска, И.В. Митрофанова, М.В. Завьялова, Н.В. Чердынцева «Олухолеассоциированные макрофаги», Изд-во Наука (2017).

4. Поданы заявки на патенты:

– Кжышковска Ю.Г., Чердынцева КВ., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Цыганов М.М., Митрофанова И.В., Крахмаль Н.В. Способ прогнозирования безрецидивной выживаемости у больных раком молочной железы на основе экспрессии гена белка YKL-39.

– Кжышковска Ю.Г., Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Цыганов М.М., Митрофанова И.В., Крахмаль Н.В. Способ прогнозирования риска лимфогенного метастазирования при раке молочной железы на основе экспрессии гена белка YKL-39.

Получены приоритетные справки.