

**КОВАЛЕВА ОЛЬГА ВЛАДИМИРОВНА**

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРОБИОМА И ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ  
КЛЕТОК СТРОМЫ В ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, Стилиди Иван Сократович).

**Научный консультант:**

доктор биологических наук

**Чевкина Елена Максимовна**

**Официальные оппоненты:**

**Завалишина Лариса Эдуардовна**, доктор биологических наук, профессор кафедры патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Михалева Людмила Михайловна**, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор «Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского».

**Кармакова Татьяна Анатольевна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский научный центр рентгенорадиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «29» сентября 2022 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01 (Д001.017.01), созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478 г. Москва, Каширское шоссе, д.23).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва Каширское шоссе, д.24) и на сайте [www.ronc.ru](http://www.ronc.ru)

Автореферат разослан «.....» .....2022 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



**Кадагидзе Заира Григорьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Злокачественность опухоли и ее способность к метастазированию в значительной степени зависит от ее микроокружения. В ходе прогрессии опухоли возникает взаимодействие между неопластическими клетками и стромой, которое может осуществляться непосредственно через межклеточные контакты или паракринно. Уже возникшая солидная опухоль состоит не только из неопластических клеток, но и поддерживающей ее стромы, в состав которой входят различные типы клеток, а также внеклеточный матрикс. Изменение микроокружения опухолевых клеток дает им возможность роста и инвазии. Основными клеточными популяциями, составляющими опухолевое микроокружение, являются эндотелиальные и иммунные клетки (макрофаги, нейтрофилы и лимфоциты). В частности, макрофаги, ассоциированные с опухолью (МАО), являются основной частью опухолевого инфильтрата и могут составлять 50% от ее массы. Эти клетки производят различные цитокины и ростовые факторы, влияющие на и/или определяющие развитие опухоли.

Практически все современные исследования МАО посвящены функциональному анализу молекулярных маркеров макрофагов второго типа, что считается необходимым для понимания механизма их функционирования и выяснения, какие из функций МАО способствуют росту опухоли. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, считаются ключевыми клетками врожденного иммунитета, участвующими в уходе опухоли из-под иммунологического надзора. Это подтверждается эпидемиологическими данными, которые показывают, что повышенное количество макрофагов 2 типа в популяции МАО коррелирует с негативным прогнозом заболевания для многих типов опухолей. Однако последние исследования показывают, что большую прогностическую ценность имеет соотношение макрофагов 1 типа и макрофагов 2 типа (M1/M2) в популяции МАО, а также их локализация внутри опухоли. Также показано, что большое количество M2 в опухолях коррелирует со снижением чувствительности к таргетной терапии EGFR ингибиторами. Для рака пищевода, как и для других опухолей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), повышенное количество макрофагов, ассоциированных с опухолью, может коррелировать как с плохим, так и с хорошим прогнозом.

Для различных опухолей, например для опухолей ЖКТ, характерно сильное влияние микробиологической составляющей, которая развивается из нормальной микробиологической флоры под воздействием канцерогенных факторов. До относительно недавнего времени легкие считались стерильным органом, в отличие от органов ЖКТ. Однако все больше исследований показывает, что это не так. Микробиоту легкого человека составляют порядка 10–100 клеток бактерий на 1000 клеток легкого, которые являются его неотъемлемой частью как при нормальном функционировании, так и при патологии.

Теории бактериально-опосредованного канцерогенеза выдвигались с середины 20-го века, когда McCoy и Mason впервые предположили связь между *Enterococcus* и карциномой сигмовидной кишки. Sears и Pardoll сформулировали гипотезу «альфа-жучка», в которой такие виды, как *Bacteroides fragilis*, играют центральную проонкогенную роль, вырабатывая энтеротоксины и способствуя тем самым возникновению колоректального рака. Впоследствии Tjalsma et al. в 2012 году предложили модель «водитель-пассажир», в которой «бактерии-водители» (например, *B. fragilis*) запускают многоэтапный процесс злокачественной трансформации, включая воспаление и повышенную клеточную пролиферацию. Расширением этой теории является «ключевая гипотеза» Hajishengallis et al., в которой ключевые патогены, даже при низкой численности, способствуют колонизации дополнительными патогенами. За этим следует инверсия ответной реакции хозяина, что приводит к формированию дисбаланса комменсальной микробиоты и стимуляции воспалительного ответа, который, в свою очередь, может способствовать развитию или прогрессии опухоли.

Таким образом, различные компоненты микробиома могут вносить свой вклад в развитие уже сформировавшихся опухолей как путем непосредственного влияния на опухолевые клетки, так и посредством влияния на опухолевое микроокружение. Основными клеточными типами опухолевой стромы, реагирующими на бактерии, являются макрофаги и нейтрофилы. В условиях опухолевого микроокружения происходит интеграция противовоспалительных сигналов, поступающих от опухолевых клеток, и провоспалительных сигналов от бактерий. Как происходит эта интеграция, как развивается микробиота опухоли, какой именно фенотип приобретают клетки стромы, и каким образом это влияет на течение заболевания, на данный момент неизвестно. Это обуславливает актуальность представленного исследования.

### **Степень разработанности темы**

Согласно последним статистическим данным, злокачественные опухолевые заболевания почти во всех странах мира занимают второе место среди причин смерти населения. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) является одним из самых распространенных, неблагоприятно текущих (основные мишени метастазирования – кости и мозг) и сложно поддающихся лечению онкологических заболеваний. Данное заболевание является большой медицинской и социальной проблемой, в лучшем случае приводя к инвалидности. Как и для многих других онкопатологий, одной из проблем НМРЛ остается поздняя диагностика. Многие больные умирают в течение года после постановки диагноза, поскольку в большинстве случаев НМРЛ выявляется уже на поздних стадиях. Рак пищевода находится на шестом месте по смертности среди злокачественных опухолевых заболеваний. Около 70% больных умирают в течение года после постановки диагноза, поскольку в большинстве случаев рак пищевода (как и НМРЛ) выявляется на поздних стадиях. В отличие от других вышеупомянутых типов опухолей,

механизмы развития рака пищевода не сегодняшний день изучены слабо, и механизмы его возникновения не ясны.

Известно, что процесс хронического воспаления со временем может приводить к возникновению опухолей. Рак пищевода и рак легкого в данном случае не являются исключениями. Также возникновению и прогрессии опухоли способствует ее микроокружение. При развитии опухоли происходит непрерывное взаимодействие опухолевых клеток со стромальными, и в большинстве случаев именно стромальный компонент опухоли приводит к ее прогрессии и метастазированию. Строма опухоли состоит из мезенхимальных клеток (в частности, фибробластов и миофибробластов), окруженных внеклеточным матриксом, содержащим различные структурные белки и сигнальные молекулы. Другой клеточной популяцией, составляющей опухолевое микроокружение, являются эндотелиальные и иммунные клетки (макрофаги, нейтрофилы и лимфоциты). Практически все современные исследования посвящены функциональному анализу молекулярных маркеров M2 (альтернативно активированных) макрофагов, что считается необходимым для понимания механизма действия MAO, и выяснения, какие из их функций способствуют росту опухоли. MAO, считаются ключевыми клетками врожденного иммунитета, принимающими участие в развитии опухолей, в то время как другой тип данных клеток - классически активированные макрофаги (M1) - исследованы в меньшей степени. Для них, в отличие от M2 макрофагов, крайне плохо описаны молекулярные маркеры и недостаточно исследований, характеризующих их количество, локализацию и фенотип в опухолях.

Для M2 макрофагов в опухолях легкого наблюдается вполне устоявшаяся не сегодняшний день парадигма. А именно, повышенное количество MAO коррелирует с плохим прогнозом. Также показано, что большое количество M2 макрофагов в опухолях коррелирует со снижением чувствительности к таргетной терапии. Известно, что на фенотип макрофагов опухолевые клетки могут влиять дистанционно, например, посредством miRNA, содержащихся в экзосомах, выделяемых опухолевыми клетками. Также показано, что повышенное количество MAO коррелирует с плохим прогнозом для опухолей пищевода.

Таким образом, при изучении микроокружения опухолей внимание исследователей привлекают прежде всего различные типы эукариотических клеток, начиная от стромальных фибробластов и клеток иммунной системы, заканчивая эндотелиальными клетками и адипоцитами. Однако для многих солидных опухолей важную роль играет также и микробиом, причем это не ограничено органами ЖКТ, для которых его присутствие является нормой. В частности, недавно была охарактеризована нормальная микробиота легкого, органа, который долгое время считался стерильным. Микроорганизмы могут принимать как непосредственное участие в опухолевой трансформации, так и создавать неспецифический хронический

воспалительный фон, который может участвовать в процессе возникновения опухолей. Например, показано повышение количества двух родственных типов бактерий *Firmicutes* и *TM7* в опухолях легкого. Более того, два рода бактерий *Veillonella* and *Megasphaera* встречались в опухолях легкого значительно чаще других.

По аналогии с *Helicobacter pylori* для желудка, показано, что *Campylobacter spp.* может принимать участие в развитии токсин-опосредованного воспаления и приводить к развитию аденокарциномы пищевода. Однако интересно отметить, что *Helicobacter pylori* сама по себе может защищать от развития аденокарциномы пищевода. Также показана роль другого представителя микробиоты в развитие рака пищевода. *Fusobacterium nucleatum* при раке пищевода ассоциирована с более коротким периодом выживаемости пациентов, а также может вносить потенциальный вклад в агрессивность опухоли путем активации различных цитокинов.

Также существует обратная зависимость между количеством ДНК *F. nucleatum* и плотностью CD3<sup>+</sup> Т-клеток. Активность *F. nucleatum* приводит к запуску ряда процессов, в результате которых повышается экспрессия миРНК21, которая, в свою очередь, играет опухоль-промотирующую роль, усиливая пролиферацию клеток карциномы. Возможно, *F. nucleatum* также оказывают ингибирующее действие на иммунный ответ Т-клеток, что приводит к развитию более агрессивных опухолей. Дальнейшее изучение влияния *F. nucleatum* на иммунный ответ может скорректировать существующие методы иммунотерапии опухолей. Также концентрация *F. nucleatum* может служить в качестве прогностического биомаркера колоректальных опухолей.

Микробиота легкого представляет собой динамичную систему, которая зависит от множества факторов. Разные участки легкого могут быть охарактеризованы специфичным микробным «пейзажем», который зависит от аборигенной микробиоты, иммунного статуса хозяина и факторов внешней среды. Микробиота легкого может существенно меняться при различных заболеваниях данного органа и дыхательных путей. В целом большинство заболеваний можно охарактеризовать дисбактериозом и превалированием патогенных видов микроорганизмов.

Относительно недавно также была подтверждена роль микроорганизмов в образовании злокачественных опухолей легкого и протекании онкологических процессов. Так, была показана связь между злокачественными опухолями легкого и *Mycobacterium tuberculosis*, активность которых стимулирует синтез фактора некроза опухолей, что стимулирует онкологические процессы. Современные исследования подтвердили ассоциацию повышенного содержания *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter spp.* и *Escherichia coli* с развитием опухолей легкого. По сравнению с контрольными образцами нормальной ткани в случаях онкологических заболеваний легкого наблюдается повышенное содержание представителей *Granulicatella*, *Abiotrophia*,

*Streptococcus* и развитие патогенных микроорганизмов, таких как *Legionella* и *Moraxella* (например *Moraxella catarrhalis*). Микробиота опухолей легкого оказывает влияние на протекание заболеваний на многих уровнях. Так, при дисбактериозе легкого наблюдается повышение концентрации активных форм кислорода, что приводит к учащению двойных разрывов ДНК, и, как следствие, воспалительным процессам. В ряде случаев aberrantные микроорганизмы в составе микробиоты легкого вызывают повышенный синтез интерлейкинов. К примеру, установлена связь между активностью *Haemophilus influenza* и выработкой интерлейкина IL-17, что стимулирует развитие опухолей.

Изучение микробиоты легкого при онкологических заболеваниях осложнено в связи с отсутствием контрольных образцов. Тем не менее, анализ микробиома, ассоциированного со злокачественными опухолями, может позволить выявить микроорганизмы, присутствие которых специфично для определенных процессов или популяций. Изучение микробиоты легкого на разных стадиях онкологических заболеваний необходимо для исследования влияния микроорганизмов на клиническую картину на разных стадиях процесса. Также изучение микробиоты опухолей легкого позволит выявить микроорганизмы, которые можно рассматривать в качестве биомаркеров онкологических заболеваний.

Подводя итоги, нужно отметить, что в течение последних лет в ведущих лабораториях было показано, что опухолевые клетки нельзя рассматривать отдельно от опухолевого микроокружения. Однако самые последние исследования показывают, что опухолевое микроокружение нельзя рассматривать без его микробиологической составляющей. Даже для таких типов опухолей, как рак молочной железы (который в первичном рассмотрении никак не ассоциирован с микробиотой), показан немаловажный вклад бактериального компонента в развитие патологии. Таким образом, именно комплексное изучение опухолевых клеток, клеток опухолевого микроокружения и микробиома поможет лучше понять индивидуальные механизмы возникновения и прогрессии опухоли и разработать персонализированные терапевтические подходы.

### **Цель исследования**

Целью данного исследования является изучение фундаментальных механизмов взаимодействия микробиологического и клеточного компонентов опухолевой стромы и их вклада в опухолевую прогрессию.

### **Задачи исследования**

1. Провести комплексный анализ микробиома в опухолях пищевода и легкого методом направленного секвенирования гена 16S рРНК.

2. Изучить клеточный состав и фенотип иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы в опухолях пищевода и легкого методом иммуногистохимии.
3. Провести анализ взаимосвязи между бактериальным и клеточным компонентами опухолевой стромы.
4. Изучить формирование цитотоксичности и/или толерантности макрофагов под воздействием бактерий опухолевой стромы.
5. Изучить механизмы отбора опухолевых клеток под действием цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета.

### **Методология и методы исследования**

В качестве методологической основы исследования был использован комплексный подход с применением современных клеточных и молекулярно-биологических технологий и методов исследования:

1. При формировании выборок образцов опухолей от пациентов с онкологическими заболеваниями все образцы были аннотированы всеми необходимыми клиническими и патоморфологическими данными.
2. Выделение нуклеиновых кислот из парафиновых и замороженных образцов тканей проводилось при помощи коммерческих наборов.
3. Определение состава микробиома опухолей проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК.
4. Биоинформатическая обработка результатов высокопроизводительного 16S метагеномного секвенирования проводилась с использованием соответствующего программного обеспечения и баз данных.
5. Для подтверждения результатов секвенирования и для определения количества бактерий в образцах тканей применялась количественная ПЦР с использованием гидролизуемых зондов.
6. Анализ экспрессии маркеров клеток воспалительного инфильтрата в образцах тканей легкого и пищевода проводился методом иммуногистохимии.
7. Для получения моноклональных антител к маркерам клеток воспалительного инфильтрата использовались следующие молекулярно-биологические методы исследования: молекулярное клонирование, полимеразная цепная реакция, трансформация бактериальных клеток, выделение и очистка рекомбинантных белков, иммунизация с последующим получением антител с помощью гибридомной технологии.
8. Анализ количества пролиферирующих макрофагов и макрофагов смешанного фенотипа в образцах тканей легкого проводился методом иммунофлуоресценции.



9. Статистический анализ данных проводился с использованием GraphPad Prizm.9. Микробное разнообразие в образцах ( $\alpha$ -разнообразие) оценивали с помощью индексов Chao1, ACE, Шеннона и обратного индекса Симпсона. Микробное сходство между образцами ( $\beta$ -разнообразие) оценивали с помощью индекса Брея-Кертиса. Для визуализации полученных данных использовали приложение MicrobiomeAnalyst. Различия состава микробиома между образцами опухолей и условно нормальной тканью, а также между другими группами сравнения оценивали с помощью критерия Вилкоксона для парных выборок или непараметрического критерия Манна-Уитни.

При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Анализ выживаемости проводился путем построения кривых дожития по методу Каплана – Майера. Сравнение достоверности различий проводили при помощи логарифмического рангового критерия. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

10. Для анализа цитотоксичности и/или толерантности макрофагов и устойчивости опухолевых клеток были использованы различные клеточные модели, разработанные автором исследования (применимые как для первичных клеток, так и для клеточных линий).

11. Для изучения транскриптома проводили высокопроизводительное секвенирование с использованием геномных технологий (RNAseq на платформе Illumina).

12. Подтверждение результатов изучения транскриптома проводили с использованием различных молекулярно-биологических методов, включая ПЦР в режиме реального времени, Вестерн-блот анализ, иммуноферментный анализ и др.

### **Научная новизна**

В данной работе впервые проведено комплексное изучение микробиологического и клеточного компонентов опухолевой стромы при немелкоклеточном раке легкого и плоскоклеточном раке пищевода. Описаны новые прогностические маркеры НМРЛ и рака пищевода. Описан детальный микробиологический состав исследуемых опухолей. Впервые показана ассоциация общей бактериальной нагрузки с фенотипом иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы и прогностическая значимость данных показателей. Впервые при помощи модельной системы и на клиническом материале изучено влияние микробиома опухоли на пролиферацию клеток опухоли. При помощи модельной системы изучены сигнальные пути, посредством которых опухолевые клетки способны избегать цитотоксического действия макрофагов. Использованные методические подходы включают большое количество современных молекулярно-биологических и клеточных технологий, в том числе и уникальных, разработанных автором работы. Вместе с тем, все использованные методы уже хорошо зарекомендовали себя при решении фундаментальных и прикладных задач в практике научно-

исследовательских лабораторий. Таким образом, впервые получен ряд приоритетных научных результатов о влиянии различных компонентов опухолевой стромы на процесс опухолевой прогрессии и перспективы их использования в противоопухолевой терапии.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В рамках данной работы впервые применен междисциплинарный подход, сочетающий микробиологические, генетические и клеточно-биологические методы с использованием экспериментальных модельных систем и образцов клинического материала, к изучению роли стромы в патогенезе опухолей пищевода и легкого. Получен ряд приоритетных данных, свидетельствующих о ранее не известных взаимодействиях различных составляющих опухолевого микроокружения. Большая часть полученных результатов опубликована как в отечественных, так и в зарубежных научных журналах и имеет большое теоретическое значение, существенно расширяя уровень представлений о механизмах опухолевой иммуносупрессии, а также о влиянии опухолевого микробиома на ее формирование. Полученные результаты могут служить основой для дальнейших исследований молекулярных механизмов опухолевой прогрессии. Ряд данных может иметь также практическое значение при создании новых диагностических наборов для определения качественного и количественного состава микробиома в образцах опухолей. Определение бактериальной нагрузки в опухолях позволит более точно предсказывать эффект проводимой терапии. Помимо этого, полученные данные, а именно, выявленные в ходе работы новые молекулярные маркеры опухолевой стромы, могут быть использованы в клинической практике для определения прогноза заболевания и в качестве мишеней для терапии данных опухолей.

### **Личный вклад**

Автор лично провел анализ научной литературы по теме диссертации, принимал непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке плана исследования. Автором проведены экспериментальная реализация плана исследования, анализ и обобщение полученных данных, подготовлены публикации, полностью отражающие все полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены лично автором на всероссийских и международных научных конференциях.

### **Соответствие паспорту специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия («Биологические науки») и направлению исследований п.2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)».

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Перспективным и удобным для использования маркером макрофагов, ассоциированных с опухолью, является транскрипционный фактор PU.1.
2. Макрофагальные маркеры экспрессируются опухолевыми клетками и могут использоваться для определения прогноза заболевания, в частности CHID1 и iNOS для НМРЛ.
3. Нормальная и опухолевая ткань отличаются по качественному и количественному составу резидентного микробиома.
4. Оценка общей бактериальной нагрузки в сочетании с фенотипом клеток опухолевой стромы является перспективным прогностическим маркером опухолей различной локализации.
5. Цитотоксическая активность макрофагов способствуют отбору более злокачественных клонов опухолевых клеток.

### **Внедрение результатов исследования**

Экспериментально-практический материал, полученный в работе, вносит существенный вклад в понимание механизмов опухолевой прогрессии, а также открывает новое направление исследований, направленных на повышение эффективности прогнозирования течения заболевания, основанное на комплексном анализе микробиологического и клеточного компонентов опухолевой стромы. Методические подходы, разработанные в ходе выполнения работы, внедрены в научно-исследовательскую деятельность НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для изучения новых маркеров с целью повышения эффективности лечения онкологических заболеваний.

### **Апробация**

Апробация диссертации состоялась 26 апреля 2022 года на объединенной научной конференции отдела химического канцерогенеза, лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов, лаборатории биологии стромальных клеток опухолей, лаборатории комбинированной терапии опухолей, отдела экспериментальной биологии опухолей, отдела иммунохимии, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории цитогенетики, лаборатории молекулярной биологии вирусов НИИ канцерогенеза, лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Результаты исследования были представлены и обсуждены на 13 научных конференциях: II-VI всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 2016 г., 2017 г., 2018 г., 2019 г., 2021г.), XXII-XXV Российский Онкологический Конгресс (Москва, Россия, 2018 г., 2019 г., 2020г, 2021г.), VII Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи 2021» (Санкт-Петербург, Россия, 2021г.), VII Российский конгресс лабораторной медицины

(Москва, Россия, 2021г.), XVI Международный конгресс РООУ (Москва, Россия, 2021г.), Международный форум инновационная онкология (Москва, Россия, 2021 г.).

### Публикации

Результаты исследования изложены в 36 научных публикациях, из которых 15 статей опубликованы в журналах, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России, получено 2 патента РФ.

### Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 220 листах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 389 источников. Текст иллюстрирован 23 таблицами и 89 рисунками.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Для проведения исследования были подобраны 100 парафиновых блоков от первичных больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) и 48 больных с плоскоклеточным раком пищевода (ПРП), проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствуют стандартами этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям. От каждого из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз у всех пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей легкого (ВОЗ, 2021) и Международной гистологической классификации опухолей пищеварительной системы (ВОЗ, 2019). Описание исследованных выборок представлено в таблицах 1 и 2.

**Таблица 1** - Общая характеристика выборки пациентов с НМРЛ

Характеристика	Всего (n=100)
Возраст (лет), среднее±SD	62,5±9,5
Общая выживаемость (мес), среднее±SD	35,9±29,6
Гистология, n (%)	
• Аденокарцинома (АК)	51 (51%)
• Плоскоклеточный рак (ПКРЛ)	49 (49%)
Стадия, n (%)	
• I-II	49 (49%)
• III-IV	51 (51%)

Продолжение таблицы 1

Локализация	
• Центральная, n (%)	42 (42%)
• Периферическая, n (%)	58 (58%)
Дифференцировка, n (%)	
• G1-G2	60 (40%)
• G3	40 (40%)
N (наличие регионарных метастазов), n (%)	
• N=0	35 (33%)
• N≥1	65 (67%)
T (размер опухоли), n (%)	
• T1-T2	55 (55%)
• T3-T4	45 (45%)

Таблица 2 – Характеристика пациентов с плоскоклеточным раком пищевода

Характеристика	Всего (n=48)
Возраст (лет), среднее±SD	61,2±8,4
Общая выживаемость (мес), среднее±SD	29,8±32,9
Стадия, n (%)	
• I-II	25 (52%)
• III-IV	23 (48%)
Дифференцировка, n (%)	
• G1-G2	38 (79%)
• G3	10 (21%)
N (наличие регионарных метастазов), n (%)	
• N=0	25 (52%)
• N≥1	23 (48%)
T (размер опухоли), n (%)	
• T1-T2	9 (19%)
• T3-T4	39 (81%)

Иммуногистохимическое исследование выполнено по стандартной методике. Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 30–60 минут. Список использованных антител приведен в таблице 3.

Таблица 3 - Список использованных антител для иммуногистохимии

Антитело	Производитель	Разведение
Анти - CD204, поликлональные	HPA000272, Sigma-Aldrich, USA	1:2000
Анти - IDO1, клон D5J4E	Cell Signaling, Denvers, MA, USA	1:200
Анти - CD206, поликлональные	HPA004114, Sigma-Aldrich, USA	1:2000
Анти - CD68, клон GR021	Genemed 61-0184, CA, USA	1:100
Анти - CD163, клон 10D6	BIOCARE, CA, USA	1:100
Анти – iNOS, клон SP126	SAB5500152, Sigma-Aldrich, USA	1:150
Анти - CD8, клон C8/144B	Genemed 61-0124, CA, USA	1:100

Анти - CD3, поликлональные	Genemed 61-0011, CA, USA	1:100
Анти – FoxP3, клон D2W8E	Cell Signaling, Denvers, MA, USA	1:200
Анти - PD-L1, клон E1L3N	Cell Signaling Denvers, MA, USA	1:200
Анти - CHID1, клон PBM-3D4	PrimeBioMed, Moscow, Russia	1:100
Анти - PU.1, клон 4G6	PrimeBioMed, Moscow, Russia	1:100
Анти - PU.1, клон 9G7	Cell Signaling, Denvers, MA, USA	1:200
Анти – CD31, клон GM006	PrimeBioMed, Moscow, Russia	1:100
Анти - TNF $\alpha$ , клон M1-C4	Sigma-Aldrich, USA	1:1000
Анти – CD20, клон PBM-12F1	PrimeBioMed, Moscow, Russia	1:100

Оценку результатов окрашивания проводили с помощью микроскопа Olympus при 400x увеличении в 5 независимых полях зрения. Результаты анализа общей экспрессии маркеров макрофагов, Т-клеток и В-клеток в строме опухоли выражали с учетом количества антиген-позитивных клеток (0 - <1%; 1 - <10%; 2 - 11–50%; 3 - >50%). Экспрессию FoxP3 оценивали по среднему количеству положительно окрашенных клеток в 5 независимых полях зрения: 0 (отсутствие положительных клеток), 1 (1–5 положительных клеток), 2 (6-25 положительных клеток) и 3 (>25 положительных клеток) на одно поле зрения. Образцы с баллами 0-1 для CD206, IDO1, CD8, CD20, CD31 и FoxP3 были объединены в группу с низкой экспрессией, а образцы с баллами 2–3 были объединены в группу с высокой экспрессией данных маркеров. Для CD68, PU.1, CD163, CD204, CHID1 и CD3 образцы с баллами 0, 1 и 2 были объединены в группу с низкой экспрессией, а образцы с баллом 3 представляли группу с высокой экспрессией.

Экспрессию iNOS, IDO1 и PD-L1 оценивали также в опухолевых клетках. Окрашивание опухоли считалось положительным, когда четкое цитоплазматическое окрашивание (для iNOS и IDO1) и мембранное окрашивание для PD-L1 присутствовало в  $\geq 1\%$  опухолевых клеток. Для оценки экспрессии данных белков использовались следующие пороговые значения: 0 -  $\leq 1\%$ , 1-1-10%, 2-11-50%, 3>50% опухолевых клеток, демонстрирующих цитоплазматическое или мембранное окрашивание. Для анализа выживаемости образцы с баллами 2 и 3 были объединены в одну группу. Для анализа экспрессии TNF $\alpha$  и CHID1 в опухолевых клетках оценивали интенсивность окрашивания.

Для изучения механизмов приобретения опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагов использовали клеточные линии немелкоклеточного рака легкого H1975, H1299, H292; рака почки A498 и RenCa; моноцитарная клеточная линия THP-1.

В работе также были использованы следующие молекулярно-биологические и биохимические методы исследования: трансформация бактериальных клеток, выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток, электрофорез нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция (ПЦР), метагеномное и транскриптомное секвенирование, трансфекция

эукариотических клеток, инфицирование клеток ретровирусными векторами, анализ количества мРНК методом ОТ-ПЦР, выделение и анализ белковых фракций с помощью вестерн-блот гибридизации, анализ ферментативной активности протеиназ внеклеточного матрикса (субстрат-специфическая зимография в ПААГ), иммуноферментный анализ (ИФА), анализ динамики роста клеток, тест на образование колоний в условиях разреженной популяции (клоногенность), тест на миграцию клеток по градиенту концентраций факторов роста, оценка роста опухолей *in vivo* на лабораторных животных, а также статистическая и биоинформатическая обработка данных.

Для статистического анализа полученных данных использовалась программа GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc). Микробное разнообразие в образцах ( $\alpha$ -разнообразие) оценивали с помощью индексов Chao1, ACE, Шеннона и обратного индекса Симпсона. Микробное сходство между образцами ( $\beta$ -разнообразие) оценивали с помощью индекса Брея-Кертиса. Различия состава микробиома между образцами опухолей и условно нормальной тканью, а также между другими группами сравнения оценивали с помощью критерия Вилкоксона для парных выборок или непараметрического критерия Манна-Уитни.

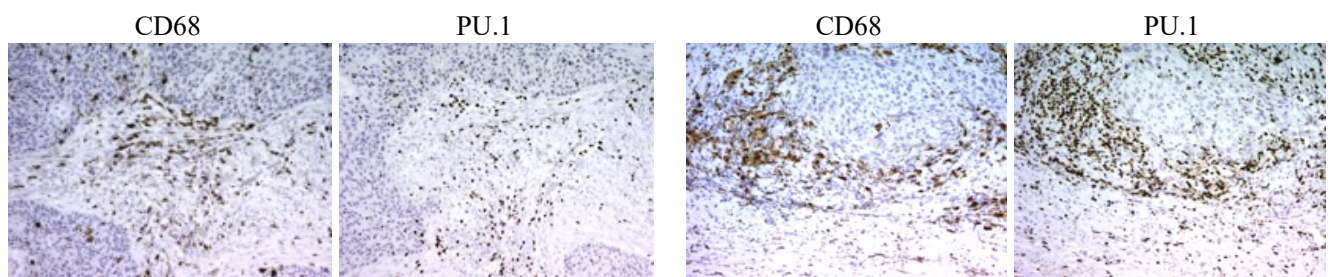
При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, коэффициент ранговой корреляции Спирмена. В случае нормального распределения для сравнения двух выборок использовался точный критерий Фишера; для трех и более выборок использовался одномерный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим использованием критерия Даннета для сравнения с контрольной выборкой. Анализ выживаемости проводился путем построения кривых дожития по методу Каплана – Майера. Сравнение достоверности различий проводили при помощи логарифмического рангового критерия. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## **Результаты исследования**

### **Анализ фенотипа клеток воспалительного инфильтрата опухолей легкого**

Проведен иммуногистохимический анализ макрофагов различных фенотипов (CD68, CD163, CD206, CD204, PU.1, iNOS, PD-L1, CHID1, IDO1), Т-клеток (CD3, CD8, FoxP3), В-клеток (CD20), эндотелиальных клеток (CD31), а также эпителиальных опухолевых клеток, экспрессирующих некоторые маркеры клеток опухолевой стромы (PD-L1, CHID1, TNF $\alpha$ , iNOS, IDO1). Известно, что среди рутинно используемых маркеров макрофагов отсутствуют такие, которые экспрессируются всеми макрофагами без исключения, поэтому выявление макрофагов смешанного фенотипа представляется достаточно трудной задачей. Кроме того, все общеизвестные макрофагальные маркеры выявляются в виде мембранной и цитоплазматической окраски, что делает достаточно затруднительным их совместное использование. В рамках данного исследования предложено использование транскрипционного фактора PU.1 в качестве маркера макрофагов. Его безусловным преимуществом является ядерная локализация, что

позволяет использовать его в двойных окрашиваниях вместе с другими маркерами макрофагов. Это особенно актуально в эпоху иммунотерапии, когда поиск новых предикторов успеха лечения представляется крайне необходимым. Здесь нужно отметить, что маркер PU.1 не является исключительно макрофагальным. Однако стоит подчеркнуть, что многие маркеры опухолевого микроокружения пересекаются (как между клетками микроокружения, так и с опухолевыми клетками), что не препятствует их использованию. PU.1 в достаточном для выявления, но меньшем количестве, помимо макрофагов, содержится также в зрелых В-клетках. Во всех остальных клетках лимфоидного и миелоидного инфильтрата опухоли PU.1 отсутствует. В-клетки в опухолях присутствуют в значительно меньших количествах по сравнению с макрофагами и имеют отличительные особенности локализации, что позволяет их дифференцировать от макрофагов. Проведено исследование, направленное на изучение возможности использования PU.1 в качестве общего макрофагального маркера. Для этого образцы опухолей светлоклеточного рака почки, рака легкого, колоректального рака, плоскоклеточного рака пищевода и рака предстательной железы были окрашены с использованием антител к CD68 и PU.1 (Рисунок 1).



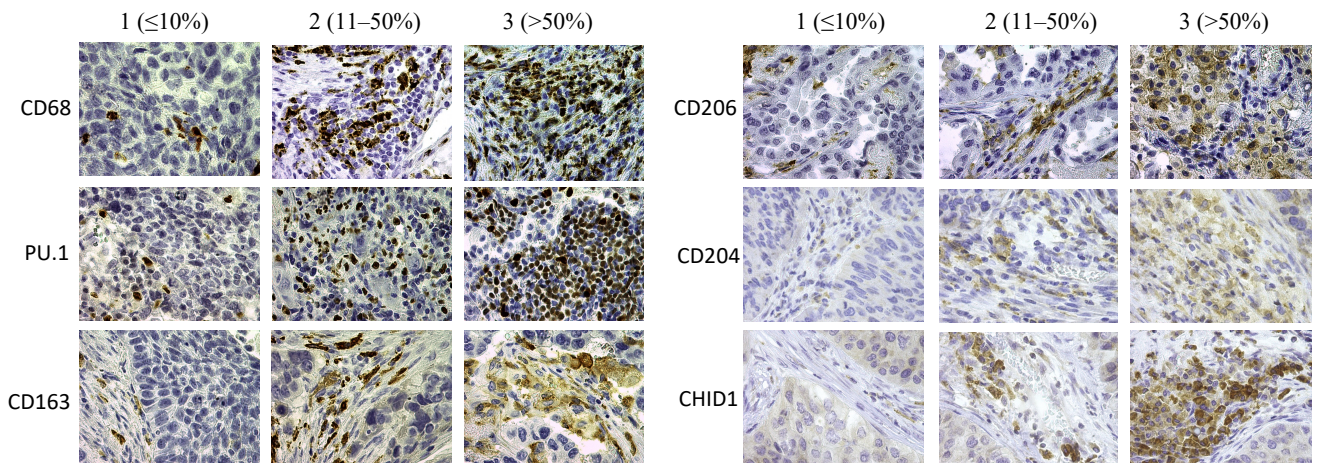
**Рисунок 1** - Пример ИГХ окрашивания опухолей плоскоклеточного рака пищевода с помощью антител к CD68 и PU.1 (100x)

Анализ корреляции содержания исследованных маркеров проводили методом вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Корреляционный анализ экспрессии маркеров CD68 и PU.1 в образцах опухолей пищевода, почки, кишки и легкого показали значимую положительную корреляцию ( $r=0,75$ ;  $p<0,0001$ ,  $r=0,74$ ;  $p<0,0001$ ,  $r=0,23$ ;  $p=0,036$ ,  $r=0,71$ ;  $p<0,0001$  соответственно). Полученные результаты позволяют заключить, что с некоторыми ограничениями PU.1 может быть использован в качестве общего макрофагального маркера в различных типах опухолей. На следующем этапе работы получены собственные моноклональные антитела к вышеописанному маркеру с использованием гибридной технологии.

Далее проведен анализ содержания макрофагов в строме опухолей легкого и ассоциации их количества с клинико-морфологическими характеристиками и прогнозом. Показано, что во всех исследованных образцах CD68+, PU.1+, CD163+, CD204+ и CHI3D1+ макрофаги



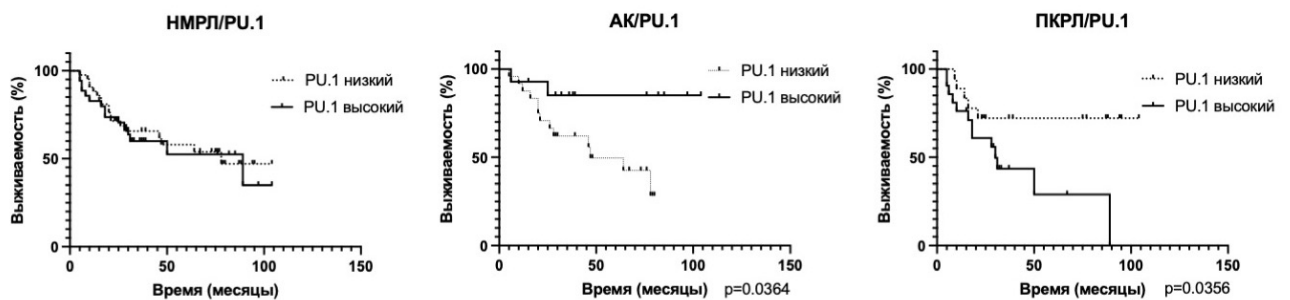
обнаруживаются в строме опухоли. В случае CD206 наличие CD206+ макрофагов наблюдали в 99% образцов (Рисунок 2).



**Рисунок 2** - Пример ИГХ окрашивания образцов НМРЛ с помощью антител к CD68, PU.1, CD163, CD206, CD204 и CHID1 (400x)

Показано отсутствие связи общего числа MAO с клинико-морфологическими характеристиками НМРЛ, за исключением CD204+, содержание которых ассоциировано с дифференцировкой опухоли, а именно, высокодифференцированные опухоли достоверно чаще содержали большее количество CD204+ клеток по сравнению с низкодифференцированными.

На следующем этапе работы проведен анализ прогностической значимости представленности макрофагов различных фенотипов в опухолях легкого. Анализ выживаемости был проведен в целом для всей исследуемой выборки, а также отдельно для каждого гистологического типа опухолей и в зависимости от стадии заболевания (Рисунок 3).



**Рисунок 3** – Прогностическая значимость PU.1 при НМРЛ

Анализ выживаемости показал, что высокое содержание CD163+ MAO является фактором неблагоприятного прогноза как для плоскоклеточной формы НМРЛ (HR=2,908; p=0,0302), так и для НМРЛ в целом (HR=1,997; p=0,0392). Большое количество CD204+ клеток, наоборот, оказалось фактором хорошего прогноза на ранних стадиях заболевания (HR=0,257; p=0,0451). Анализ CD68 и CD206 не выявил их прогностической значимости для НМРЛ. Мы установили, что в целом для НМРЛ PU.1 не является прогностическим маркером. Однако анализ с учетом гистологического типа опухоли показал, что высокое содержание PU.1+ клеток в опухоли

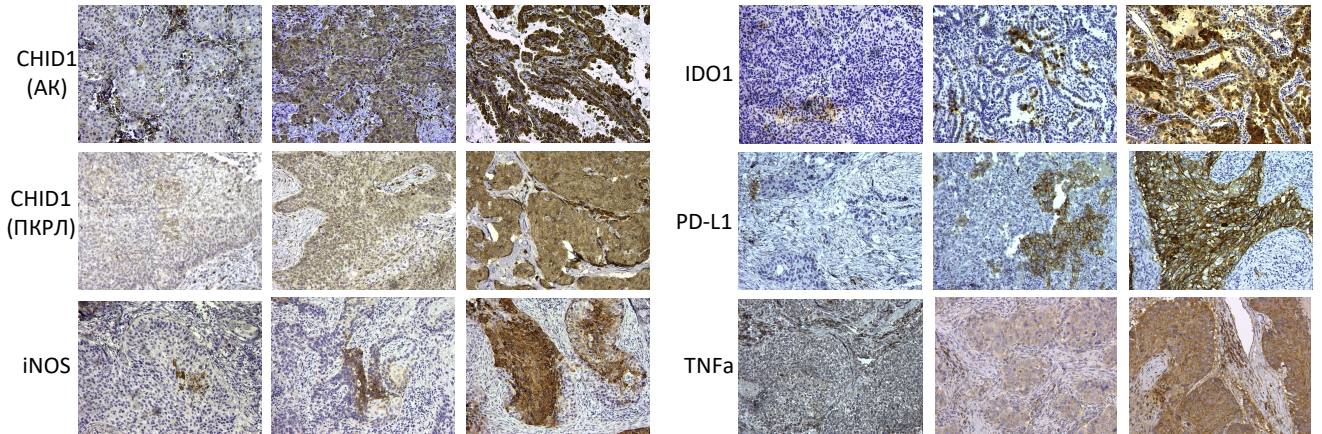
является фактором благоприятного прогноза для аденокарцином ( $HR=0,235$ ;  $p=0,0364$ ), в то время как для плоскоклеточных опухолей высокое содержание PU.1+ клеток является фактором плохого прогноза ( $HR=2,823$ ;  $p=0,0356$ ).

Далее проведен анализ макрофагов смешанного фенотипа (M1/M2) и пролиферирующих макрофагов в образцах НМРЛ. Для определения макрофагов смешанного фенотипа использовали комбинацию маркеров макрофагов M1 и M2, а именно iNOS для M1 и CD163 для M2. Для анализа пролиферирующих макрофагов использовали комбинацию маркеров CD68 и Ki-67. Макрофаги, экспрессирующие Ki-67, были выявлены в 98% образцов, в то время как макрофаги смешанного фенотипа - только в 31% случаев. Проведенный анализ показал отсутствие ассоциации количества пролиферирующих макрофагов с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Для макрофагов смешанного фенотипа также не обнаружено статистически значимых ассоциаций. Однако стоит отметить, что наблюдалась тенденция к более высокому содержанию CD163+/iNOS+ макрофагов, то есть макрофагов смешанного фенотипа, в аденокарциномах по сравнению с образцами плоскоклеточного рака легкого. Проведенный анализ показал отсутствие прогностической значимости пролиферирующих макрофагов и макрофагов смешанного фенотипа. Однако стоит отметить, что высокое их содержание имело тенденцию к неблагоприятному прогнозу заболевания.

Проведенный ранее анализ показал, что некоторые маркеры макрофагов экспрессируются непосредственно в опухолевых клетках НМРЛ. Так, iNOS (синтаза оксида азота, ответственная за продукцию NO) была обнаружена в цитоплазме опухолевых клеток в 75% образцов; IDO1 (фермент, участвующий в катаболизме триптофана, и, как следствие, в подавлении ряда функций клеток иммунной системы) экспрессировался в опухолевых клетках в 60% образцов. В то же время цитоплазматическая экспрессия CHID1 в опухолевых клетках наблюдалась во всех исследованных образцах. Также проведен анализ экспрессии PD-L1 в исследованных образцах. Экспрессия TNF $\alpha$  в опухолевых клетках, как и в случае с CHID1, наблюдалась в 100% исследованных образцов. Именно поэтому для дальнейшего статистического анализа применительно к CHID1 и TNF $\alpha$  проводили оценку интенсивности окрашивания, а не количества положительных опухолевых клеток, экспрессирующих данные маркеры. Примеры окрашивания приведены на рисунке 4.

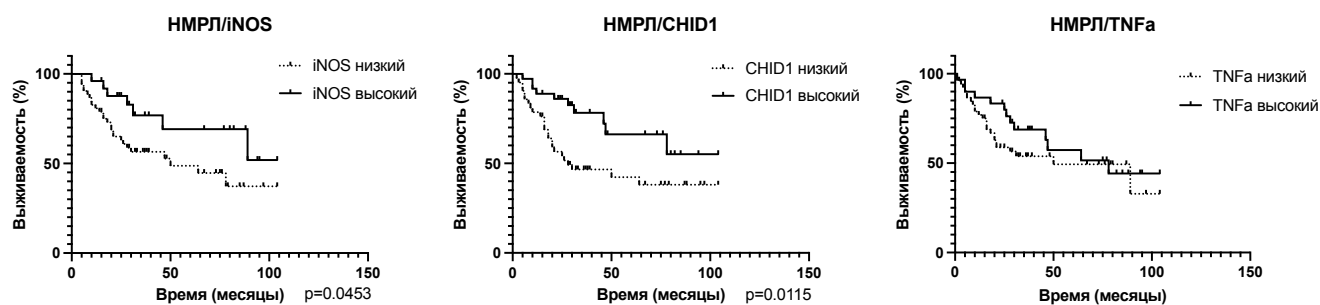
Далее был проведен анализ ассоциации экспрессии исследованных маркеров в опухолевых клетках с основными клинико-морфологическими характеристиками. Показано, что повышенная экспрессия iNOS ассоциирована с гистологическим типом опухоли и ее локализацией, а именно, в образцах плоскоклеточного рака и при центральной локализации наблюдалась повышенная экспрессия данного белка ( $p=0,0005$  и  $p=0,0128$  соответственно). Повышенная экспрессия iNOS также коррелировала с дифференцировкой опухоли, а именно, в

высокодифференцированных опухолях наблюдалась высокая экспрессия iNOS, что лишнее свидетельствует о том, что высокая дифференцировка является благоприятным прогностическим фактором НМРЛ.



**Рисунок 4** - Пример ИГХ окрашивания образцов НМРЛ с помощью антител к CHID1, iNOS, IDO1, PD-L1 и TNFα (100x)

Анализ экспрессии CHID1 в опухолевых клетках показал значимую ассоциацию между уровнем экспрессии и гистологическим типом опухоли, а также ее локализацией (более высокая экспрессия характерна для аденокарцином и опухолей периферической локализации). Для остальных исследованных маркеров ассоциации с клиническими характеристиками выявлено не было. Анализ прогностической значимости (Рисунок 5) показал, что высокая экспрессия iNOS является маркером благоприятного прогноза как для плоскоклеточного варианта опухоли (HR=0,394; p=0,0456), так и для НМРЛ в целом (HR=0,441; p=0,0453). Также необходимо отметить прогностическую значимость iNOS в зависимости от стадии заболевания. Для ранних стадий экспрессия iNOS не является прогностическим фактором, в то время как для поздних стадий высокая экспрессия iNOS является благоприятным прогностическим фактором (HR=0,0361; p=0,0361). Кроме того, впервые показано, что экспрессия CHID1 в опухолевых клетках является фактором благоприятного прогноза как для аденокарцином легкого (HR=0,319; p=0,0127), так для опухолей НМРЛ в целом (HR=0,402; p=0,0115). Необходимо отметить, что CHID1 является фактором благоприятного прогноза на ранних стадиях заболевания (HR=0,211; p=0,0264). Дальнейший анализ прогностической значимости экспрессии исследуемых маркеров выявил, что высокий уровень экспрессии IDO1 опухолевыми клетками является фактором неблагоприятного прогноза при плоскоклеточном раке легкого (HR=2,405; p=0,0467), что соответствует его иммуносупрессорным характеристикам. Также необходимо отметить, что высокий уровень экспрессии TNFα опухолевыми клетками является благоприятным прогностическим фактором для плоскоклеточного рака легкого (HR=0,342; p=0,0290), но не аденокарцином.



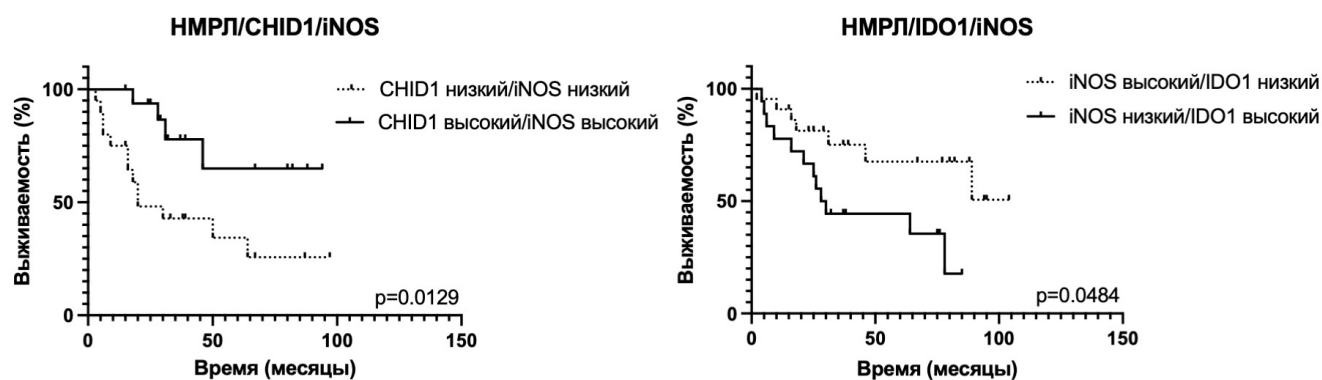
**Рисунок 5** – Прогностическая значимость CHID1, iNOS и TNFα при HNPCL

Помимо макрофагов, важную роль в микроокружении опухоли играют и клетки приобретенного иммунитета. На следующем этапе работы проведен анализ содержания различных типов Т-клеток (цитотоксических и регуляторных), а также В-клеток, которым в последнее время начинают уделять внимание в контексте солидных опухолей. Для выявления Т-клеток были использованы маркеры CD3, CD8 и FoxP3. Для выявления В-клеток использовали маркер CD20. CD3<sup>+</sup> Т-клетки были выявлены в строме опухолей всех исследованных образцов, CD8<sup>+</sup> Т-клетки - в 98% исследованных образцов. FoxP3<sup>+</sup> Т-клетки были выявлены в 76% исследованных случаях, в то время как CD20<sup>+</sup> клетки в 95% случаев.

Далее проведен анализ ассоциации содержания Т-клеток и В-клеток с клинико-морфологическими характеристиками опухолей. Выявлено, что повышенное содержание как Т-клеток в целом (CD3<sup>+</sup>), так и цитотоксических Т-клеток (CD8<sup>+</sup>), характерно для ранних стадий заболевания ( $p=0,0347$  и  $p=0,0343$  соответственно) и меньших размеров опухолей ( $p=0,0179$  и  $p=0,0184$  соответственно). Также показано, что содержание FoxP3<sup>+</sup> клеток в строме опухолей значительно выше в образцах плоскоклеточного рака по сравнению с аденокарциномами. Показано, что большое количество CD8 положительных клеток на ранних стадиях заболевания может являться неблагоприятным прогностическим маркером (HR=3,152;  $p=0,0262$ ), в то время как на поздних стадиях такой закономерности не отмечено. Для экспрессии CD20 в строме опухоли наблюдалась ассоциация с локализацией опухоли ( $p=0,0435$ ), со стадией заболевания ( $p=0,0044$ ), размером опухоли ( $p=0,0017$ ) и наличием регионарных метастазов ( $p=0,0071$ ). А именно, на более ранних стадиях, при меньшем размере опухоли и при отсутствии метастазов в лимфоузлах наблюдалось более высокое содержание CD20<sup>+</sup> В-клеток в опухолевой строме. Проведенный анализ выявил отсутствие прогностической значимости содержания CD20<sup>+</sup> клеток в опухолях HNPCL.

Проведенный анализ показал, что многие маркеры как опухолевых, так и стромальных клеток могут являться прогностическими маркерами заболевания. Однако с накоплением большого количества данных становится понятно, что такой анализ достаточно противоречив и сильно зависит от многих характеристик, начиная от размера выборки и заканчивая популяционными особенностями изучаемой группы пациентов. В связи с этим кажется

логичным, что комплексный анализ нескольких маркеров определенной опухоли сможет повысить эффективность прогнозирования течения и исхода заболевания, а также в перспективе предсказать ответ на планируемую терапию. На следующем этапе работы проведен комплексный анализ прогностической значимости комбинаций некоторых маркеров (Рисунок 6).



**Рисунок 6** – Прогностическая значимость комплексного анализа маркеров опухолевой стромы на примере сочетаний iNOS/CHID1 и iNOS/IDO1

Проведенный анализ показал, что прогностическая значимость анализа комбинации CHID1/iNOS имеет более высокую информативность по сравнению с каждым маркером в отдельности (HR=0,2699; p=0,0129). Важно отметить, что общая выживаемость пациентов из группы с низкой экспрессией CHID1/iNOS составила 20 месяцев, в то время как общая выживаемость в группе с низкой экспрессией только CHID1 составила 28 месяцев, а в группе с низкой экспрессией только iNOS - 50 месяцев. Комбинации маркеров iNOS/IDO1 также является прогностически интересной. Если в группе с низкой экспрессией только iNOS медиана выживаемости пациентов составляет 50 месяцев, то при низком содержании iNOS в сочетании с высокой экспрессии IDO1 медиана выживаемости снижается до 29 месяцев. Таким образом, комплексный анализ позволяет более точно прогнозировать исход заболевания, что может способствовать выбору более актуальной терапии.

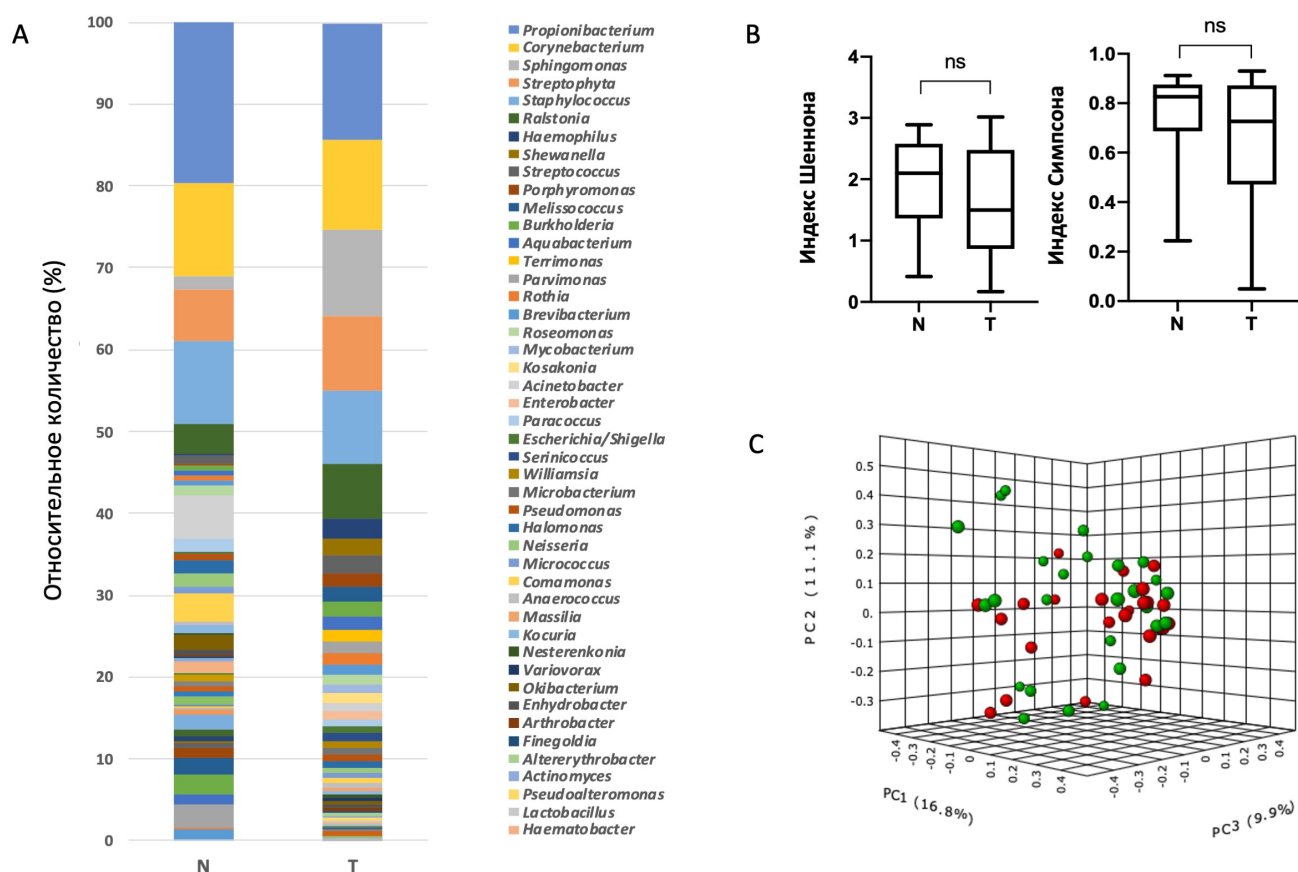
### **Таксономический состав микробиома опухолей НМРЛ**

После проведения анализа фенотипа стромы опухолей НМРЛ, следующим этапом данного исследования было изучение таксономического состава микробиома опухолей легкого и условно нормальной ткани легкого методом метагеномного секвенирования.

Для анализа состава микробного сообщества было проведено секвенирование гена 16S рРНК в 26 парных образцах НМРЛ. В состав выборки для проведения секвенирования входило 14 образцов аденокарцином и 12 образцов плоскоклеточного рака легкого.

Анализ таксономического состава микробного сообщества тканей легкого выявил наличие 10 типов и 280 родов микроорганизмов. В дальнейшем анализе учитывались роды бактерий, относительное содержание которых превышало 0,1%. Таких доминирующих родов

насчитывалось 70. Преобладающими типами микроорганизмов, встречающихся как в опухолях, так и в образцах условно нормальной ткани, являлись *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Значительных отличий в качественном составе микроорганизмов на данном уровне (на уровне типов) не выявлено. Далее был проведен анализ относительного количества бактерий различных родов в опухолевой и нормальной ткани легкого. Результаты представлены на рисунке 7.



**Рисунок 7** - Таксономический состав опухолей легкого и условно нормальной ткани на уровне родов. Относительное количество родов микроорганизмов в нормальной и опухолевой ткани легкого (А). Анализ  $\alpha$ -разнообразия (индексы Шеннона и Симпсона) в опухолях легкого и условно нормальной ткани на уровне родов (В). Анализ  $\beta$ -разнообразия опухолях легкого и условно нормальной ткани на уровне родов [PERMANOVA] F-value: 1,2264; R-squared: 0,024913; p-value <0,204 (С)

Для оценки микробиологического разнообразия биологических сообществ применяют методы вычислительной экологии, а именно, оценку  $\alpha$ - и  $\beta$ -разнообразия. Эти характеристики являются численными показателями (индексами), характеризующими разнообразие одиночного микробного сообщества или различия между двумя сообществами, которые учитывают число выявленных в сообществе таксонов и число особей в различных таксонах. Для оценки  $\alpha$ -разнообразия использовали несколько методов анализа, а именно, определение индексов

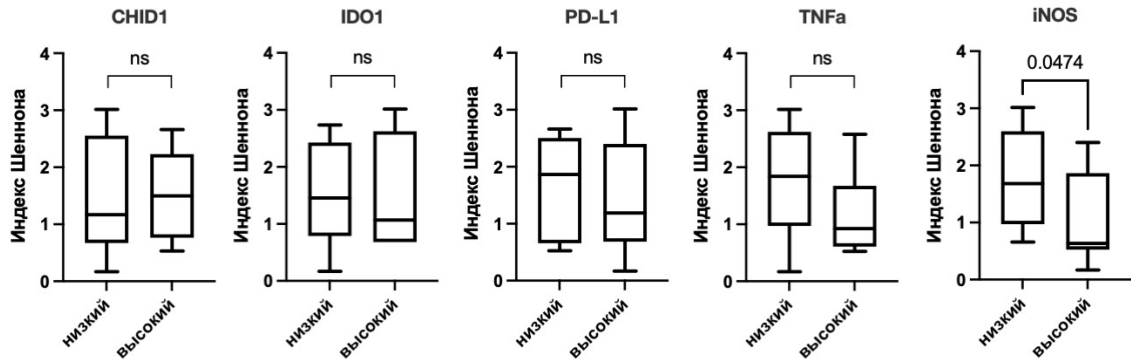
Шеннона и Симпсона. Индекс Шеннона характеризует разнообразие и выравненность в структуре сообщества. Индекс Симпсона показывает степень выраженности доминирования определенных видов в структуре сообщества. Таким образом, индекс Шеннона более чувствителен к изменениям в содержании редких видов, в то время как индекс Симпсона более чувствителен к изменению обилия самых массовых видов. Проведенное исследование показало отсутствие таксономического разнообразия между опухолевой и нормальной тканью, однако выявило значимое снижение в опухоли по сравнению с условно нормальной тканью относительного количества бактерий 3 родов: *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium*.

Далее проведен таксономический состав микробного сообщества на уровне родов, выявленных в опухолях легкого различных гистологических типов, стадий и степени дифференцировки. Проведенный анализ относительного количества преобладающих родов микроорганизмов в группах аденокарцином и плоскоклеточного рака отличий не выявил.  $\alpha$ -разнообразие микробных сообществ опухолей с различной гистологией на уровне бактериальных родов не различалось. Однако интересно отметить, что в группе аденокарцином наблюдается достоверное ( $p = 0,0419$ ) преобладание грамположительных бактерий. Для группы плоскоклеточного рака подобное различие не выявлено. Относительная численность грамположительных и грамотрицательных бактерий между группами аденокарцином и плоскоклеточного рака также не отличалась. Таксономический анализ состава опухолей НМРЛ различных стадий показал значимые отличия между 11 родами бактерий: *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aquabacterium*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Halomonas*, *Parvimonas*, *Rothia*, *Kocuria*. Необходимо отметить, что относительное количество родов *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aquabacterium* снижается со стадией заболевания, в то время как относительное количество родов *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Halomonas*, *Parvimonas*, *Rothia*, *Kocuria* повышается при прогрессии заболевания. Анализ таксономического состава микробиома опухолей различной степени дифференцировки выявил отличия в 4 родах. Интересно отметить, что относительное содержание бактерий рода *Staphylococcus* было выше в низкодифференцированных опухолях по сравнению с высокодифференцированными. В целом мы не обнаружили разницы между  $\alpha$ - и  $\beta$ -разнообразием в группах опухолей различных стадий и дифференцировки. Однако в процессе развития заболевания на поздних стадиях и в опухолях с более низкой дифференцировкой мы видим тенденцию к повышению индексов разнообразия ( $p=0,059$  и  $p=0,075$  соответственно).

#### **Комплексный анализ микробиологической и иммунологической составляющих опухолевой стромы в прогрессии опухолей легкого**

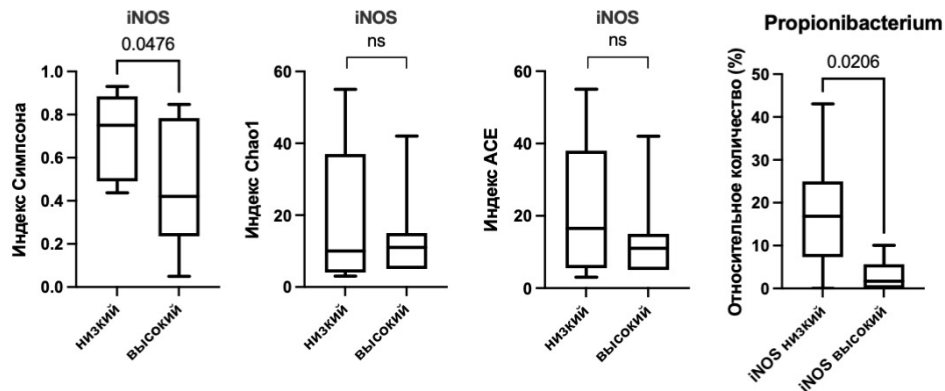
Далее проведен анализ ассоциации  $\alpha$ -разнообразия бактериального сообщества с фенотипом воспалительного инфильтрата опухоли. Данный показатель значимо не отличался

практически во всех исследованных группах, за исключением групп с различной экспрессией iNOS. Для данной группы мы наблюдали значимое отличие индексов Шеннона и Симпсона, а именно, в группе, характеризующейся более высокой экспрессией iNOS, наблюдалось снижение данных показателей (Рисунок 8).



**Рисунок 8** - Анализ  $\alpha$ -разнообразия на уровне родов в соответствии с экспрессией CHID1, IDO1, PD-L1, TNF $\alpha$  и iNOS опухолевыми клетками НМРЛ

Так, индексы Шеннона и Симпсона учитывают две характеристики сообществ, а именно, число таксонов и их выравненность между собой; для групп с разным уровнем экспрессии iNOS вычислили дополнительные показатели, такие как индексы Chao1 и ACE, которые характеризуют только видовое разнообразие образцов (Рисунок 9).



**Рисунок 9** - Анализ  $\alpha$ -разнообразия в группах с различной экспрессией iNOS

Показано, что исследуемые группы не отличаются по данным показателям, что свидетельствует о том, что отличия в индексах Шеннона и Симпсона обусловлены лишь относительными количественными изменениями отдельных представителей микробиома легкого. Оказалось, что увеличение индексов Шеннона и Симпсона в группе с низким уровнем экспрессии iNOS сопровождалось увеличением относительной численности единственного рода *Propionibacterium*.

Далее проведен количественный анализ бактерий в опухолевой ткани по сравнению с условно нормальной тканью легкого методом ПЦР в реальном времени. Мы показали, что общая бактериальная нагрузка в условно нормальной ткани легкого выше, чем в опухоли ( $p = 0,0325^*$ ).



В результате проведенного анализа значимых изменений количества бактерий в зависимости от клинических характеристик выявлено не было, что вероятно свидетельствует о том, что ключевым моментом изменения количества резидентного микробиома является возникновение опухоли, а не ее последующая прогрессия.

Далее проведен анализ общей бактериальной нагрузки в образцах в зависимости от фенотипа опухолевой стромы. Показано значимое различие в общей бактериальной нагрузке между образцами с различным уровнем экспрессии iNOS и FoxP3 ( $p=0,0372$  и  $p=0,0060$  соответственно). В группах образцов, характеризующихся высокой экспрессией данных стромальных маркеров, наблюдалось более высокая бактериальная нагрузка.

**Таблица 4** – Корреляционный анализ общей бактериальной нагрузки и фенотипа клеток опухолевой стромы НМРЛ

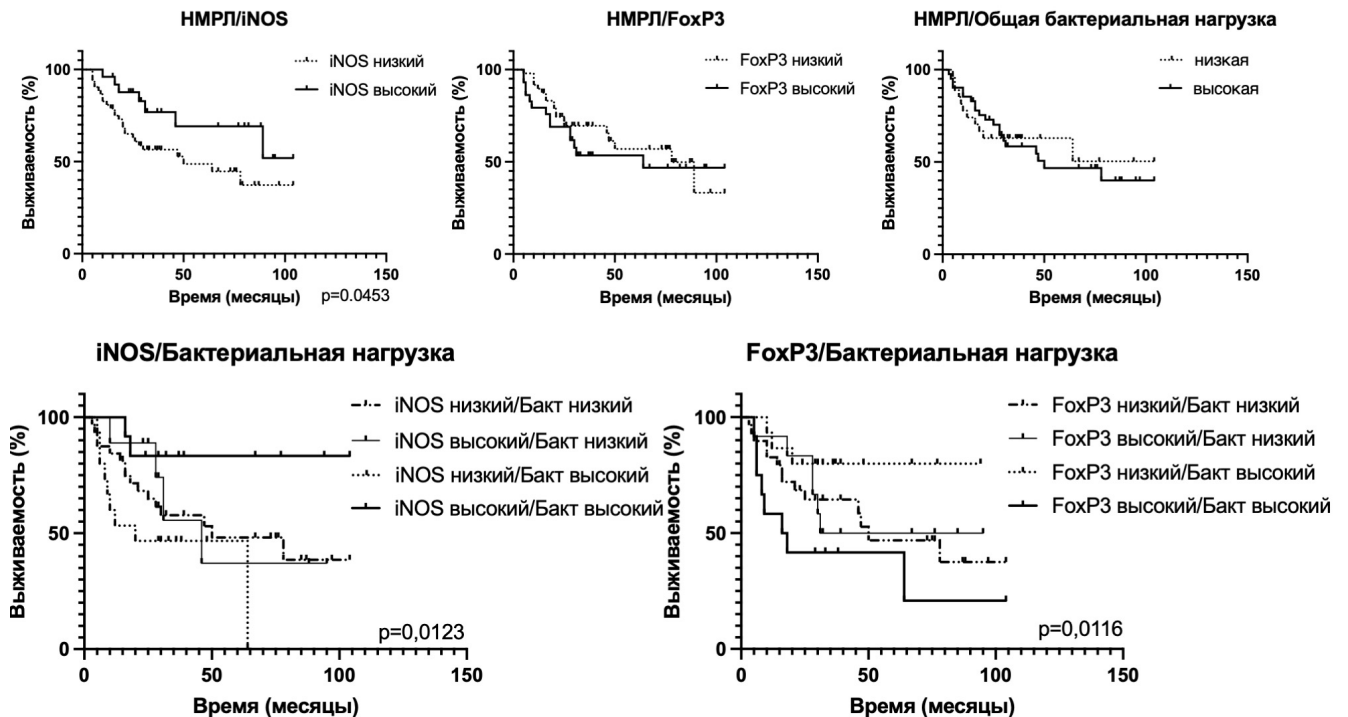
	Бактериальная нагрузка vs. CD68	Бактериальная нагрузка vs. CD163	Бактериальная нагрузка vs. CD206	Бактериальная нагрузка vs. CD204	Бактериальная нагрузка vs. PU1
<b>Spearman r</b>					
r	0,08256	0,1745	0,1085	0,05196	0,08995
95% ДИ	от -0,1366 до 0,2940	от -0,0438 до 0,377	от -0,1107 до 0,3178	от -0,1666 до 0,2657	от -0,1292 до 0,3008
<b>P значение</b>	0,4471	0,1059	0,3169	0,6327	0,4073

	Бактериальная нагрузка vs. PD-L1	Бактериальная нагрузка vs. iNOS	Бактериальная нагрузка vs. CD3	Бактериальная нагрузка vs. CD8	Бактериальная нагрузка vs. FoxP3
<b>Spearman r</b>					
r	-0,05306	-0,2238	0,008445	0,1443	-0,2922
95% ДИ	от -0,2667 до 0,1655	от -0,4201 до -0,007439	от -0,2086 до 0,2247	от -0,07468 до 0,3501	от -0,4786 до -0,08063
<b>P значение</b>	0,6255	<b>0,0372*</b>	0,9381	0,1823	<b>0,0060*</b>

Проведен комплексный анализ выживаемости пациентов с НМРЛ с учетом совместного вклада уровня экспрессии iNOS и FoxP3 (маркеры, для которых показана значимая ассоциация с общей бактериальной нагрузкой), а также общей бактериальной нагрузкой. Результаты представлены на рисунке 10.

Показано, что повышенная экспрессия iNOS опухолевыми клетками является благоприятным прогностическим фактором ( $p=0,0453$ ). Общая бактериальная нагрузка, как и уровень количества FoxP3 положительных клеток в опухоли, не являются прогностическими маркерами и не влияют на общую выживаемость пациентов. Комплексный анализ показал, что высокая экспрессия iNOS в совокупности с повышенной бактериальной нагрузкой является

маркером хорошего прогноза по сравнению с группой пациентов с высокой бактериальной нагрузкой и низкой экспрессией iNOS (HR=0,1824; p=0,0123).



**Рисунок 10** - Общая выживаемость пациентов с НМРЛ в зависимости от экспрессии iNOS и FoxP3 и общей бактериальной нагрузки

Интересно отметить, что в группе случаев с низкой бактериальной нагрузкой уровень экспрессии iNOS не является прогностически значимым. Также впервые показано, что высокая бактериальная нагрузка опухоли с иммуносупрессией (большим количеством FoxP3+ клеток) является маркером плохого прогноза при НМРЛ по сравнению с группой с высоким содержанием бактерий и низким содержанием FoxP3 (HR=4,651; p=0,0116). Также, как и в случае с iNOS, FoxP3 является прогностическим маркером только для группы пациентов с высокой бактериальной нагрузкой.

Таким образом, в данной части исследования описаны два новых прогностических маркера НМРЛ и подтверждена значимость некоторых других. Впервые показано, что CHID1, традиционно считающийся маркером M2 макрофагов, экспрессируется опухолевыми клетками легкого, причем его экспрессия сильно зависит от гистологического типа опухоли. Также впервые показано, что экспрессия CHID1 в опухолевых клетках является фактором хорошего прогноза как для аденокарцином легкого (HR=0,3196; p=0,0127), так для НМРЛ в целом (HR=0,4019; p=0,0115). Также необходимо отметить, что CHID1 является фактором благоприятного прогноза на ранних стадиях заболевания (HR=0,2011; p=0,0264).

Еще одним новым прогностическим маркером для НМРЛ оказался транскрипционный фактор PU.1. Показано, что в целом для опухолей НМРЛ PU.1 не является прогностическим

маркером. Однако анализ с учетом гистологического типа опухоли показал, что низкое количество PU.1+ клеток в опухоли является фактором плохого прогноза для аденокарцином (HR=4,250; p=0,0364), в то время как для плоскоклеточных опухолей данное обстоятельство является фактором хорошего прогноза (HR=0,3542; p=0,0356). Также показано, что высокая экспрессия iNOS и низкая экспрессии IDO1 являются хорошими прогностическими маркерами НМРЛ.

Далее мы впервые провели анализ общей бактериальной нагрузки опухолей совместно с фенотипом опухолевой стромы. Общая бактериальная нагрузка, как и уровень количества FoxP3 положительных клеток в опухоли, не являются прогностическими маркерами и не влияют на общую выживаемость пациентов. Проведен анализ выживаемости в зависимости от экспрессии исследуемых маркеров совместно с общей бактериальной нагрузкой. Впервые показано, что высокая экспрессия iNOS в совокупности с повышенной бактериальной нагрузкой является маркером хорошего прогноза по сравнению с группой пациентов с высокой бактериальной нагрузкой и низкой экспрессией iNOS (HR 0,1824; p=0,0123). Также впервые показано, что высокая бактериальная нагрузка опухоли с иммуносупрессией (большим количеством FoxP3+ клеток) является маркером плохого прогноза при НМРЛ по сравнению с группой с высоким содержанием бактерий и низким содержанием FoxP3 (HR 4,651; p=0,0116).

Таким образом, впервые показано, что общая бактериальная нагрузка опухоли может иметь противоположное прогностическое значение в зависимости от состояния местного противоопухолевого иммунитета.

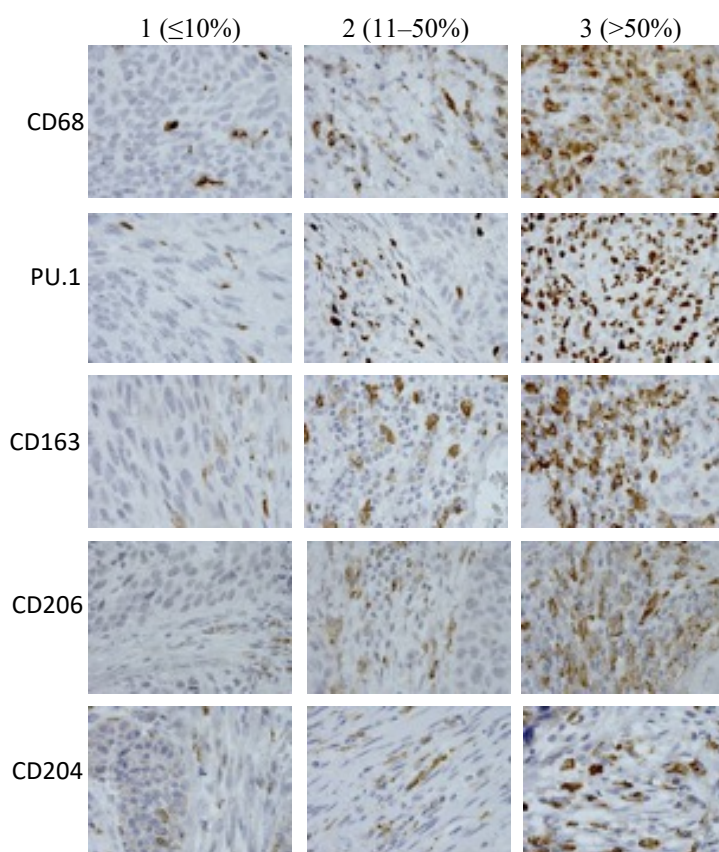
#### **Анализ фенотипа иммунокомпетентных клеток стромы опухолей пищевода**

Известно, что строма опухолей органов ЖКТ зачастую отличается по фенотипическим характеристикам от большинства других солидных опухолей. Прогностическая значимость многих маркеров большинства солидных опухолей для органов ЖКТ противоречива. Возможно, это обусловлено огромной микробиологической нагрузкой данных органов. Именно поэтому в качестве второй локализации для проведения исследования взаимодействия микробиологической и иммунологической составляющих опухолевой стромы был выбран плоскоклеточный рак пищевода.

В качестве общих маркеров макрофагов использовали CD68 и PU.1. CD163, CD206 и CD204 использовали в качестве маркеров макрофагов M2, а iNOS и IDO1 предполагалось использовать как маркеры M1. CD68+, PU.1+, CD163+, CD206+ и CD204+ клетки обнаружены в подавляющем большинстве случаев плоскоклеточного рака пищевода (Рисунок 11).

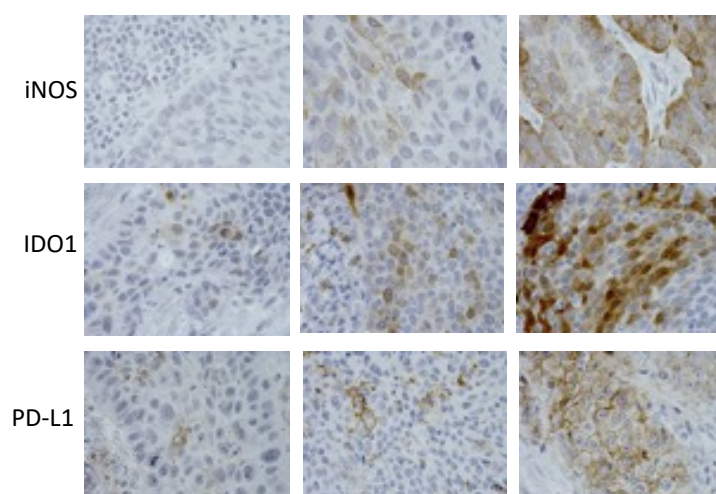
Проведенный анализ показал отсутствие ассоциации содержания макрофагов различного фенотипа с клинико-морфологическими характеристиками. Однако количество CD163+ и

CD204+ макрофагов является прогностическим значимым фактором. А именно, большее их содержание ассоциировано с благоприятным прогнозом заболевания.



**Рисунок 11** - Пример ИГХ окрашивания образцов плоскоклеточного рака пищевода с помощью антител к CD68, PU.1, CD163, CD206 и CD204 (400x)

Показано, что ряд маркеров макрофагов экспрессируется также непосредственно в опухолевых клетках пищевода (Рисунок 12).



**Рисунок 12** - Пример ИГХ окрашивания образцов плоскоклеточного рака пищевода с помощью антител к iNOS, IDO1 и PD-L1 (400x)

Так iNOS экспрессируется в опухолевых клетках в 25% образцов (12 из 48), однако в 5 образцах его экспрессия наблюдалась меньше чем в 1%. Также показано, что проанализированные образцы не содержат iNOS+ M1 макрофагов. Таким образом, экспрессия iNOS наблюдается в небольшом количестве образцов и исключительно в опухолевых клетках. В исследуемой выборке в 75% образцов выявлена экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках. IDO1 в опухолевых клетках был обнаружен в 44% исследованных опухолей. Проведенный анализ не выявил ассоциации экспрессии исследованных белков с клиническими характеристиками и прогнозом.

Далее проведен анализ содержания Т-клеток в опухолях плоскоклеточного рака пищевода. В большинстве исследованных образцов присутствовало достаточно большое количество CD3+ положительных клеток (в 98% образцов были обнаружены CD3+ клетки). CD8+ клетки обнаруживались в 96% образцов. Стоит отметить, что FoxP3 является благоприятным прогностическим маркером плоскоклеточного рака пищевода (HR=0,0442; p=0,0325). Ассоциации содержания Т-клеток с клиническими характеристиками заболевания не выявлено.

#### **Таксономический состав микробиома опухолей плоскоклеточного рака пищевода**

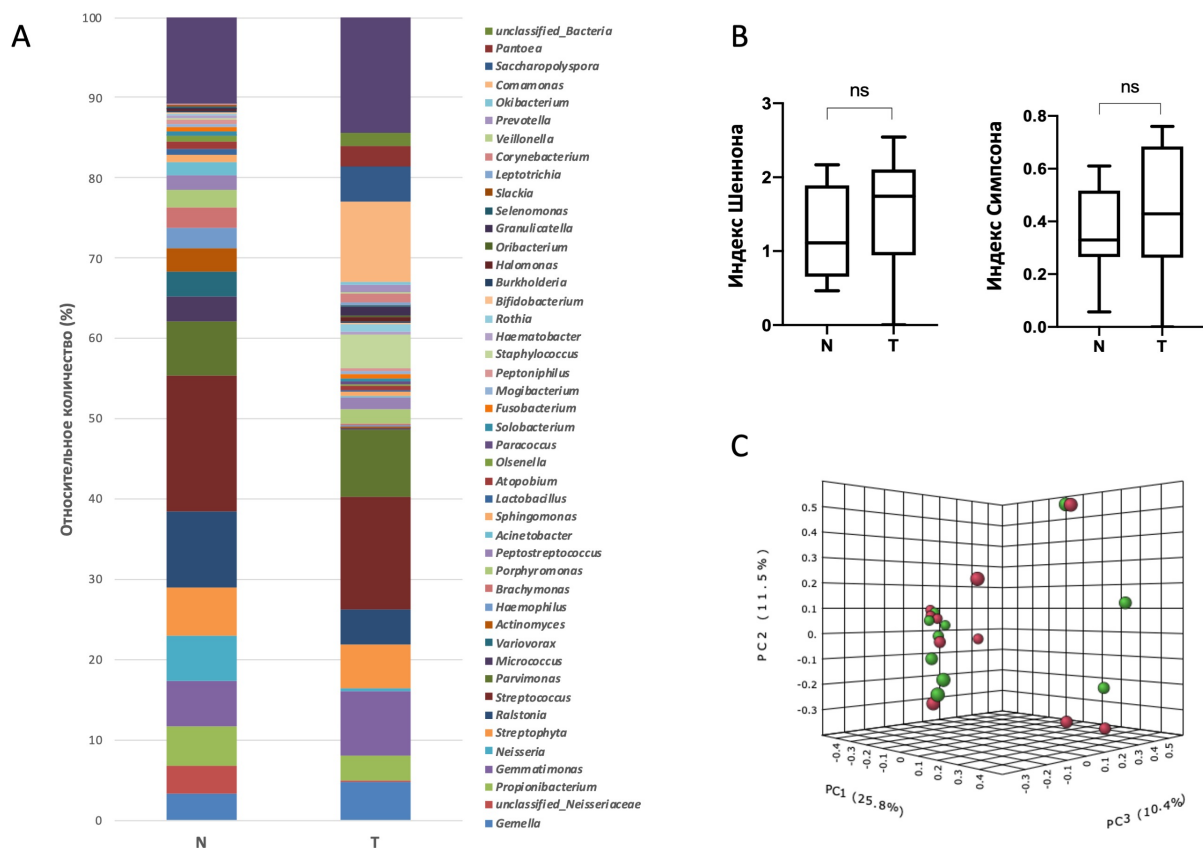
Анализ таксономического состава микробного сообщества тканей пищевода выявил наличие 7 доминирующих типов, 164 родов и 393 видов. Для дальнейшего анализа учитывались роды бактерий, относительное содержание которых составило более 0,1%. Таких доминирующих родов насчитывалось 71 в нормальной ткани и 106 - в опухолевой.

Преобладающими типами микроорганизмов, встречающихся как в опухолях, так и в образцах условно нормальной ткани, являлись *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonas* и *Bacteroidetes*. Значительных отличий в микроорганизмах, встречающихся в образцах, на уровне типов не выявлено. Показано отсутствие таксономического разнообразия между опухолевой и нормальной тканью (индексы Шеннона и Симпсона). Далее проведен таксономический состав микробного сообщества на уровне родов (Рисунок 13).

Самыми представленными родами микроорганизмов, обнаруженными в опухолевой и нормальной ткани пищевода, являлись роды *Streptococcus*, *Parvimonas*, *Gemmatimonas*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*. Анализ  $\alpha$ -разнообразия (индексы Шеннона и Симпсона) и анализ  $\beta$ -разнообразия на уровне родов отличий не выявил.

Отличий в относительном содержании различных родов бактерий между нормальной и опухолевой тканью выявлено не было, за исключением рода *Staphylococcus*. Относительное содержание бактерий рода *Staphylococcus* в опухолевой ткани было выше по сравнению с условной нормой. Так как бактерии рода *Staphylococcus* оказались единственным родом, отличающимся по своему содержанию в группах опухолевой и нормальной ткани, далее данная

группа была проанализирована на уровне видов. По результатам анализа оказалось, что в исследованных образцах присутствуют 2 вида бактерий данного рода, а именно, *Staphylococcus pasteurii* и *Staphylococcus warneri*.



**Рисунок 13** - Таксономический состав опухолей пищевода и условно нормальной ткани на уровне родов. Относительное количество родов микроорганизмов в нормальной и опухолевой ткани пищевода (А). Анализ  $\alpha$ -разнообразия (индексы Шеннона и Симпсона) в опухолях пищевода и условно нормальной ткани на уровне родов (В). Анализ  $\beta$ -разнообразия опухолях пищевода и условно нормальной ткани на уровне родов [PERMANOVA] F-value: 0,50161; R-squared: 0,027111; p-value < 0,974 (С)

### Комплексный анализ микробиологической и иммунологической составляющих опухолевой стромы в прогрессии опухолей пищевода

Проведен анализ  $\alpha$ -разнообразия микробиома пищевода в зависимости от фенотипа опухолевой стромы. Показано, что в группах с высоким и низким содержанием макрофагов (как M1, так и M2) отличий  $\alpha$ -разнообразия микробиома не наблюдается. При анализе воспалительного инфильтрата со стороны Т-клеток показано, что группы с высоким и низким содержанием цитотоксических Т-клеток отличаются по своему  $\alpha$ -разнообразию, а именно, в группе с большим содержанием CD8<sup>+</sup> клеток наблюдается значимое снижение индекса разнообразия.

Наличие CD8 в опухолях обратно коррелирует с содержанием бактерий рода *Staphylococcus* ( $r = -0,784$ ;  $p = 0,011$ ). Относительное количество бактерий данного рода значительно снижается в группе опухолей с высоким содержанием CD8. Возможно, это влечет за собой изменение индекса Шеннона, так как снижение данного индекса свидетельствует о снижении разнообразия и увеличении доминирования определенных родов. Для подтверждения увеличения доминирования отдельных родов мы определили также индекс Симпсона, который также был значительно снижен в группе опухолей с высокой инфильтрацией CD8+ клеток.

Далее проведен количественный анализ общей бактериальной нагрузки в опухолях в зависимости от фенотипа клеток стромы опухолей пищевода (Таблица 5).

**Таблица 5** - Корреляционный анализ общей бактериальной нагрузки и фенотипа клеток опухолевой стромы ПРП

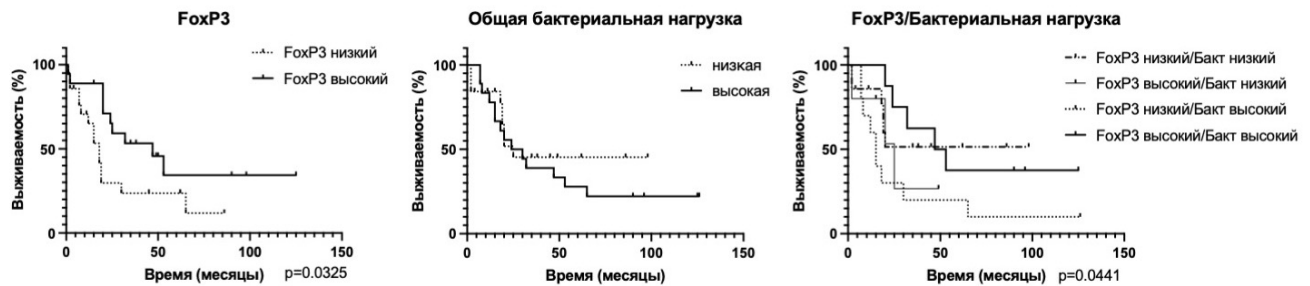
	Бактериальная нагрузка vs. CD68	Бактериальная нагрузка vs. CD163	Бактериальная нагрузка vs. CD206	Бактериальная нагрузка vs. CD204	Бактериальная нагрузка vs. PU1
<b>Spearman r</b>					
r	-0,08035	0,003585	-0,3976	-0,1854	-0,1761
95% ДИ	от -0.3668 до 0.220	от -0.2919 до 0.2984	от -0.6200 до -0.1161	от -0.4556 до 0.1162	от -0.4480 до 0.1256
<b>P значение</b>	0,5914	0,9809	<b>0,0056*</b>	0,2123	0,2365

	Бактериальная нагрузка vs. PD-L1	Бактериальная нагрузка vs. iNOS	Бактериальная нагрузка vs. CD3	Бактериальная нагрузка vs. CD8	Бактериальная нагрузка vs. FoxP3
<b>Spearman r</b>					
r	0,2535	-0,2953	0,07555	0,09317	-0,08894
95% ДИ	от -0.04507 до 0.5104	от -0.5431 до -0.0001028	от -0.2246 до 0.3626	от -0.2077 до 0.3779	от -0.3743 до 0.2118
<b>P значение</b>	0,0856	<b>0,0439*</b>	0,6138	0,5334	0,5522

Ассоциация между уровнем бактериальной нагрузки и фенотипом опухолевой стромы наблюдается для CD206 и iNOS. А именно, группа опухолей, характеризующаяся большим содержанием CD206 в строме и iNOS в опухоли, характеризуется большей бактериальной нагрузкой в целом. Далее показано, что в группе с большим содержанием CD206 макрофагов наблюдается преобладание грамположительных бактерий над грамотрицательными. Для iNOS наблюдается противоположная картина. А именно, в группе опухолей с низкой экспрессией iNOS наблюдается преобладание грамположительных бактерий над грамотрицательными. Родовой анализ показал обратную корреляцию между содержанием CD206+ клеток и грамотрицательных

бактерий родов *Burkholderia* и *Gemmatimonas* ( $r=-0,742$ ,  $p=0,033$ ;  $r=-0,742$ ,  $p=0,033$  соответственно), а также прямую корреляцию между содержанием CD206+ клеток и грамотрицательных бактерий рода *Sphingomonas* ( $r=-0,778$ ;  $p=0,013$ ).

Далее проведен анализ выживаемости пациентов в зависимости от общей бактериальной нагрузки в опухолях, содержания грамположительных и грамотрицательных бактерий и стромальных маркеров. Как видно из представленных графиков, общая бактериальная нагрузка не является прогностически значимым параметром для плоскоклеточного рака пищевода (Рисунок 14).



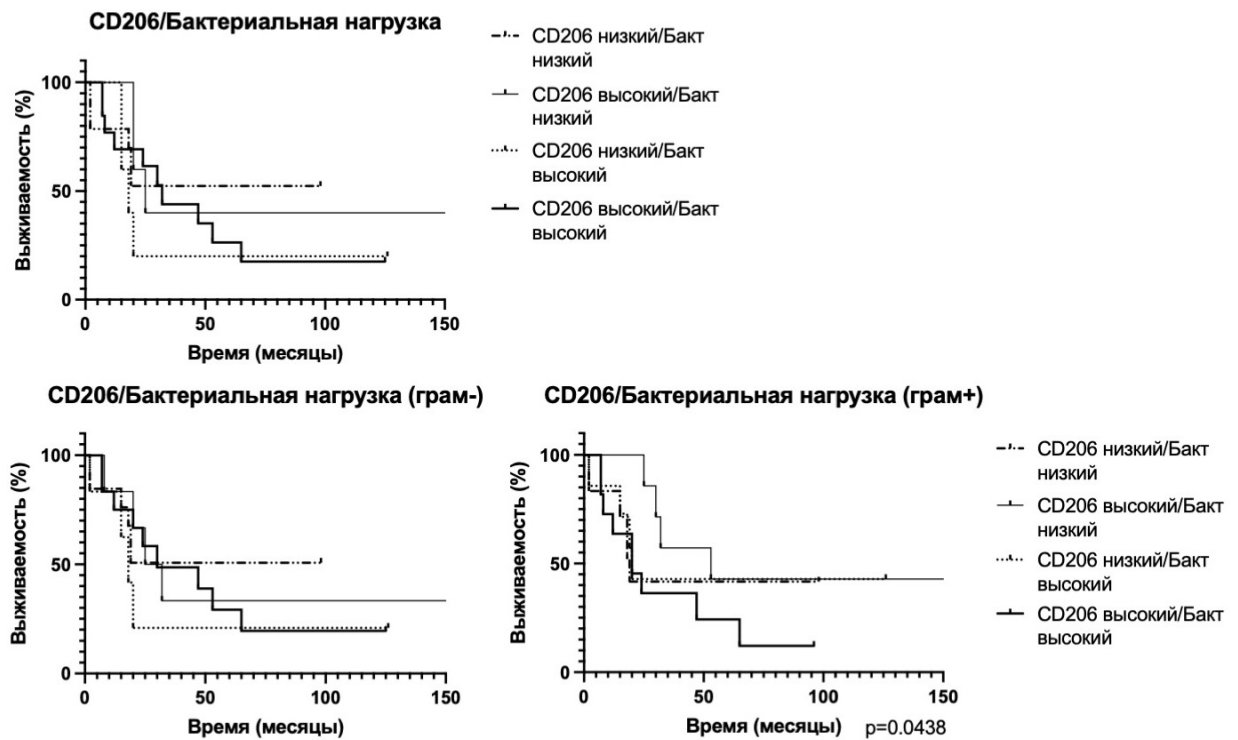
**Рисунок 14** - Выживаемость пациентов с плоскоклеточным раком пищевода в зависимости от общей бактериальной нагрузки и экспрессии FoxP3

Ранее показано, что FoxP3 является благоприятным прогностическим маркером рака пищевода. При добавлении оценки бактериальной нагрузки в этих опухолях обнаружено, что FoxP3 является маркером благоприятного прогноза в группе опухолей с высокой бактериальной нагрузкой ( $HR=0,3534$ ;  $p=0,0441$ ), в то время как в опухолях с низкой бактериальной нагрузкой он прогностически не значим. Для других проанализированных маркеров закономерностей связи выживаемости с уровнем бактериальной нагрузки не выявлено.

Проведенный ранее анализ выявил корреляционную связь между содержанием CD206 в опухолях и общей бактериальной нагрузкой. Однако анализ выживаемости в зависимости от содержания CD206 и общей бактериальной нагрузки не выявил закономерностей. Также мы показали, что в опухолях, характеризующихся высоким содержанием CD206, преобладают грамположительные бактерии, поэтому мы провели анализ выживаемости в группах в зависимости от содержания CD206 вместе с грамположительными или грамотрицательными микроорганизмами (Рисунок 15).

При анализе выживаемости в зависимости от содержания CD206 и грамположительных бактерий оказалось, что именно при такой комбинации (CD206 высокий/грам+ высокий) прогноз наиболее неблагоприятный в сравнении с группой (CD206 высокий/грам+ низкий) ( $HR=2,651$ ;  $p=0,0438$ ). Таким образом, анализ содержания различных бактерий в опухоли может являться прогностическим фактором при определенном фенотипе клеток микроокружения.





**Рисунок 15** - Выживаемость пациентов с ESCC в зависимости от бактериальной нагрузки и CD206+ макрофагов

### **Механизмы отбора опухолевых клеток под воздействием цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета**

Проведенное на предыдущем этапе работы исследование выявило новые и интересные закономерности между фенотипом клеток стромы опухолей различных нозологий и их микробиологической составляющей. Поэтому следующая часть данного исследования посвящена поиску и изучению механизмов взаимовлияния микробиома и локального внутриопухолевого иммунитета, а именно, механизмов формирования цитотоксичности и/или толерантности макрофагов под воздействием бактерий опухолевой стромы и механизмов отбора опухолевых клеток под воздействием цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета.

Для указанной задачи использована модель, разработанная автором данного исследования, основанная на кокультивировании опухолевых клеток с цитотоксическими макрофагоподобными клетками (M1) для получения клеточных линий, устойчивых к их цитотоксическому действию. Для работы были использованы следующие клеточные линии: моноцитарная клеточная линия THP-1; клеточные линии НМРЛ: Н1975, Н1299 и Н292; рака почки А498 и RenCa. На первом этапе работы проводился подбор условий для получения цитотоксических макрофагоподобных клеток из клеточной линии THP-1 (далее THP-1/M1-макрофаги). Для этого были использованы следующие реагенты: РМА (67 мкМ), IFN $\gamma$  (0,1 мкг/мл), LPS 0,1 (мкг/мл), MDP 0,1 (мкг/мл). Необходимо отметить, что концентрации веществ

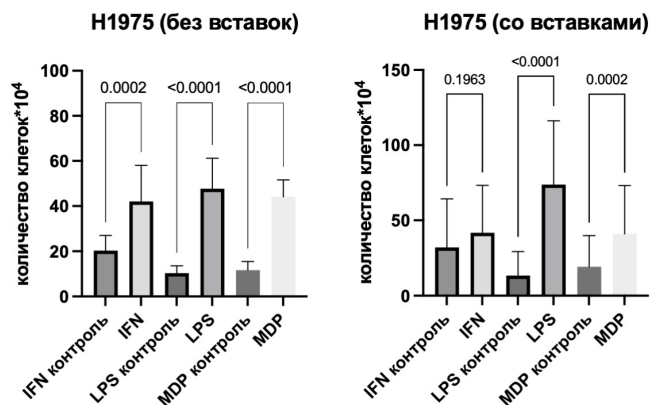
подобраны таким образом, что ТНР-1 погибают после стимуляции в течение 5-7 дней и не образуют смешанную популяцию клеток. Контроль отсутствия ТНР-1 М1 макрофагов в культуре клеток проводили с помощью флуоресценции.

Для получения опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток, в лаборатории была разработана уникальная модель кокультивирования *in vitro*. Кокультивирование проводилось по следующему протоколу:

- 1-е сутки: клетки ТНР-1 рассаживались в 6-ти луночные культуральные планшеты в количестве  $4 \cdot 10^5$  с добавлением IFN $\gamma$  и РМА в соответствующих концентрациях;
- 2-е сутки: добавление LPS и MDP в соответствующие лунки в соответствующих концентрациях;
- 3-е сутки: отмывка полученных макрофагов от добавленных веществ; высаживание опухолевых клеток в количестве  $4 \cdot 10^4$ . В работе использованы клеточные линии НМРЛ Н1975, Н1299 и Н292, рака почки А498 и RenCa.

Один эксперимент включает в себя три раунда кокультивирования, т.е. после первого раунда остаются устойчивые опухолевые клетки, которые затем используются для кокультивирования со вновь стимулированными макрофагоподобными клетками. После прохождения 3 раундов кокультивирования полученные клетки проверяются на приобретение устойчивости к цитотоксической активности. В случае подтверждения их устойчивости полученные клеточные линии используются для проведения дальнейших экспериментов.

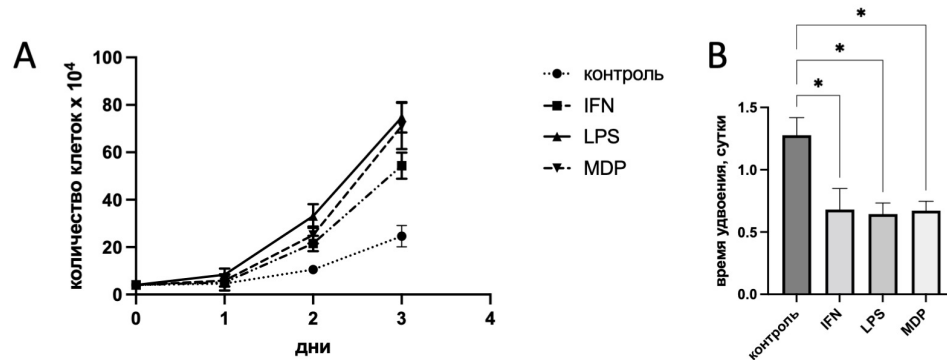
Помимо прямого кокультивирования аналогичная серия экспериментов проводилась с использованием культуральных вставок с полупроницаемой мембраной с размером пор 3 мкм, которые позволяют осуществлять совместное культивирование клеток в лунке при отсутствии их прямого взаимодействия. В результате проведенных экспериментов были получены клеточные линии опухолей различных нозологий, устойчивые к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток. Результаты представлены на рисунке 16.



**Рисунок 16** – Сравнительный анализ чувствительности исходных и производных клеточных линий к цитотоксической активности на примере клеточной линии Н1975

В результате проведенных исследований были получены производные сублинии НМРЛ и рака почки, устойчивые к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток. Полученные сублинии были использованы в дальнейшей работе для изучения основных клеточных характеристик *in vitro* и *in vivo*, а также для анализа транскриптома и для выявления механизмов, вовлеченных в приобретение клетками новых свойств.

Одной из основных характеристик злокачественных клеток является повышенная скорость деления. Анализ динамики роста клеточных линий проводился при помощи прямого подсчета количества клеток в камере Горяева каждые 24 часа (Рисунок 17).

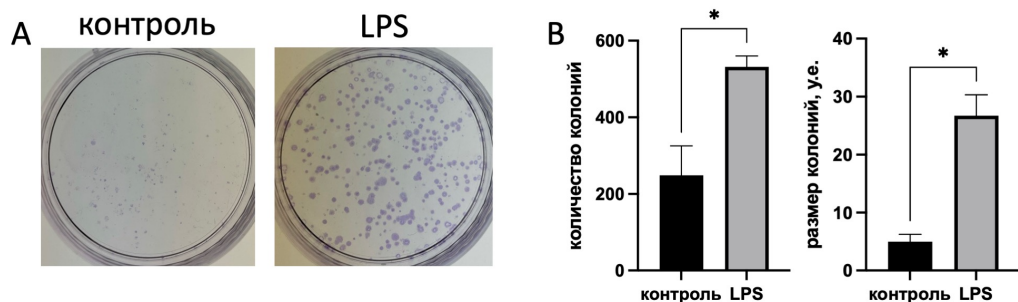


**Рисунок 17** - Динамика роста (А) и среднее время удвоения (В) клеток производных и контрольных линий на примере клеточной линии НМРЛ Н1975

Следует отметить, что исходная клеточная линия Н1975 делится очень интенсивно. Время удвоения для контрольной линии Н1975 составило приблизительно 1,3 суток. Производные данной клеточной линии, устойчивые к цитотоксической активности, делятся статистически достоверно быстрее контрольной линии – среднее время удвоения составляет 0, 6 суток.

Полученные результаты свидетельствуют об изменении скорости пролиферации полученных сублиний, устойчивых к цитотоксической активности.

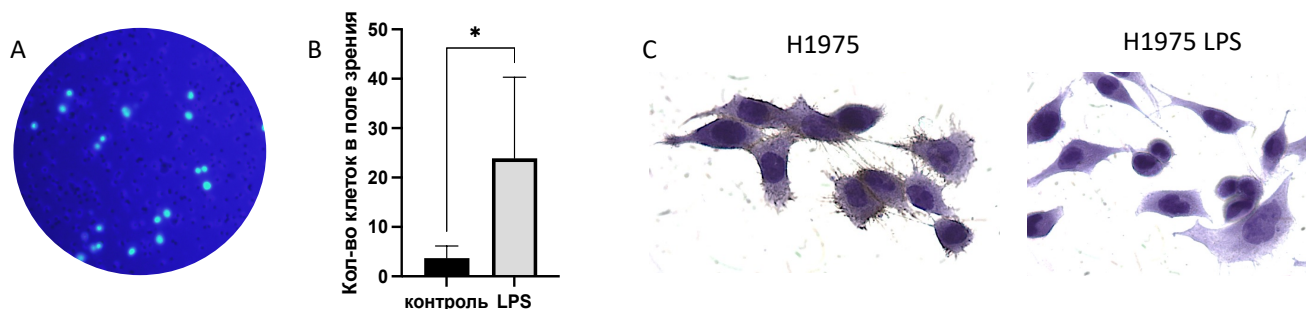
Другим важнейшим показателем агрессивности трансформированных клеток *in vitro* является их способность формировать колонии в отсутствие стимуляции окружающими клетками (Рисунок 18).



**Рисунок 18** - Пример фотографий чашек с колониями клеток линии Н1299, сформированными в условиях «бедного» микроокружения (А) и статистический анализ клоногенности полученных клеточных линий (В)

В условиях дефицита ростовых факторов, секретируемых клетками микроокружения в среду, когда клетки находятся в условиях сильно разреженной популяции, менее малигнизированные культуры останавливаются в росте или погибают. Проведен тест на способность формирования колоний в условиях разреженной клеточной популяции, или клоногенность, для всех полученных сублиний. Не все исследованные клеточные линии способны к формированию колоний из единичных клеток. Статистический анализ выявил увеличение как среднего количества колоний, так и их размера для всех производных клеточных линий, устойчивых к цитотоксической активности, что свидетельствует как об увеличении способности клеток к автономному росту, так и о повышении скорости их пролиферации.

Миграционная активность или подвижность злокачественных клеток является следствием эпителиально-мезенхимального перехода и во многом определяет их способность распространяться по организму. Направленная миграция клеток в организме определяется градиентом различных факторов, которые задают направление движения. В упрощенной модели этого процесса *in vitro* исследуется миграция клеток через поры мембраны по градиенту ростовых факторов в составе сыворотки. Результаты анализа миграционной активности клеток в камере Бойдена представлены на рисунке 19.



**Рисунок 19** – Пример фотографии мембраны камеры Бойдена (А); статистический анализ миграционной активности (В) на примере клеточной линии H1975; иммуноцитохимическое окрашивание исходных и производных клеток H1975 с использованием антител к E-кадгерину (С)

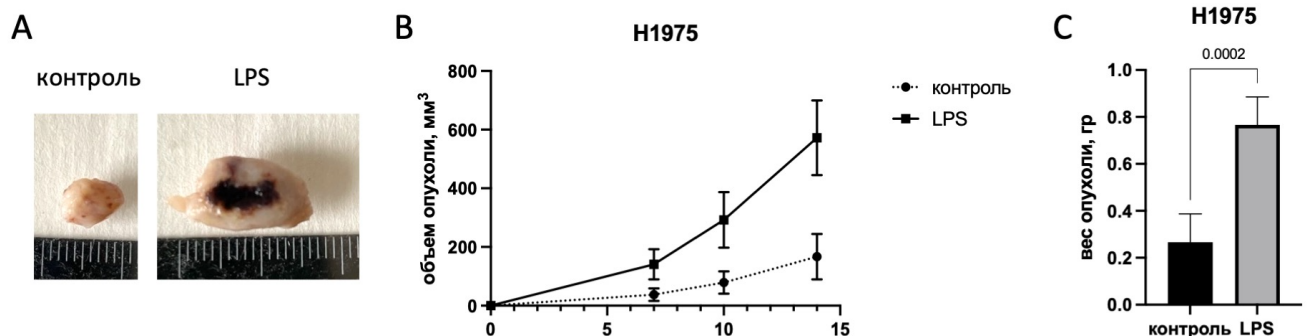
Проведенный анализ показал, что при приобретении клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток наблюдается усиление их миграционной способности.

E-кадгерин является одной из основных молекул клеточной адгезии. При развитии многих эпителиальных опухолей наблюдается потеря экспрессии данного белка посредством генетических и эпигенетических механизмов. В результате потери экспрессии E-кадгерина нарушаются межклеточные контакты, что приводит к усилению миграционной способности клеток, а также к накоплению  $\beta$ -катенина в ядре и повышению его транскрипционной активности, что приводит к стимуляции пролиферации. В связи с выявленными изменениями

миграционных и пролиферативных свойств клеток, далее был проведен иммуноцитохимический анализ экспрессии E-кадгерина. Проведенные эксперименты показали, что у полученных в результате отбора клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток, наблюдается потеря экспрессии E-кадгерина.

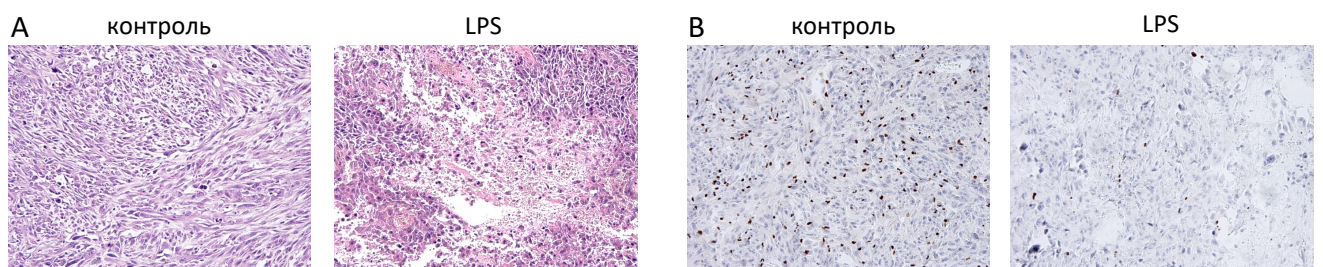
В связи с тем, что устойчивость к цитотоксической активности оказала значительное влияние на изменение клеточных характеристик *in vitro*, следующей задачей данной работы было изучение полученных сублиний *in vivo*. В работе использовались самки бестимусных мышей линии D2ЧJ в возрасте 6–8 недель. Каждому животному подкожно прививалось по 2 опухоли (прививочная доза составляла  $5 \times 10^6$  клеток, суспендированных в 100 мкл физиологического раствора). Размер опухолей измерялся, их объем высчитывался по формуле:  $V = \text{ПЧ(шир)} \times \text{ПЧ(дл)} \times 0,5$ . Продолжительность эксперимента составляла 3 недели. Образовавшиеся опухоли использовали для иммуногистохимического анализа. Результаты представлены на рисунке 20.

Проведенные эксперименты на животных показали, что клетки, обладающие устойчивостью к цитотоксической активности макрофагов, характеризуются более высоким злокачественным потенциалом, а именно, скоростью роста подкожных ксенографтов по сравнению с клетками исходной линии.



**Рисунок 20** – Внешний вид (A), скорость роста (B) подкожных ксенографтов и терминальный вес образовавшихся опухолей (C)

Гистологический тип опухоли и степень инфильтрации ее макрофагами представлены на рисунке 21.



**Рисунок 21** – Примеры гистологического окрашивания опухолей подкожных ксенографтов гематоксилин-эозином (A) и иммуногистохимического окрашивания с использованием антител к PU.1 (B)

Опухоли, образуемые клетками, устойчивыми к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток, характеризовались достоверно большим размером, большим количеством очагов некроза и повышенной васкуляризацией, что свидетельствует об их более высоком злокачественном потенциале. Также необходимо отметить, что в опухолях, образуемых клетками, устойчивыми к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток наблюдалось меньшее количество PU.1+ клеток, по сравнению с контролем. Полученные результаты согласуются с отмеченными нами ранее закономерностями о том, что для аденокарциномы легкого неблагоприятным прогностическим фактором служит низкая инфильтрация PU.1+ клетками, а не высокая.

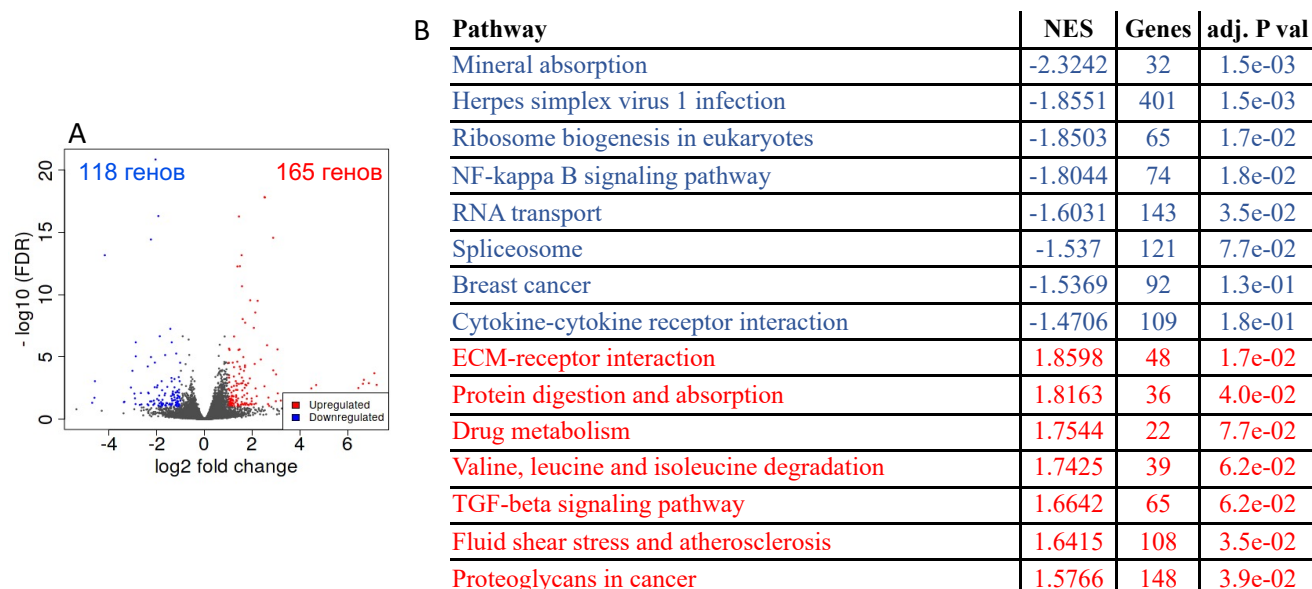
Так как клеточные тесты *in vitro* выявили изменения в миграционной способности клеток, экспрессии E-кадгерина и активности MMP-9, дополнительно была проведена оценка их метастатического потенциала. Эксперимент продемонстрировал отсутствие верифицируемых метастазов в регионарных лимфоузлах, а также в печени и легких экспериментальных животных во всех исследованных клеточных линиях, как исходных, так и устойчивых к цитотоксической активности.

Таким образом, при анализе клеточных характеристик *in vitro* и *in vivo* исследуемых клеточных линий можно сделать следующие выводы: приобретение опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток оказывает сходное опухоль-прототирующее влияние на различные клеточные линии НМРЛ и рака почки. Данный факт может свидетельствовать о наличии общих клеточных механизмов регуляции приобретения клетками данного фенотипа. Основные различия в поведении клеток, устойчивых к цитотоксичности, выражались преимущественно в регуляции скорости роста опухолей *in vivo* и динамике пролиферации *in vitro*. В связи с этим, далее проведен анализ возможных механизмов, лежащих в основе проведения различных митогенных сигналов.

На следующем этапе работы проведен анализ транскриптома исследуемых клеточных линий: H1975 и сублинии H1975 LPS, устойчивой к цитотоксической активности. В результате проведенного анализа обнаружено 207 дифференциально экспрессирующихся генов (Рисунок 22), с достоверно ( $\log_2$  fold change >1, FDR corrected p-value < 0.05) изменяющейся экспрессией в библиотеках H1975 LSP по сравнению с контролем. Среди них экспрессия 165 генов находилась в положительной регуляции, экспрессия 118 генов подвергались отрицательной регуляции.

Анализ насыщенности метаболических путей на основе базы данных KEGG выявил достоверно измененные сигнальные пути, потенциально вовлеченные в опухолевую прогрессию, например, интегрин-зависимый сигнальный путь и TGF $\beta$  сигнальный путь. Помимо анализа дифференциально экспрессирующихся генов, дополнительно проведен анализ некодирующих РНК, экспрессия которых достоверно изменялась в экспериментальных образцах по сравнению с

контролем. Все они относились к классу длинных некодирующих РНК.



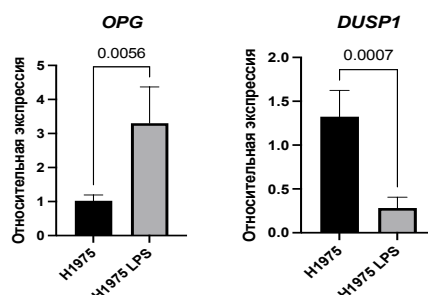
**Рисунок 22** - Диаграмма рассеяния, отображающая дифференциальную экспрессию генов (A); анализ насыщенности метаболических путей на основе базы данных KEGG (B)

По результатам функциональной аннотации дифференциально экспрессирующихся генов на следующем этапе исследования проведен выбор отдельных генов, потенциально вовлеченных в регуляцию пролиферации. Результаты представлены в таблице 6.

**Таблица 6** — Дифференциально экспрессирующиеся гены в образцах H1975 LPS по сравнению с контролем

Gene ID	Log2 Fold Change	p значение	Название
DUSP1	-1,04	0,013	dual specificity phosphatase 1
TP63	-1,25	0,013	tumor protein p63
WNT10B	-1,28	0,023	Wnt family member 10B
RRAGD	-1,55	0,002	Ras related GTP binding D
NKD2	-1,96	0,001	NKD inhibitor of WNT signaling pathway 2
SCIN	-2,87	2,62E-06	scinderin
PLCB1	-2,93	0,007	phospholipase C beta 1
SDC2	3,07	0,005	syndecan 2
MAP2	2,88	7,16E-16	microtubule associated protein 2
TLR2	2,36	6,29E-06	toll like receptor 2
CHI3L1	2,07	1,73E-08	chitinase 3 like 1
TNFSF10	1,83	0,0006	TNF superfamily member 10
COL4A6	1,39	0,047	collagen type VIII alpha 1 chain
ITGA1	1,63	0,0005	integrin subunit alpha 1
OPG	1,59	0,011	TNF receptor superfamily member 11b
PLCD4	1,56	0,030	phospholipase C delta 4
PLAT	1,45	1,63E-16	plasminogen activator, tissue type
COL4A6	1,39	0,047	collagen type IV alpha 6 chain
CAVIN2	1,38	1,75E-12	caveolae associated protein 2
TGFB1	1,19	2,21E-05	transforming growth factor beta 1

Для подтверждения данных, полученных при помощи транскриптомного секвенирования, экспрессия мРНК генов *OPG* и *DUSP1* была исследована при помощи количественной ПЦР. Результаты представлены на рисунке 23.



**Рисунок 23** – Относительная экспрессия генов *OPG* и *DUSP1* в клеточной линии H1975 и ее производной, устойчивой к цитотоксической активности макрофагов

Проведенный анализ показал статистически достоверные изменения экспрессии исследуемых генов. Так для гена *OPG* наблюдалось усиление экспрессии, в то время как для *DUSP1* наблюдалось снижение экспрессии в устойчивых производных.

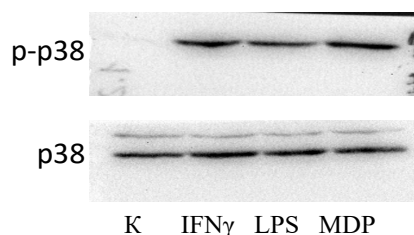
Так как в результате секвенирования не было выявлено очевидных ключевых регуляторов пролиферации на уровне экспрессии генов, было выдвинуто предположение, что регуляции пролиферации в данном случае может осуществляться не на уровне экспрессии генов, а на уровне активности белков. К ключевым регуляторам клеточного деления относятся MAP-киназы. В пользу активации MAP-киназ также свидетельствует выявленная нами повышенная экспрессия TGF $\beta$ .

Митоген-активируемые киназы (MAP-киназы) включены в каскад передачи сигналов от различных клеточных рецепторов, в частности интегринов, ко многим транскрипционным факторам. В настоящее время выделяют три различных митоген-активируемых сигнальных каскада, приводящих к активации трех основных MAP-киназ: ERK1/2, JNK и p38. ERK1/2 – является основной MAP-киназой, проводящей митогенные сигналы от различных ростовых факторов, цитокинов и гормонов, приводящие к стимуляции клеточного роста.

В связи с тем, что полученные результаты показали, что приобретение клетками различных типов устойчивости к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток сопряжено с повышением их пролиферативной способности, проведен анализ уровня активирующего фосфорилирования MAP-киназ. На первом этапе проведен анализ статуса фосфорилирования ERK1/2 (p44/42 MAPK) исследуемых клеточных линий. Вестерн-блот анализ уровня фосфорилирования ERK1/2 с помощью антител к ERK1/2: ERK1 - фосфорилированной по 202 остатку треонина и 204 остатку тирозина, а ERK2 по 185 остатку треонина и 187 остатку тирозина, показал, что устойчивость к цитотоксической активности не приводит к увеличению количества фосфорилированных ERK1/2 в различных клеточных линиях.



Исследование влияния отбора на активацию киназы JNK1 (MAPK8) также не выявило повышения ее активирующего фосфорилирования (по 183 треонину) в производных клеточных линиях, в то время как активность киназы p38 значительно изменялась (Рисунок 24).



**Рисунок 24** - Вестерн-блот анализ уровня активирующего фосфорилирования и экспрессии p38 на примере клеточной линии H1975 и ее производных

Проведенный анализ выявил заметное увеличение уровня фосфорилированной формы p38 во всех исследованных клеточных линиях. Таким образом проведенный анализ уровней активности ERK1/2, p38 и JNK в полученных клеточных линиях показал, что приобретение клетками устойчивости к цитотоксичности приводит к активации p38, которая и является кандидатом на роль “активатора” пролиферации.

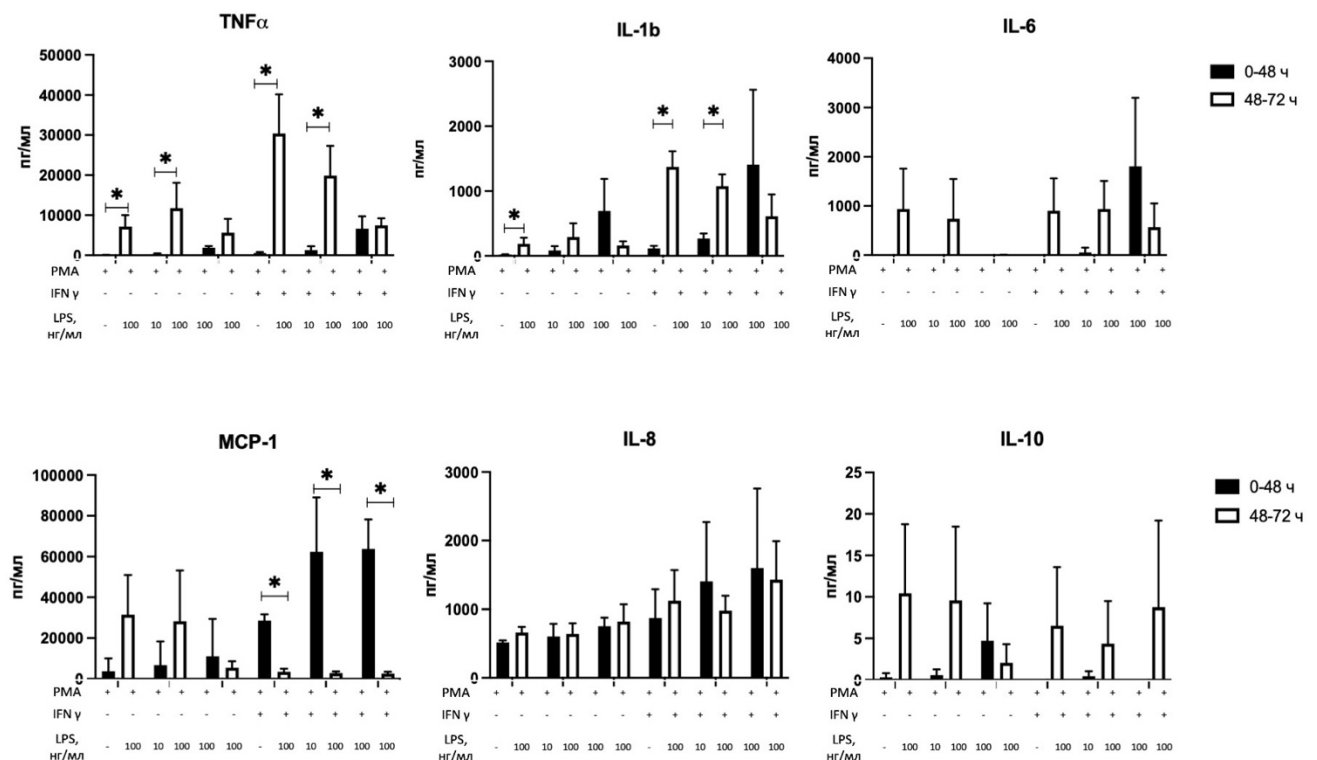
#### **Механизм развития толерантности макрофагов в микроокружении опухоли**

Микробиом опухоли может оказывать многогранное влияние на ее формирование и развитие. С одной стороны, под воздействием микробиома формируется популяция цитотоксических макрофагов, которые могут способствовать элиминации опухолевых клеток, а с другой стороны - осуществлять отбор более злокачественных клонов. Кроме того, постоянное воздействие микробиома в опухоли может приводить к “толерантности” макрофагов – состоянию, в котором они не способны адекватно отвечать на провоспалительные стимулы. Данная часть исследования посвящена изучению феномена формирования толерантности макрофагов под воздействием бактерий и цитокинов опухолевого микроокружения.

Для проверки данной гипотезы была разработана клеточная модель. Макрофаги получали путем дифференцировки клеток миелоидного происхождения линии THP-1. Толерантность индуцировали путем предварительной инкубации клеток THP-1 в течение 48 часов с LPS в концентрациях 10 и 100 нг/мл. После такой первичной инкубации производился отбор сред для определения концентрации продуцируемых цитокинов. Затем клетки THP-1 промывали свежей средой RPMI, добавляли новую среду с LPS (100 нг/мл) и инкубировали 48 ч, после чего отбирали среды для определения концентрации продуцируемых цитокинов. Рабочая концентрация клеток THP-1 составила  $5 \times 10^5$  кл/мл. Все временные диапазоны и концентрации LPS были выбраны на основе экспериментальных данных по подбору условий индукции толерантности и наиболее выраженному ответу.

Степень цитотоксической активности клеток оценивалась путем измерения концентраций цитокинов в культуральной жидкости методом иммуноферментного анализа. Оценивалась продукция таких цитокинов, как TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , моноцитарный хемотаксический фактор-1 (MCP-1), интерлейкин – 8 (IL-8), интерлейкин – 6 (IL-6), интерлейкин-10 (IL-10). Количество продуцируемых цитокинов было нормировано на количество жизнеспособных клеток.

На первом этапе методом ИФА были определены концентрации цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6, а также цитокинов MCP-1, IL-8 и IL-10 в культуральной среде спустя 48 часов инкубации THP-1 с первичными провоспалительными стимулами (PMA, IFN $\gamma$ , LPS) и спустя 48 часов после вторичной инкубации (Рисунок 25).

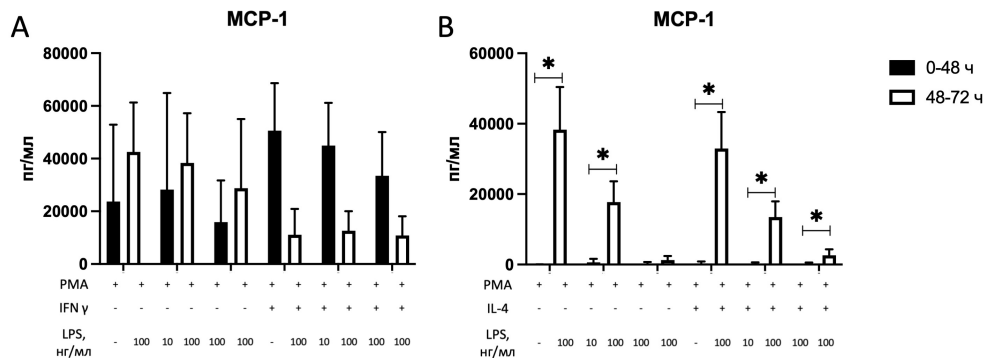


**Рисунок 25** - Количество продуцируемых цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, IL-8 и IL-10 в условиях индукции толерантности при помощи PMA, IFN $\gamma$ , LPS. \* - статистически значимо

Результаты исследования показали, что при вторичной воспалительной стимуляции продукция провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и MCP-1 заметно снижалась. Было отмечено, что наиболее яркий эффект толерантности наблюдается в отношении продукции MCP-1, а экспрессия TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  зависела от первичного стимула. Более того, продукция ингибитора синтеза цитокинов, IL-10, запускалась при воздействии вторичного провоспалительного стимула, что также иллюстрирует наблюдаемый эффект толерантности. Следует отметить, что эффект толерантности наиболее выражен в присутствии IFN $\gamma$ , а для ее формирования необходимо 100 нг/мл LPS. Интересно, что в случае MCP-1 формирование толерантности не было опосредовано первичным действием LPS, для ее формирования оказалось достаточным

присутствия IFN $\gamma$ .

Для анализа вклада опухолевых факторов в развитие толерантности макрофагов, эксперименты, описанные выше, проводились с использованием среды, кондиционированной клетками H1975, или при добавлении в среду ИЛ-4. Клетки H1975 рассеивали до 50% конfluence и культивировали в течение 48 часов. После этого культуральную жидкость собирали, стерилизовали фильтрованием и использовали для культивирования макрофагов. ИЛ-4 добавляли 20 нг/мл. Продукцию MCP-1 определяли при помощи ИФА (Рисунок 26).



**Рисунок 26 – Продукция MCP-1 в присутствии кондиционированной среды от клеток H1975 (А) и ИЛ-4 (В). \* - статистически значимо**

Показано, что кондиционированная среда от клеток H1975 повышает способность макрофагов продуцировать MCP-1 в ответ на вторичное действие эндотоксина, однако не отменяет формирования толерантности. ИЛ-4 – один из наиболее изученных иммуносупрессорных факторов, продуцируемых опухолевыми клетками. Было сделано предположение, что данный фактор может вносить вклад в формирование толерантности в условиях среды, кондиционированной опухолевыми клетками. Результаты исследования опровергли гипотезу относительно вклада ИЛ-4 в формирование толерантности. Эксперимент с добавлением ИЛ-4 также подтвердил вклад LPS в формирование толерантности. С повышением первичной концентрации эндотоксина наблюдался дозозависимый эффект снижения продукции MCP-1 в ответ на вторичное воздействие провоспалительного фактора.

Полученные результаты позволяют впервые установить связь между толерантностью врожденного иммунитета и микробиологической составляющей опухолей. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что в условиях микроокружения опухоли формируется толерантность макрофагов под действием факторов воспаления и компонентов клеточной стенки бактерий. Опухолевые клетки также могут вносить свой вклад в процесс формирования толерантности посредством продукции иммуносупрессорных факторов. Лучшее понимание механизмов формирования толерантности макрофагов в условиях микроокружения опухоли, вероятно, будет способствовать реализации новых диагностических и терапевтических подходов в лечении онкологических заболеваний.

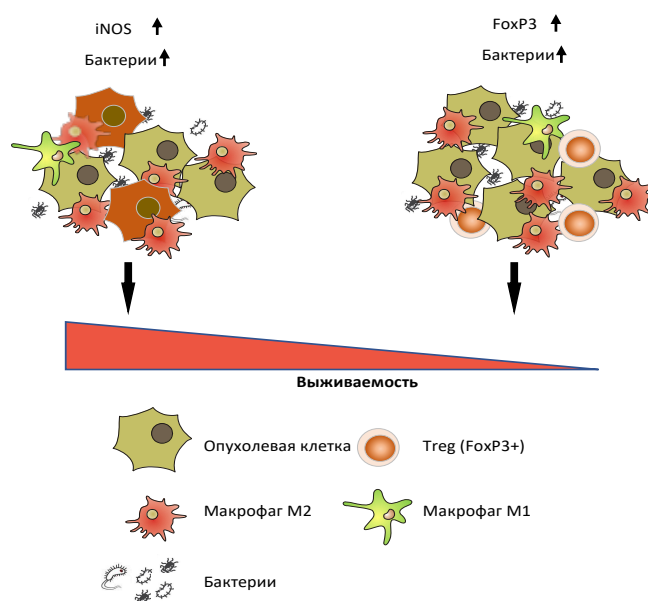
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование посвящено изучению взаимодействия микробиологического и иммунологического компонентов опухолевой стромы и их вкладу в опухолевую прогрессию. Проведен комплексный анализ фенотипа клеток иммунологической составляющей опухолевой стромы, а также видового разнообразия и количественных характеристик микробиома опухолей. Впервые получены фундаментальные данные об ассоциации видового состава и количественных характеристик микробиома с составом и фенотипом опухолевой стромы. На первом этапе исследования описано два новых прогностических маркера немелкоклеточного рака легкого, а именно, PU.1 и CHID1, а также подтверждена значимость ряда других. Впервые показано, что CHID1, традиционно считающийся маркером M2 макрофагов, экспрессируется опухолевыми клетками легкого, причем его экспрессия значимо зависит от гистологического типа опухоли. Также впервые показано, что экспрессия CHID1 в опухолевых клетках является фактором хорошего прогноза. Необходимо отметить, что CHID1 также является фактором благоприятного прогноза на ранних стадиях заболевания.

Еще одним новым прогностическим маркером для НМРЛ оказался транскрипционный фактор PU.1. Показано, что экспрессия данного белка имеет противоположное прогностическое значение для двух основных гистологических подтипов НМРЛ. Так, низкое количество PU.1+ клеток в опухоли является фактором плохого прогноза для аденокарцином, в то время как для плоскоклеточных опухолей легкого такое обстоятельство является фактором хорошего прогноза. Также показано, что высокая экспрессия iNOS и низкая экспрессии IDO1 являются хорошими прогностическими маркерами НМРЛ, что согласуется с литературными данными.

При помощи направленного секвенирования гена 16S прокариот определен видовой состав опухолевого микробиома и определены бактерии, количество которых увеличено по сравнению с нормальной прилежащей тканью. Выявлены бактерии, преобладающие в различных опухолях. Далее впервые проведен анализ общей бактериальной нагрузки опухолей совместно с фенотипом опухолевой стромы. Общая бактериальная нагрузка, как и уровень количества FoxP3 положительных клеток в опухоли, по данным исследования, не являются прогностическими маркерами и не влияют на общую выживаемость пациентов. Однако высокая экспрессия iNOS в совокупности с повышенной бактериальной нагрузкой является маркером хорошего прогноза по сравнению с высокой бактериальной нагрузкой и низкой экспрессией iNOS. Также впервые показано, что высокая бактериальная нагрузка опухоли с иммуносупрессией (большим количеством FoxP3+ клеток) является маркером плохого прогноза при НМРЛ по сравнению с группой с высоким содержанием бактерий и низким содержанием FoxP3. Таким образом, впервые показано, что общая бактериальная нагрузка опухоли может иметь противоположное

прогностическое значение в зависимости от состояния местного противоопухолевого иммунитета (Рисунок 27).



**Рисунок 27** - Прогностическая роль комплексного анализа опухолевой стромы и микробиома

Известно, что для опухолей кишечника и желудка прогностическая значимость стромальных маркеров опухолей диаметрально отличается от других нозологий. Традиционно считающиеся маркерами плохого прогноза MAO и Tregs в опухолях некоторых отделов ЖКТ являются благоприятными прогностическими факторами. В данном исследовании впервые показано, что в опухолях плоскоклеточного рака пищевода, наряду с желудком и кишечником, CD163 и FoxP3 являются маркерами хорошего прогноза. Также в результате исследования разработаны новые подходы к оценке прогноза плоскоклеточного рака пищевода. Впервые показано, что характеристики резидентного микробиома опухолей данной локализации при его совместном анализе с фенотипом клеток опухолевой стромы могут служить достоверным прогностическим фактором. Интересно отметить, что результаты анализа прогностической значимости общей бактериальной нагрузки совместно с фенотипом стромальных клеток опухолей пищевода были во многом аналогичны данным, полученным при исследовании образцов НМРЛ, что свидетельствует о общих принципах взаимодействия различных компонентов опухолевой стромы.

Таким образом, впервые в мире проведен комплексный анализ взаимодействия микробиома и иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы, оценен вклад этого нового фактора в опухолевую прогрессию и его клиническая значимость. Данная работа открывает новое направление исследований, а полученные результаты позволят выявить новые молекулярные маркеры опухолевой стромы, которые будут использоваться в диагностике, для определения прогноза заболевания и в качестве мишеней для терапии опухолей.

## ВЫВОДЫ

1. Транскрипционный фактор PU.1 может быть предложен в качестве нового иммуногистохимического маркера макрофагов в опухолях различных нозологий. Ядерная локализация данного белка позволяет проводить одновременное рутинное иммуногистохимическое окрашивание с мембранными или цитоплазматическими белками макрофагов.

2. Впервые показана прогностическая значимость количества PU.1 положительных стромальных клеток для немелкоклеточного рака легкого.

3. Впервые показано, что экспрессия хитиназоподобного белка CHID1 опухолевыми клетками немелкоклеточного рака легкого коррелирует с гистологическим типом опухоли и является фактором благоприятного прогноза.

4. Анализ качественного и количественного состава резидентного микробиома в нормальных и опухолевых тканях выявил значимые отличия. Впервые показано, что общее содержание бактерий в опухолях легкого и пищевода ниже, чем в нормальной ткани.

5. Впервые проведенный комплексный анализ общей бактериальной нагрузки опухолей и фенотипа опухолевой стромы на примере немелкоклеточного рака легкого и плоскоклеточного рака пищевода показал, что общая бактериальная нагрузка опухоли может иметь противоположное прогностическое значение в зависимости от состояния местного противоопухолевого иммунитета.

6. Впервые показано, что цитотоксические макрофаги способствуют отбору более злокачественных клонов опухолевых клеток, характеризующихся повышенной пролиферативной активностью.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы диссертационного исследования изложены в 36 публикациях, из них 15 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, и 2 патента РФ.

Основные работы:

1. Подлесная, П.А. Механизм развития толерантности макрофагов в микроокружении опухоли / П.А. Подлесная, **О.В. Ковалева**, А.А. Петренко, А.Н. Грачев // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2021. – №4. – С. 250-254.

2. **Kovaleva, O.** Prognostic Significance of the Microbiome and Stromal Cells Phenotype in Esophagus Squamous Cell Carcinoma / **O. Kovaleva**, P. Podlesnaya, M. Rashidova, D. Samoilova, A. Petrenko, V. Mochalnikova, V. Kataev, Y. Khlopko, A. Plotnikov, A. Gratchev // Biomedicines. – 2021. – V. 9, №7. – P. 743.

3. **Ковалева, О.В.** Факторы иммуносупрессии PD-1, PD-L1, IDO1 и колоректальный рак / **О.В. Ковалева**, МА. Рашидова, А. Н. Грачев, В.В. Масленников, И.В. Булычева, Е.С. Герштейн,

Е.А. Короткова, Н.Ю. Соколов, З.З. Мамедли, Н.Е. Кушлинский // Доклады российской академии наук. Науки о жизни. – 2021. – Т. 497. – С. 160–164.

4. **Kovaleva, O.** CHID1 Is a Novel Prognostic Marker of Non-Small Cell Lung Cancer / **O.V. Kovaleva**, M.A. Rashidova, D.V. Samoiloa, P.A. Podlesnaya, R.M. Tabiev, V.V. Mochalnikova, A. Gratchev // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22, №1. – P. 450.

5. **Ковалева, О.В.** Экспрессия транскрипционного фактора PU.1 в стромальных клетках как прогностический маркер при немелкоклеточном раке лёгкого / **О.В. Ковалева**, М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, П.А. Подлесная, В.В. Мочальникова, А.Н. Грачев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2020. – Т. 170, №10. – С. 504-507.

6. **Kovaleva, O.** Lung Microbiome Differentially Impacts Survival of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Depending on Tumor Stroma Phenotype / **O. Kovaleva**, P. Podlesnaya, M. Rashidova, D. Samoiloa, A. Petrenko, I. Zborovskaya, V. Mochalnikova, V. Kataev, Y. Khlopko, A. Plotnikov, A. Gratchev // Biomedicines. – 2020. – V. 8, №9. – P. 349.

7. **Kovaleva, O.V.** Immunosuppressive Phenotype of Esophagus Tumors Stroma / **O.V. Kovaleva**, M.A. Rashidova, D.V. Samoiloa P.P. Podlesnaya, V.V. Mochalnikova, A. Gratchev // Analytical Cellular Pathology. – 2020. V. 20, №5424780.

8. **Ковалева, О.В.** Иммуносупрессорные особенности фенотипа стромы опухолей почки различных гистологических типов / **О.В. Ковалева**, М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, П.А. Подлесная, Р.М. Табиев, Н.В. Кунцевич, Г.Д. Ефремов, Б.Я. Алексеев, А.Н. Грачев // Онкоурология. – 2020. Т. 16, №2. – С. 29-35.

9. **Kovaleva, O.** Human Lung Microbiome on the Way to Cancer / **O. Kovaleva**, D. Romashin, I.B. Zborovskaya, M.M. Davydov, M.S. Shogenov, A. Gratchev // Journal of Immunology Research. – 2019. – V. 2019, №1394191.

10. Samoiloa, D. Development and Characterization of a Novel Monoclonal Antibody Against Chitinase-like Protein CHID1 Applicable for Immunohistochemistry on Formalin Fixed Paraffin-Embedded Sections / D.V. Samoiloa, **O.V. Kovaleva**, K.V. Shelekhova, A.A. Petrenko, S.N. Kurochkin, R.V. Fedotov, A. Gratchev // Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy. – 2019. - V.38, №1. – P.12-17.

11. **Ковалева, О.В.** Роль макрофагов, ассоциированных с опухолью в патогенезе почечноклеточных опухолей / **О.В. Ковалева**, Г.Д. Ефремов, Д.С. Михайленко, Б.Я. Алексеев, А.Н. Грачев // Онкоурология. – 2017. - Т. 13, №1. – С. 20-26.

12. **Kovaleva, O.V.** A Novel Monoclonal Antibody Against Alpha-Methylacyl-CoA Racemase Applicable for Paraffin-Embedded Tissues and Diagnostics of Prostate Cancer / **O.V. Kovaleva**, D.V. Samoiloa, M.S. Shitova, N.A. Oleinikova, N.V. Danilova, P.G. Malkov, A. Gratchev // Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy. – 2017. - V.36, №1. – P.30-34.

13. **Kovaleva, O.V.** Tumor Associated Macrophages in Kidney Cancer / **O.V. Kovaleva, D.V. Samoilova, M.S. Shitova, A. Gratchev** // Analytical Cellular Pathology. – 2016. V. 2, № 9307549. – P. 1-6.

14. Mickley, A. Molecular and immunologic markers of kidney cancer – potential applications in predictive, preventive and personalized medicine / A. Mickley, **O. Kovaleva**, J. Kzhyshkowska, A. Gratchev // EPMA Journal. – 2015. - V.6, №20. – P.1-7.

15. Knizhnik, A. Arf6 promotes cell proliferation via the PLD-mTORC1 and p38MAPK pathways / A. Knizhnik, **O. Kovaleva**, A. Komelkov, L. Trukhanova, V. Rybko, I. Zborovskaya, E. Tchevkina // Journal of Cellular Biochemistry. – 2012. - V.11, №3. – P.360-371.

16. Пат. № 2714685 Российская Федерация, МПК G01 N 33/53. Мышиная гибридома SI-CLP, клон 3D4, - продуцент моноклонального антитела, обладающего специфичностью к белку SI-CLP / **О.В. Ковалева**, Д.В. Самойлова, К.В. Шелехова, С.Н. Курочкин, А.Н. Грачев; заявитель и патентообладатель ООО “Праймбиомед”. – № 2019102897; заявл. 01.02.2019; опубл. 19.02.2020, Бюл. №5.

17. Пат. № 2728228 Российская Федерация, МПК C12 N 5/18. Мышиная гибридома YKL-40, клон 2G8 C10 - продуцент моноклонального антитела, обладающего специфичностью к цитоплазматическим антигенам YKL-39, YKL-40 и SI-CLP человека / **О.В. Ковалева**, Д.В. Самойлова, С.Н. Курочкин, А.Н. Грачев; заявитель и патентообладатель ООО “Праймбиомед”. – № 2019143153; заявл.23.12.2019; опубл. 28.07.2020, Бюл. № 22.