

Сведения о выполненных работах
в период с 27.07.2022 г. по 30.06.2023 г.

**по проекту «Изучение функционального программирования
опухолеассоциированных макрофагов в прогрессии рака яичников и
ответа опухоли на химиотерапию с целью рационализации
противоопухолевого лечения»,**

поддержанному Российским научным фондом

Соглашение № 21-75-10021

Руководитель: Ларионова Ирина Валерьевна, канд. мед. наук

На втором этапе выполнения проекта нами была освоена и использована технология пространственной транскриптомики Nanostring GeoMx-DSP. Преимуществом технологии Nanostring является то, что на каждом срезе анализируются определенные выбранные области интереса (region of interest – ROI). До выбора регионов проводилась дифференциальная окраска цитокератин (CK+)-позитивных опухолевых клеток и CD45+ иммунного инфильтрата меченными флюорофорами антителами, что позволило нам на ткани определить определенные компартменты иммунных клеток и выделить области с различным их расположением относительно опухолевых клеток (внутриопухолевые иммунные клетки; иммунные клетки, расположенные в инвазивном фронте; иммунные клетки, расположенные в строме, не взаимодействующие с опухолевыми клетками). Особый интерес имела макрофагальная популяция, локализуемая во внеклеточном компартменте, потому что именно в этих ROIs клетки по морфологии напоминали пенистые макрофаги, описанные нами в прошлом отчетном году (Ракина М.А. и др., Сибирский онкологический журнал, 2022). Мы сопоставили данные пилотного пространственного транскриптома, полученные в 2023 году при помощи технологии Nanostring GeoMX, и данные другой технологии 10x Genomics Visium, полученные в 2022 году. Транскриптомная сигнатура таких ОАМ включала следующие гены: CCL18, APOC1, GPNMB, LYZ, APOE, C1QC, C1QB, CTCB, SPP1, CTSS и другие гены. ОАМ, располагающиеся во внеопухолевом компартменте, экспрессируют часть генов из данной сигнатуры (APOE, SPP1, LYZ, CTSS). Поскольку клетки выбирались по морфологии, мы ожидаем, что транскриптом ROI, выбранных по дифференциальному маркеру CD68, будет больше соответствовать описанному с использованием 10x Visium. Интересно, что обнаруженный нами транскриптом ОАМ соответствует так называемым липидным макрофагам (Lipid-laden macrophages) в опухолях. Рядом свежих исследований с помощью секвенирования единичных клеток была обнаружена данная субпопуляция ОАМ, при этом во многих исследованиях профиль Lipid-laden macrophages имел повышенную экспрессию SPP1, C1QC, TREM2, CCL18, APOC1, GPNMB, LYZ, APOE и других генов (Masetti M, et al. 2022; Zhang L, et al., 2020; Yang Q, et al., 2021; Zhang H, et al., 2022; Zhou L, et al., 2022). Данные собраны в обзорную статью и находятся на рецензии в журнале Clinical and Experimental Medicine (Q1, IF=5,05) (Rakina M., et al., under review). В рамках нашего проекта мы впервые обнаружили lipid-laden macrophages со сходным профилем в

образцах рака яичников. Это определенно представляет интерес для нас и стимулирует исследовать данную популяцию более детально. В 2023-2024 году планируется завершить валидацию обнаруженных маркеров на крупной выборке пациенток с РЯ.

Асцит — состояние, характеризующееся аномальным скоплением жидкости в брюшной полости. Показана связь между стадией РЯ и объемом асцитической жидкости. Частота асцита составила 49,4 % при I стадии и 62,5 % при II стадии заболевания, и возростала до 90,1 % и 100 % при III и IV стадиях соответственно (отражено в обзоре Rakina M., et al., *Int J Mol Sci.* 2022). ОАМ являются преобладающей популяцией иммунных клеток в асцитической жидкости, составляя до 95 % клеточного компонента (Казакова А.Д., и др., *Вестник ТГУ*, 2022). Мы провели фенотипический анализ макрофагов при помощи проточной цитометрии. Содержание макрофагов той или иной субпопуляции варьировалось от случая к случаю. В среднем содержание CD45+ клеток составило 81,61 %, CD11b+ макрофагов - 67,69 %, CD14+ макрофагов - 32,22 %. Внутри субпопуляций значения также варьировались в широком диапазоне: количество CD11b+CD206+ клеток составило 41,50 %, CD14+CD206+ - 68,36 %, CD11b+CD163+ - 39,58 %, CD14+CD163+ - 68,65 %, CD11b+TIE2+ составили 50,21 %, CD14+TIE2+ составили 60,92 %. Интересно, что среди CD14+ моноцитарных макрофагов экспрессия CD206, CD163 и TIE2 наблюдалась чаще. В популяции CD14+ клеток количество CD163+ макрофагов было выше (68,65 %) по сравнению с CD11b+ макрофагами (39,58 %), на уровне тенденции статистической значимости ($p = 0,057$). Однако, общее количество CD14+ клеток было ниже (32,22 %) относительно CD11b+ клеток (67,69 %, $p = 0,024$). Также путем градиентного центрифугирования и магнитной сепарации из асцитической жидкости больных раком яичников были выделены CD14+ макрофаги. Была отмечена высокая экспрессия гена CCL18, ответственного за метастазирование, а также фактора роста опухолей TGF β и про-воспалительных цитокинов IL6, IL8, IL1 β . Эти данные указывают на то, что макрофаги асцитической жидкости проявляют про-опухолевый фенотип. В 2023 году планируется исследовать экспрессию новых маркеров в ОАМ асцитической жидкости и уточнить их транскриптомную активность и вклад в этапы канцероматоза.

Нами продолжился анализ субпопуляционного состава моноцитов периферической крови пациентов с раком яичников. Статистически значимые различия между субпопуляционным составом моноцитов пациентов с раком яичников и доноров были получены для следующих субпопуляций: CD14+CD16-CD163+ ($p = 0,001$), CD14+CD16+CD163+ ($p = 0,00001$), CD14-CD16+CD163+ ($p = 0,001$), CD14+CD16+CCR2+ ($p = 0,003$), CD14-CD16+TIE2+ ($p = 0,001$). Таким образом, для всех перечисленных субпопуляций, кроме CD14-CD16+TIE2+, количество моноцитов у пациентов повышалось по сравнению с донорами. По популяции CD14-CD16+TIE2+ отмечалось снижение количества моноцитов у пациентов (62,01 %) в сравнении с донорами (97,51 %, $p = 0,001$). Было проведено сравнение субпопуляционного состава моноцитов пациентов в зависимости от наличия/отсутствия асцита, а также от наличия/отсутствия прогрессии. В группе

пациентов с асцитом отмечалось снижение количества моноцитов популяции CD14+CD16-CD163+ (99,44 %) по сравнению с пациентами без асцита (99,95 %), на уровне тенденции статистической значимости ($p=0,054$). По популяции CD14-CD16+CD206+ тоже отмечалось снижение количества моноцитов в группе пациентов с асцитом (63,38 %) по сравнению с пациентами без асцита (91,14 %), на уровне тенденции статистической значимости ($p = 0,057$).

Статистически значимые данные были получены при сравнении групп пациентов с отсутствием и с наличием опухолевой прогрессии. При отсутствии прогрессии у пациентов отмечалось большее количество CD14+CD16+ промежуточной субпопуляции моноцитов (4,36 %) по сравнению с пациентами с прогрессией (1,20 %, $p = 0,019$). В группе пациентов с прогрессией повышалось содержание моноцитов промежуточной субпопуляции CD14+CD16+CD206+ (99,79 %) по сравнению с пациентами без прогрессии (68,03 %, $p = 0,019$). По субпопуляции CD14+CD16-CD163+ в группе пациентов с прогрессией отмечалось повышение количества моноцитов (99,99 %) по сравнению с группой пациентов без прогрессии (99,85 %, $p = 0,025$).

Была создана культура *in vitro* моноцитарных макрофагов, стимулированных кондиционированными средами клеток рака яичников SKOV-3 и асцитической жидкостью, полученной от тех же пациенток. При сравнении не стимулированных макрофагов с макрофагами, стимулированными асцитической жидкостью в объеме 20 % и 100 % от общего объема среды в лунке, экспрессия CD163 была статистически значимо выше в стимулированных макрофагах: 2,149 (0,49; 3,53) vs 33,98 (8,58; 81,53), $p = 0,029$ и 2,149 (0,49; 3,53) vs 9,46 (5,21; 35,37), $p = 0,029$, соответственно. Также при сравнении макрофагов, стимулированных супернатантом опухолевых клеток в объеме 20 % от всего объема среды в лунке, и макрофагов с той же стимуляцией при добавлении ХТ агента было обнаружено статистически значимое понижение экспрессии генов CD163 и RS1 при добавлении ХТ: 9,48 (3,29; 25,06) vs 0,79 (0,01; 5,14), $p = 0,032$ и 0,09 (0,05; 0,65) vs 0,01 (0,00; 0,06), $p = 0,032$, соответственно. Эти данные указывают на перепрограммирование ОАМ асцитической жидкости при воздействии ХТ.

Таким образом, в отчетном году нами были выявлены ключевые гены, характеризующие таргетную популяцию ОАМ (пенистых клеток), для которых будет проведена валидация, и будут получены данные о конкретном фенотипе этих ОАМ. Первичные данные позволили охарактеризовать ОАМ из асцитической жидкости. Планируются дальнейшие исследования фенотипа и функциональной активности макрофагов асцитической жидкости.