

Сведения о выполненных работах  
в период с 27.07.2021 г. по 30.06.2022 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

Несмотря на хороший ответ на первую линию стандартной химиотерапии (ХТ), развитие рецидива у пациенток с раком яичников (РЯ) выявляется в течение короткого периода времени в 70 % случаев (Henderson et al., 2018). Выживаемость без прогрессирования составляет примерно от 12 до 18 месяцев, в зависимости от ответа опухоли на химиотерапию (Lheureux et al., 2019). Особенностью РЯ является то, что помимо стандартных путей метастазирования, через лимфатическую и кровеносную систему, метастазирование РЯ чаще происходит через брюшную полость (имплантационный тип) (Казакова А.Д. и др., Вестник ТГУ, 2022).

Актуальной является задача выяснить, какие субпопуляции опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) существуют при раке яичников, как они взаимодействуют с химиотерапией и как влияют на течение и исход заболевания. В нашем проекте проблема роли врожденного иммунитета в формировании резистентности опухоли к химиотерапии была изучена на уровне секвенирования единичных клеток опухоли (пространственная транскриптомика), содержащей ОАМ. Далее, мы проанализировали функциональные субпопуляции ОАМ в опухоли и в асците пациентов с раком яичников.

Распределение CD68+ макрофагов сильно варьировалось среди образцов опухоли яичников (Ракина М.А., и др., 2022). Были обнаружены внутриопухолевые макрофаги с равномерным и диффузным расположением с увеличенным накоплением вокруг/внутри очага некроза и фронта инвазии; равномерно расположенные в пределах всей опухоли; отдельные макрофаги или небольшие группы макрофагов в строме; неравномерное внутриопухолевое расположение макрофагов. Нами также были обнаружены скопления гигантских CD68-позитивных макрофагов, напоминающих пенообразные клетки. Такие ОАМ имеют рыхлую пенистую зернистую цитоплазму, иногда с включениями. Наличие таких макрофагов в опухоли обнаружено в 20 из 42 случаев (почти 50 %). Интересно, что все они имеют запущенную стадию рака яичников: 9 пациенток со стадией 3С и 11 пациенток с 4 стадией. Наличие пенообразных ОАМ имело тенденцию ассоциироваться с прогрессированием рака яичников, включая метастазирование и рецидивирование. Дальнейший анализ ИГХ позволил выявить, что пенообразные макрофаги экспрессируют скавенджер-рецептор стабиллин-1 почти в 100 % случаев. Экспрессия другого маркера M2 CD163 была почти такой же, однако экспрессия CD206

отсутствовала в большинстве образцов. С помощью конфокальной микроскопии мы подтвердили ко-экспрессию стабиллина-1 в макрофагах CD68+. Стабилин-1 экспрессировался не менее чем в 50 % гигантских ОАМ. Иммунофлюоресцентный анализ нескольких образцов опухоли также продемонстрировал ко-экспрессию других сквенджер-рецепторов: CD163 и CD36, в пенообразных клетках. Подобно ИГХ, в большинстве образцов мы не наблюдали экспрессию CD206 в ОАМ с пенообразной морфологией.

Основным результатом нашей работы в отчетном периоде был полнотранскриптомный анализ срезов опухолевой ткани с помощью технологии пространственной транскриптомики единичных клеток – 10x Visium. Анализировались следующие 4 группы: 1) пациентки, получавшие НАХТ, и имевшие неблагоприятный прогноз в течение 2 лет после лечения – рецидивы или метастазы (N = 5), 2) пациентки, получавшие НАХТ, и имевшие благоприятный прогноз в течение 2 или более лет после окончания лечения (N = 3); 3) пациентки без предоперационного лечения, имевшие неблагоприятный прогноз в течение 2 лет после лечения (N = 4); 4) пациентки без предоперационного лечения, имевшие благоприятный прогноз в течение 2 или более лет после окончания лечения (N = 4). Основная идея такого дизайна исследования заключалась в сравнении опухолей с благоприятным и неблагоприятным прогнозом, в поиске биомаркеров опухолевой прогрессии, а также влияния НАХТ на композиционный состав опухоли и связи НАХТ с прогрессией опухоли. В результате биоинформатического анализа были выявлены кластеры, экспрессирующие схожие или уникальные группы генов, относящиеся к различным компартментам внутри опухоли и к группам пациенток. В следующем году планируется подробный анализ профилей каждого кластера, поиск общих и уникальных кластеров для каждой экспериментальной группы пациенток, поиск кластеров, которые будут характеризовать опухоли с благоприятным и неблагоприятным исходом заболевания. Также будут охарактеризованы кластеры, в которых локализованы ОАМ.

Чрезвычайно важным фактором, определяющим поведение ОАМ в опухолевом очаге, рассматривается и состояние моноцитов крови, которые инфильтрируют в опухоль и являются главным пластическим ресурсом ОАМ. В течение отчетного периода оценка субпопуляционной структуры общего пула моноцитов у пациентов с раком яичников проводилась нами по трем основным субпопуляциям: классические CD14+CD16-, промежуточные CD14+CD16+ и минорные CD14-CD16+. Сравнительный анализ субпопуляционного состава моноцитов больных раком яичников и доноров показал статистически значимые различия для CD163+ субпопуляции макрофагов: CD14+CD16+CD163+ у пациентов 99,78 % и у доноров 93,92 % ( $p < 0,001$ ); CD14-CD16+CD163+ у пациентов 99,5 %, у доноров 93,8 % ( $p < 0,001$ ); CD14+CD16+CD163 у пациентов 99,6 %, у доноров 62,2 % ( $p < 0,001$ ). Значимые различия показаны для промежуточной CD14+CD16+ субпопуляции макрофагов, экспрессирующих CD206 (пациенты – 91,4 %, доноры – 90,8 %) ( $p = 0,078$ ); CCR2 (пациенты – 68,60 %, доноры – 30,85 %) ( $p < 0,001$ ); Tie2 (пациенты – 99,92 %, доноры – 99,13 %) ( $p < 0,01$ ). Кроме того, повышение в содержании

CD14+CD16-CCR2+ субпопуляции было показано для пациентов (89,72 %) по сравнению с донорами (53,54 % ( $p = 0,045$ )).

При раке яичников ОАМ имеют клиническую значимость не только благодаря инфильтрации в опухолевую массу, но и благодаря тесному взаимодействию с раковыми клетками в асцитической жидкости (Казакова А.Д. и др., Вестник ТГУ, 2022). В нашем эксперименте содержание макрофагов в составе асцитической жидкости варьировалось в широких пределах от 1 % до 30 % от общей клеточной массы. Субпопуляционный состав макрофагов был представлен как отдельными CD68+CD163+ и CD68+CD206+ клетками, так и тройными позитивными макрофагами CD68+CD163+CD206+. Среди макрофагальной популяции было обнаружено до 90 % тех, которые экспрессируют стабиллин-1. Также было показано, что M2 макрофаги в составе асцитической жидкости экспрессируют моноцитарный маркер CD14. Это свидетельствует о том, что большинство макрофагов в асцитической жидкости происходит из рекрутированных наивных моноцитов, а не является резидентным. Клеточный компонент асцитической жидкости был также представлен фибробластами и опухолевыми клетками, которые находились в виде одиночных клеток или формировали многоклеточные структуры – сфероиды. Было сделано интересное замечание, что опухолевые клетки могут экспрессировать маркеров фибробластов alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA). Анализ литературных данных подтверждает этот феномен и объясняет его тем, что опухолевые клетки претерпевают частичный эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), что и приводит к экспрессии мезенхимальных маркеров (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8775835/>).

Таким образом, в течение первого года проекта был проведен комплексный анализ макрофагов в опухолевой ткани, в асцитической жидкости и моноцитов в периферической крови пациенток с раком яичников. Нами было выполнено полнотранскриптомное профилирование опухолевой ткани. Дальнейший биоинформатический анализ позволит нам выявить кластеры, содержащие уникальные паттерны генов, ассоциированных с неблагоприятным прогнозом после НАХТ и с влиянием химиотерапии на исход заболевания, а также выявить субпопуляции ОАМ, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом.