

УДК 575.22:595.773.4

ТРАНСКРИПТОМ КЛЕТОК РАКА ЛЕГКОГО, УСТОЙЧИВЫХ К ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ

© 2022 г. О. В. Ковалева^{1,*}, П. А. Подлесная¹, М. В. Васильева¹,
П. Б. Копнин¹, А. С. Балкин², А. О. Плотников²,
академик РАН Н. Е. Кушлинский¹, профессор РАН А. Н. Грачев¹

Поступило 14.06.2022 г.

После доработки 02.07.2022 г.

Принято к публикации 02.07.2022 г.

Роль иммунной системы в прогрессии опухолей является предметом изучения уже более 100 лет с тех пор, как Пауль Эрлих выдвинул гипотезу, что наличие иммунной системы ограничивает возникновение онкологических заболеваний. Одним из механизмов, сдерживающих инициацию и прогрессию опухоли, является цитотоксическая активность макрофагов, однако, в ряде случаев, ее недостаточно для контроля опухолевого процесса. Это может быть вызвано как развитием устойчивости опухолевых клеток, к противоопухолевой активности макрофагов, так и развитием толерантного фенотипа макрофагов, не обладающих достаточной противоопухолевой активностью. В данной работе впервые были получены и охарактеризованы клетки рака легкого, устойчивые к цитотоксическому действию макрофагов, и выявлены гены, ассоциированные с наблюдаемыми изменениями. Понимание механизмов устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов и особенностями ее проявления в условиях опухолевого окружения критически важно для повышения эффективности существующих методов лечения онкологических заболеваний и разработки перспективных методов иммунотерапии опухолей.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, толерантность, цитотоксичность, макрофаг, RNA-seq

DOI: 10.31857/S268673892205016X

Современные методы лечения злокачественных опухолей часто включают различные подходы к стимуляции противоопухолевой активности иммунной системы. Так, лекарственные препараты на основе моноклональных антител активируют антителозависимый клеточный фагоцитоз. Использование бактериальных продуктов или других стимуляторов классической активации макрофагов активирует антителонезависимую цитотоксичность последних. При этом, несмотря

на успехи данных методов лечения, остается неясным, почему в большом количестве случаев развивается устойчивость опухолей к проводимой терапии. Одним из потенциальных механизмов является приобретение опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагов.

Макрофаги, ассоциированные с опухолью (MAO), считаются основным регулятором противоопухолевого иммунного ответа и, как правило, характеризуются противовоспалительным фенотипом M2 [1]. Продуцируя факторы роста, протеолитические ферменты и белки-ингибиторы иммунных контрольных точек MAO способствуют прогрессии опухоли [2]. Все терапевтические стратегии, мишенями которых являются макрофаги, направлены на репрограммирование данного типа клеток с противовоспалительного на провоспалительный фенотип. Однако данная тактика не нашла применения в терапевтической

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

*e-mail: ovkovaleva@gmail.com

Таблица 1. Дифференциально экспрессирующиеся днкРНК в образцах опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности

Gene ID	Изменение экспрессии	<i>p</i> значение
LINC00639	6.32	0.047
IGFL2-AS1	6.15	4.41E-07
POT1-AS1	2.91	0.001
MBNL1-AS1	2.51	0.010
ZNF710-AS1	2.30	0.026
PSMB8-AS1	2.03	3.27E-05
LINC01291	0.38	0.0004
LINC01508	0.14	0.047

практике ввиду довольно низкой эффективности [3, 4]. Каковы же тогда механизмы взаимодействия опухолевых клеток и цитотоксических макрофагов? В ответ на активность иммунной системы опухолевые клетки приобретают устойчивость к цитотоксичности [5]. Однако клеточные и молекулярные механизмы этого явления на данный момент практически не изучены.

Таким образом, целью данной работы стало выявление генов, потенциально ассоциированных с приобретением опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагов.

В качестве биологической модели использовали клетки немелкоклеточного рака легкого H1975 и их устойчивые производные – H1975(LPS), полученные в результате кокультивирования с цитотоксическими макрофагами, стимулированными липополисахаридом [5].

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Проведение исследования одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России (протокол от 01.12.2021).

Приготовление кДНК библиотек и секвенирование на платформе Illumina HiSeq 2000 выполнялись в соответствии с протоколами Illumina для RNA-seq. Функциональная аннотация генов проводилась с использованием пакета R Homo.sapiens, Team BC (2015) и базы данных Ensembl. Анализ насыщенности метаболических путей проводили для достоверно дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с использованием пакета R fgsea. Функциональная аннотация

дифференциально экспрессирующихся генов была проведена с использованием базы данных кластеров ортологичных групп генов (COG).

На первом этапе исследования проанализировали степень злокачественности полученных клеток, по сравнению с исходными клетками H1975. Для этого провели оценку пролиферации *in vitro* и скорости роста подкожных ксенографтов *in vivo*. Повышенная скорость деления является одной из основополагающих характеристик злокачественных клеток. Анализ динамики роста клеточных линий проводился при помощи прямого подсчета количества клеток в камере Горяева каждые 24 ч. Для оценки скорости роста клеток *in vivo* использовали самок бестимусных мышей линии BALB/c Nude в возрасте 6–8 нед, по 5 животных в каждой группе. Каждому животному подкожно прививалось по 2 опухоли, прививочная доза составляла 5×10^6 клеток. Продолжительность эксперимента составляла 3 нед. Образовавшиеся опухоли использовали для гистологического анализа. Результаты экспериментов представлены на рис. 1.

Производные клеточной линии немелкоклеточного рака легкого, устойчивые к цитотоксической активности, статистически достоверно делаются быстрее контрольной линии – среднее время удвоения составляет 0.6 сут, в то время как для контрольной линии – 1.3 сут. Проведенные эксперименты на животных также показали, что клетки, обладающие устойчивостью к цитотоксической активности макрофагов, характеризуются более высокой скоростью роста подкожных ксенографтов по сравнению с клетками исходной линии. Дополнительно опухоли, образуемые клетками, устойчивыми к цитотоксической активности макрофагов, характеризовались значимо большим размером, большим количеством очагов некроза и повышенной васкуляризацией, что свидетельствует об их более высоком злокачественном потенциале. Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитотоксические макрофаги способствуют отбору более малигнизированных опухолевых клеток, тем самым способствуя опухолевой прогрессии.

На следующем этапе работы проведен анализ транскриптома исследуемых клеточных линий. В результате проведенного анализа обнаружено 283 дифференциально экспрессирующихся гена, с достоверно (\log_2 fold change >1, FDR corrected *p*-value <0.05) изменяющейся экспрессией в образцах H1975 (LPS) по сравнению с контролем. Среди них экспрессия 165 генов увеличивалась в образцах H1975 (LPS) по сравнению с контролем, экспрессия 118 генов снижалась. Результаты транскриптомного анализа были подтверждены для части генов при помощи количественной ОТ-ПЦР. На основе базы данных KEGG с использованием пакета fgsea были выявлены досто-

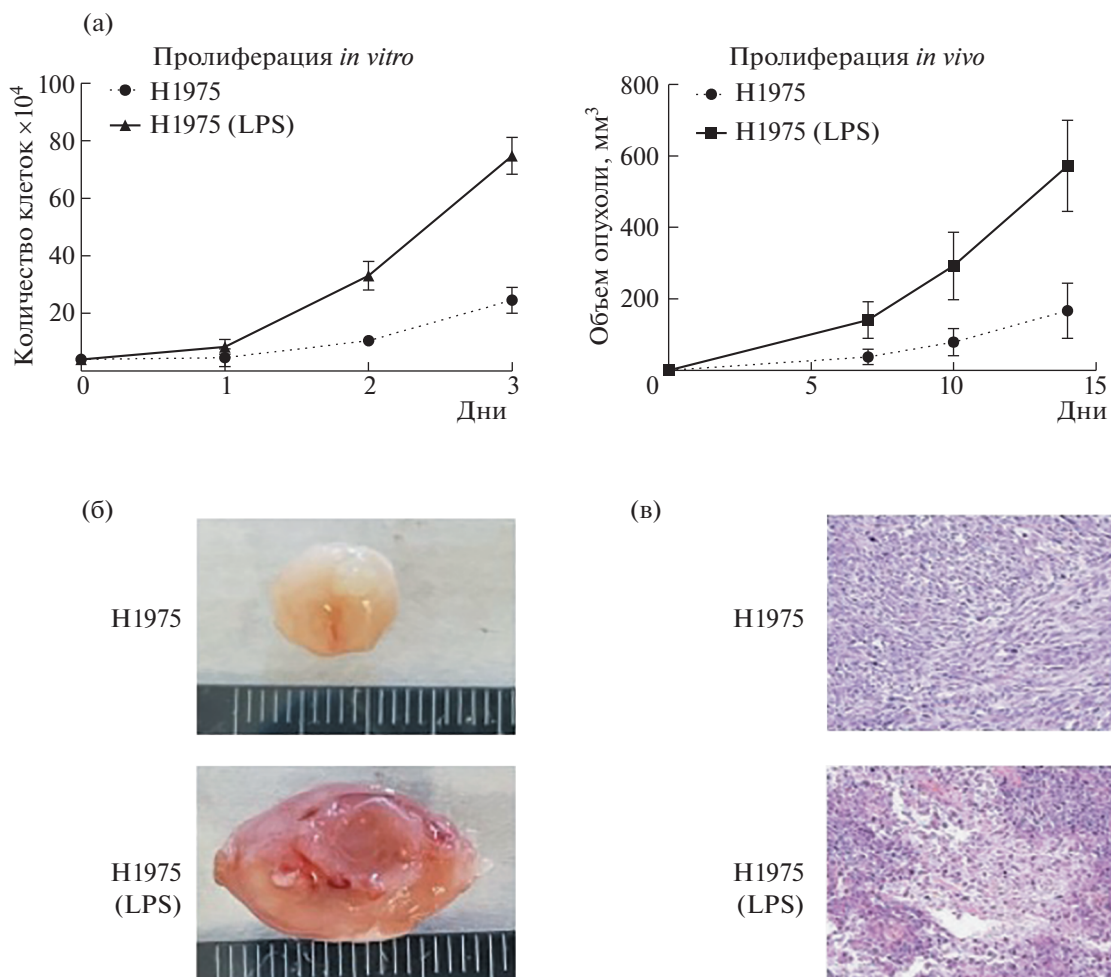


Рис. 1. Исследование пролиферативных характеристик клеточных линий, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов. (а) Динамика роста клеток НМРЛ Н1975 и Н1975(LPS) *in vitro* и *in vivo*, (б) внешний вид подкожных ксенографтов, полученных в результате введения клеток НМРЛ Н1975 и Н1975(LPS) иммунодефицитным мышам BALB/c Nude, (в) гистологическое окрашивание срезов опухолей подкожных ксенографтов гематоксилин-эозином, увеличение 100х.

верно обогащенные сигнальные пути, потенциально вовлеченные в опухолевую прогрессию, например, интегрин-зависимый сигнальный путь и TGF β сигнальный путь (рис. 2).

Помимо анализа дифференциально экспрессирующихся белок-кодирующих 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 (днкРНК). Результаты представлены в табл. 1.

Так как одним из основных изменений клеточных характеристик являлось усиление пролиферативных свойств клеток, для последующего анализа проведен выбор отдельных генов, потенциально вовлеченных в регуляцию пролиферации. Результаты представлены в табл. 2.

Проведенный анализ сравнения метаболических путей между исследуемыми группами позволил идентифицировать сигнальные пути, вовлеченные в регуляцию клеточной пролиферации. К таким сигнальным путям относятся, в частности, интегрин-зависимые сигнальные пути. Известно, что в процессе клеточной адгезии после взаимодействия интегринов со своими лигандами, в основном белками внеклеточного матрикса, к этому комплексу привлекаются различные сигнальные молекулы, в частности нерецепторная тирозинкиназа FAK, которая в результате последовательных фосфорилирований может играть существенную роль в активации Ras-зависимых сигнальных путей, что, в конечном итоге, приводит к активации ERK1/2 и усилению подвижности клеток [6]. Обратив внимание на усиление экспрессии интегринов, выдвинуто предположе-

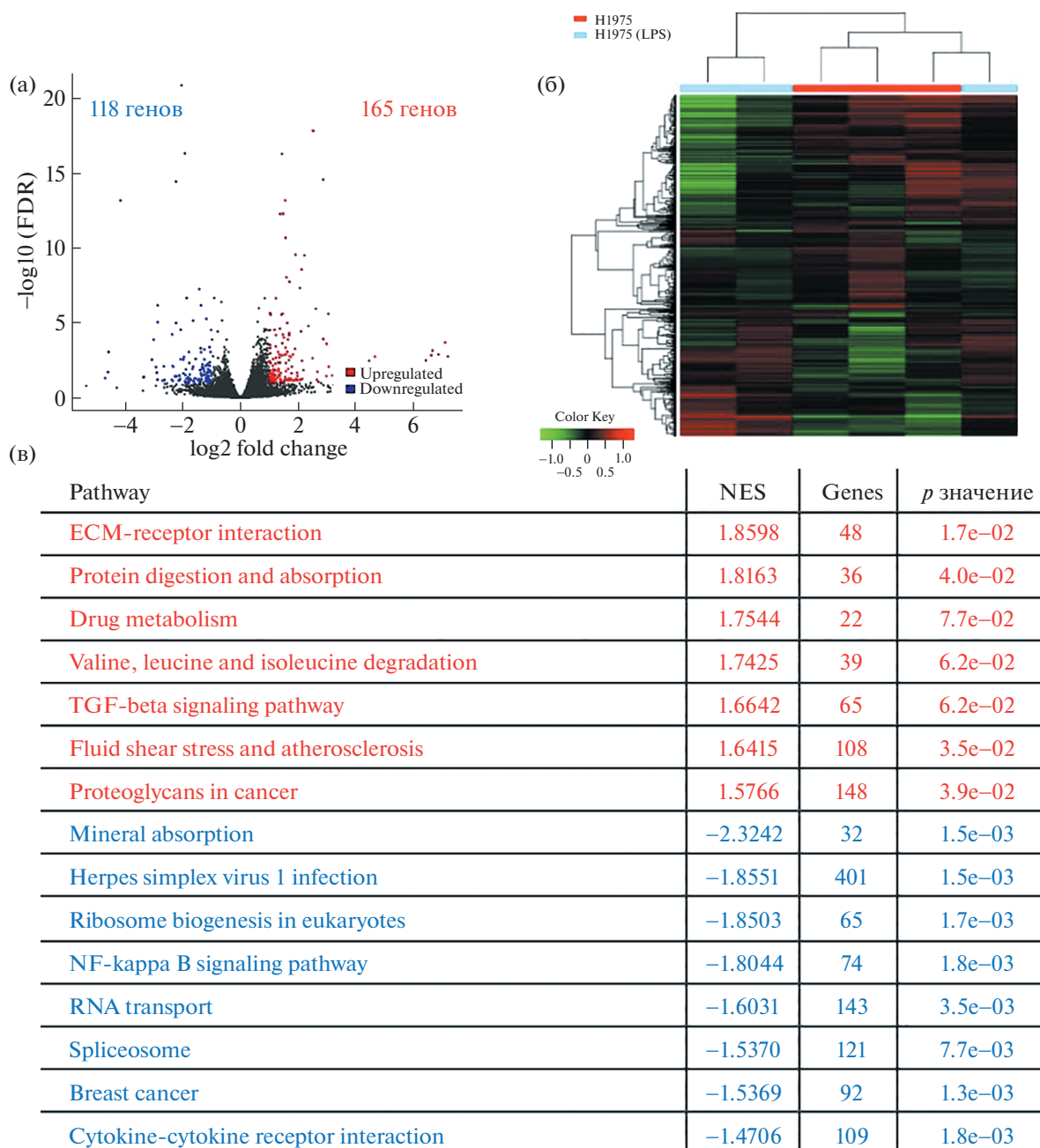


Рис. 2. Транскриптомный анализ клеток НМРЛ, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов. (а) Диаграмма рассеяния (Volcano plot), отображающая дифференциальную экспрессию генов; (б) Тепловая карта (Heatmap) дифференциально экспрессирующихся генов; (в) анализ насыщенности метаболических путей на основе базы данных KEGG.

ние, что возможными кандидатами на роль “активаторов” пролиферации могут служить МАР-киназы. Например, в литературе описаны механизмы активации пролиферации посредством p38 за счет активации с-Мус и последующей инициации митотических циклов с понижением потребности клетки во внешних митогенных сигналах [7]. Также стоит отметить, что при прогрессии

опухолей p38 часто ассоциирована с инвазивностью и химиорезистентностью различных солидных новообразований, а также со снижением безрецидивной выживаемости пациентов [8, 9].

Сигнальные пути, активируемые цитокином TGF-β, также регулируют различные биологические процессы, например деление клеток, их миграцию и дифференцировку, причем его эффек-

Таблица 2. Дифференциально экспрессирующиеся гены в образцах опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности, потенциально участвующие в регуляции пролиферации

Gene ID	Изменение экспрессии	<i>p</i> значение	Название
SDC2	8.40	0.005	syndecan 2
MAP2	7.36	7.16E-16	microtubule associated protein 2
TLR2	5.13	6.29E-06	toll like receptor 2
CHI3L1	4.20	1.73E-08	chitinase 3 like 1
TNFSF10	3.56	0.0006	TNF superfamily member 10
COL4A6	2.62	0.047	collagen type VIII alpha 1 chain
ITGA1	3.10	0.0005	integrin subunit alpha 1
OPG	3.01	0.011	TNF receptor superfamily member 11b
PLCD4	2.95	0.030	phospholipase C delta 4
PLAT	2.73	1.63E-16	plasminogen activator. tissue type
COL4A6	2.62	0.047	collagen type IV alpha 6 chain
CAVIN2	2.60	1.75E-12	caveolae associated protein 2
TGFB1	2.28	2.21E-05	transforming growth factor beta 1
DUSP1	0.49	0.013	dual specificity phosphatase 1
TP63	0.42	0.013	tumor protein p63
WNT10B	0.41	0.023	Wnt family member 10B
RRAGD	0.34	0.002	Ras related GTP binding D
NKD2	0.26	0.001	NKD inhibitor of WNT signaling pathway 2
SCIN	0.14	2.62E-06	scinderin
PLCB1	0.13	0.007	phospholipase C beta 1

ты варьируют в зависимости от типа клеток-мишеней и их микроокружения. Одним из основных механизмов действия TGF- β является взаимодействие с белками Smad, приводящее к регуляции множества генов. С другой стороны, TGF- β может активировать функцию MAP-киназ, в частности p38, через Smad-независимые механизмы. Также необходимо отметить, что по результатам транскриптомного секвенирования было выявлено повышение экспрессии остеопротегерина (OPG), являющегося представителем 11b суперсемейства рецепторов TNF (TNFRSF11B). Данный рецептор представляет собой растворимый белок, основная функция которого – ингибирование TRAIL – индуцированного апоптоза. Для различных солидных опухолей показана ассоциация содержания OPG с агрессивностью опухолей [10–13]. Показано, что секреция OPG опосредована активацией двух сигнальных каскадов, а именно p38 и ERK1/2, которые, в свою очередь, активируются в ответ на

влияние цитокина IL-1 β , производимого макрофагами [14], что согласуется с полученными результатами.

Стоит отметить, что в изучаемых клетках, обладающих устойчивостью к цитотоксической активности, наблюдалось снижение экспрессии фосфатазы DUSP1, что также может объяснять повышение пролиферативных свойств клеток посредством активации киназы p38. Наблюдаемое нами снижение экспрессии некоторых других генов, например NKD2, также может объяснять усиление пролиферации клеток посредством других механизмов, таких как Wnt-сигнальный путь [15].

В данной работе также выявлены изменения в экспрессии длинных некодирующих РНК. Так, длинные некодирующие РНК (lncRNA) IGFL2-AS1 и POT1-AS1 участвуют в развитии и метастазировании рака желудка [16–18]. Помимо этого, для IGFL2-AS1 показано, что она принимает непосредственное участие в формировании проли-

феративного фенотипа клеток колоректального рака. Для длинной некодирующей РНК MBNL1-AS1 показано, что она играет важную роль в развитии рака мочевого пузыря [19]. Также стоит обратить внимание, что экспрессия двух некодирующих РНК LINC01291 и LINC01508 снижалась в исследуемых образцах по сравнению с контролем. Известно, что экспрессия LINC01508 снижена в цисплатин-резистентных клетках рака яичников. Оверэкспрессия LINC01508 повышает чувствительность клеток РЯ к цисплатину *in vitro* и *in vivo*, но является маркером плохого прогноза. Повышенный уровень LINC01508 может подавлять устойчивость клеток к цисплатину посредством ингибирования Hippo-YAP сигнального пути [20].

Таким образом, транскриптомный анализ позволил впервые выявить в клетках рака легкого, устойчивых к цитотоксическому действию макрофагов, изменение регуляции ряда ключевых сигнальных путей, каждый из которых может вносить свой вклад в ростовые характеристики опухолевых клеток. На основании полученных данных были выявлены гены-мишени, отвечающие за приобретение опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксическому действию макрофагов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00291.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu S., Luo Z., Li X., et al. Tumor-associated macrophages: role in tumorigenesis and immunotherapy implications // *J Cancer*. 2021. V. 12. № 1. P. 54–64.
2. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes // *Trends Immunol*. 2002. V. 23. № 11. P. 549–55.
3. Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease // *Nature*. 2013. V. 496. № 7446. P. 445–55.
4. Kowal J., Kornete M., Joyce J.A. Re-education of macrophages as a therapeutic strategy in cancer // *Immunotherapy*. 2019. V. 11. № 8. P. 677–89.
5. Подлесная П.А., Ковалева О.В., Самойлова Д.В. и др. Механизмы отбора опухолевых клеток под воздействием цитотоксической активности макрофагов // *Злокачественные опухоли*. 2019. V. 9s1. № P. 134.
6. Playford M.P., Schaller M.D. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology // *Oncogene*. 2004. V. 23. № 48. P. 7928–46.
7. Chen S., Qiong Y., Gardner D.G. A role for p38 mitogen-activated protein kinase and c-myc in endothelin-dependent rat aortic smooth muscle cell proliferation // *Hypertension*. 2006. V. 47. № 2. P. 252–8.
8. Donnelly S.M., Paplomata E., Peake B.M., et al. P38 MAPK contributes to resistance and invasiveness of HER2-overexpressing breast cancer // *Curr Med Chem*. 2014. V. 21. № 4. P. 501–10.
9. Esteva F.J., Sahin A.A., Smith T.L., et al. Prognostic significance of phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase and HER-2 expression in lymph node-positive breast carcinoma // *Cancer*. 2004. V. 100. № 3. P. 499–506.
10. Li X., Liu Y., Wu B., et al. Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis // *Oncology reports*. 2014. V. 32. № 6. P. 2605–11.
11. Tsukamoto S., Ishikawa T., Iida S., et al. Clinical significance of osteoprotegerin expression in human colorectal cancer // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011. V. 17. № 8. P. 2444–50.
12. Ito R., Nakayama H., Yoshida K., et al. Expression of osteoprotegerin correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric carcinoma // *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2003. V. 443. № 2. P. 146–51.
13. Russmueller G., Moser D., Wurger T., et al. Upregulation of osteoprotegerin expression correlates with bone invasion and predicts poor clinical outcome in oral cancer // *Oral Oncol*. 2015. V. 51. № 3. P. 247–53.
14. Chung S.T., Geerts D., Roseman K., et al. Osteoprotegerin mediates tumor-promoting effects of Interleukin-1beta in breast cancer cells // *Molecular cancer*. 2017. V. 16. № 1. P. 27.
15. Zhao S., Kurenbekova L., Gao Y., et al. NKD2, a negative regulator of Wnt signaling, suppresses tumor growth and metastasis in osteosarcoma // *Oncogene*. 2015. V. 34. № 39. P. 5069–79.
16. Ma Y., Liu Y., Pu Y.S., et al. LncRNA IGFL2-AS1 functions as a ceRNA in regulating ARPP19 through competitive binding to miR-802 in gastric cancer // *Molecular carcinogenesis*. 2020. V. 59. № 3. P. 311–22.
17. Wright C.M., Kirschner M.B., Cheng Y.Y., et al. Long non coding RNAs (lncRNAs) are dysregulated in Malignant Pleural Mesothelioma (MPM) // *PloS one*. 2013. V. 8. № 8. P. e70940.
18. Chen W.M., Chen Y.M., Jiang S.Y., et al. LncRNA POT1-AS1 accelerates the progression of gastric cancer by serving as a competing endogenous RNA of microRNA-497-5p to increase PDK3 expression // *Journal of gastrointestinal oncology*. 2021. V. 12. № 6. P. 2728–42.
19. Wei X., Yang X., Wang B., et al. LncRNA MBNL1-AS1 represses cell proliferation and enhances cell apoptosis via targeting miR-135a-5p/PHLPP2/FOXO1 axis in bladder cancer // *Cancer medicine*. 2020. V. 9. № 2. P. 724–36.
20. Xiao L., Shi X.Y., Li Z.L., et al. Downregulation of LINC01508 contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer via the regulation of the Hippo-YAP pathway // *J Gynecol Oncol*. 2021. V. 32. № 5. P. e77.

TRANSCRIPTOME OF LUNG CANCER CELLS RESISTANT TO THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF MACROPHAGES

**O. V. Kovaleva^{a,#}, P. A. Podlesnaya^a, M. V. Vasileva^a, P. B. Kopnin^a, A. S. Balkin^b, A. O. Plotnikov^b,
Academician of the RAS N. E. Kushlinskii^a, and Professor of the RAS A. N. Gratchev^a**

^a *N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation*

^b *Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation*

[#]*e-mail: ovkovaeva@gmail.com*

The role of the immune system in tumor progression has been the subject of research for more than 100 years since Paul Ehrlich hypothesized that the presence of the immune system limits the occurrence of cancer. One of the mechanisms hindering the initiation and progression of the tumor is the cytotoxic activity of macrophages, however, in some cases, it is not enough to control the tumor process. This can be caused both by the development of resistance of tumor cells to the antitumor activity of macrophages, and the development of a tolerant phenotype of macrophages that do not have sufficient antitumor activity. In this work, for the first time, lung cancer cells resistant to the cytotoxic action of macrophages were obtained and characterized, and genes associated with the observed changes were identified. Understanding the mechanisms of resistance of tumor cells to the cytotoxic activity of macrophages and the peculiarities of its manifestation in a tumor environment is critically important for improving the effectiveness of existing methods of cancer treatment and developing novel methods for tumor immunotherapy.

Keywords: non-small cell lung cancer, tolerance, cytotoxicity, macrophage, RNA-seq