

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-79-89>

CC BY 4.0

# Фенотипические и транскриптомные особенности моноцитов периферической крови в динамике неоадьювантной химиотерапии больных раком молочной железы

М.Р. Патышева<sup>1,2</sup>, М.Н. Стахеева<sup>1</sup>, Е.С. Григорьева<sup>1</sup>, П.С. Ямщиков<sup>1,2</sup>, И.В. Ларионова<sup>1,2</sup>, А.А. Будницкая<sup>2</sup>, Н.А. Тарабановская<sup>1</sup>, Н.В. Чердынцева<sup>1,2</sup>, Ю.Г. Кжышковска<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный, 5;

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»; Россия, 634050 Томск, проспект Ленина, 36

**Контакты:** Марина Ринатовна Патышева [patysheva\\_mr@onco.tnmc.ru](mailto:patysheva_mr@onco.tnmc.ru)

**Введение.** Химиотерапия включена в большинство схем лечения рака молочной железы. Действие химиотерапевтических препаратов оказывает влияние на моноциты крови, которые являются одними из важнейших участников патогенеза онкологических заболеваний. Однако в настоящий момент не установлено, могут ли изменения моноцитов, индуцированные проведением химиотерапии, поддерживать эффект противоопухолевого лечения или, напротив, снижать его.

**Цель исследования** – охарактеризовать изменения фенотипического и транскриптомного профилей моноцитов больных раком молочной железы до и после химиотерапевтического лечения.

**Материалы и методы.** В группе, состоящей из 50 больных раком молочной железы, оценена популяционная структура моноцитов на основании экспрессии рецепторов CD14, CD16, CD163 и HLA-DR с помощью проточной цитометрии. У 9 пациенток проанализирован транскриптомный профиль CD14<sup>+</sup>-моноцитов с применением массового параллельного РНК-секвенирования. Все исследования выполнялись до и после проведения 4 курсов неоадьювантной химиотерапии.

**Результаты.** В группе больных раком молочной железы неоадьювантная химиотерапия приводила к снижению содержания CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов. На фоне цитостатического лечения в моноцитах пациентов отмечены повышение экспрессии генов *MGLL*, *NR4A2*, *UCK1*, *YOD1*, *ABCA2*, *PAPSS2*, *ATP10* ( $\log_2\text{FoldChange} \geq 0,8$ ; ожидаемая доля ложных отклонений (false discovery rate, FDR)  $\leq 0,01$ ) и снижение экспрессии генов *KPNA2*, *ERCC4*, *JAGN1*, *RUBCNL*, *SMYD4*, *B3GALT4* ( $\log_2\text{FoldChange} \geq 0,8$ ; FDR  $\leq 0,01$ ). После проведения терапии наблюдалось повышение активности сигнальных путей, связанных с липидным обменом и внутриклеточным транспортом везикул из эндоплазматического ретикулума, на фоне снижения ответа на воздействие интерферонов  $\gamma$  и  $\alpha$ , и чужеродных молекул (экзогенных нуклеиновых кислот, вирусов и бактерий). С помощью дискриминантного анализа установлено, что относительное количество CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> и CD14<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов в крови имеет ценность для предсказания ответа на неоадьювантную химиотерапию у больных раком молочной железы.

**Заключение.** Таким образом, выявлена связь параметров моноцитов крови с проведением химиотерапевтического лечения при раке молочной железы.

**Ключевые слова:** моноциты, рак молочной железы, РНК-секвенирование, транскриптом, химиотерапия, HLA-DR

**Для цитирования:** Патышева М.Р., Стахеева М.Н., Григорьева Е.С. и др. Фенотипические и транскриптомные особенности моноцитов периферической крови в динамике неоадьювантной химиотерапии больных раком молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):79–89. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-79-89>

## Immune-phenotyping and transcriptomic profiling of blood monocytes from patients with breast cancer under neoadjuvant chemotherapy

M.R. Patysheva<sup>1,2</sup>, M.N. Stakheyeva<sup>1</sup>, E.S. Grigoryeva<sup>1</sup>, P.S. Iamshchikov<sup>1,2</sup>, I.V. Larionova<sup>1,2</sup>, A.A. Budnickaya<sup>2</sup>, N.A. Tarabanovskaya<sup>1</sup>, N.V. Cherdyntseva<sup>1,2</sup>, J.G. Kzhyshkowska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Kooperativny Line, Tomsk 634009, Russia;

<sup>2</sup>National Research Tomsk State University; 36 Lenin Prospekt, Tomsk 634050, Russia

**Contacts:** Marina Rinatovna Patysheva patysheva\_mr@onco.tnmc.ru

**Introduction.** Chemotherapy is a common treatment for breast cancer. Chemotherapeutic drugs effect blood monocytes, which are major contributors to cancer pathogenesis. However, to date, pro-tumor or anti-tumor programming by chemotherapy of monocytes is controversial.

**Aim.** To characterize changes in phenotypic and transcriptomic profiles of monocytes of breast cancer patients before and after chemotherapeutic treatment.

**Materials and methods.** In a cohort of 50 breast cancer patients, monocyte populations were identified based on their expression of CD14, CD16, CD163, and HLA-DR evaluated by flow cytometry before and after neoadjuvant chemotherapy. Bulk RNA sequencing was adopted to explore the transcriptomic profile of CD14<sup>+</sup> monocytes before and after treatment. After treatment, we observed an increase in the activity of signaling pathways related to lipid metabolism and intracellular transport of vesicles from the endoplasmic reticulum, against the background of a decreased response to exposure to interferon  $\gamma$  and interferon  $\alpha$ , and foreign molecules (exogenous nucleic acids, viruses and bacteria).

**Results.** In breast cancer patients, neoadjuvant chemotherapy decreased in CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> monocytes. Under cytostatic treatment, increased gene expression of *MGLL*, *NR4A2*, *UCK1*, *YOD1*, *ABCA2*, *PAPSS2*, *ATP10* ( $\log_2\text{FoldChange} \geq 0.8$ ; false discovery rate (FDR)  $\leq 0.01$ ) and decreased gene expression of *KPNA2*, *ERCC4*, *JAGN1*, *RUBCNL*, *SMYD4*, *B3GALT4* ( $\log_2\text{FoldChange} \geq 0.8$ ; FDR  $\leq 0.01$ ) were observed in monocytes of patients. Using discriminant analysis, the relative numbers of CD14<sup>+</sup>16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>16<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> and CD14<sup>-</sup>16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> monocytes in the blood were found to be valuable in predicting response to neoadjuvant chemotherapy.

**Conclusion.** Thus, association of blood monocytes with chemotherapeutic treatment in breast cancer was revealed.

**Keywords:** monocytes, breast cancer, RNA-seq, transcriptome, chemotherapy, HLA-DR

**For citation:** Patysheva M.R., Stakheyeva M.N., Grigoryeva E.S. et al. Immune-phenotyping and transcriptomic profiling of blood monocytes from patients with breast cancer under neoadjuvant chemotherapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):79–89. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-79-89>

## ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) является ведущей патологией в России и составляет более 20 % всех злокачественных нозологий у женщин [1]. В структуре смертности женского населения РМЖ находится на 1-м месте среди онкологических заболеваний репродуктивной системы [1]. Подобные показатели напрямую связаны как с проблемами ранней диагностики заболевания, так и с недостаточной эффективностью лечения. Так, применение предоперационной неoadъювантной терапии (НАХТ) при безметастатических формах РМЖ приводит к достижению полной морфологической регрессии опухоли только в 17,8 % случаев [2]. В настоящее время необходимо дальнейшее изучение патогенеза данной патологии для решения проблемы ранней диагностики и увеличения эффективности лечения.

Способность клеток моноцитарно-макрофагального ряда поддерживать рост опухоли является значимым фактором патогенеза РМЖ [3–6]. Моноциты составляют 5–10 % лейкоцитов крови и представляют собой клетки неспецифического иммунитета. Популяция моноцитов включает в себя несколько подтипов [7, 8]. Повышенное содержание отдельных субпопуляций моноцитов, таких как CD14<sup>+</sup>163<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup>204<sup>+</sup>, или определенные сигнатуры генов, экспрессированных в моноцитах, связывают с наличием РМЖ [6, 9, 10]. Известно, что увеличение от-

ношения абсолютного числа лимфоцитов к абсолютному числу моноцитов в крови ассоциировано с эффективностью НАХТ, а повышенный уровень Tie2<sup>+</sup>-моноцитов негативно коррелирует с показателями безрецидивной выживаемости [10–12]. В то же время моноциты крови связаны с опухолеассоциированными макрофагами (ОАМ), поскольку представляют собой ресурс для пополнения их пула [3, 11].

Неoadъювантная терапия — обязательный этап лечения ряда молекулярных подтипов РМЖ. Цитостатическое лечение сопровождается выраженным влиянием не только на опухолевые клетки, но и на клетки других тканей, в том числе клетки иммунной системы [12, 13]. Известно, что химиотерапия может стимулировать противоопухолевый иммунитет, тем самым увеличивая частоту случаев полного патологического ответа на лечение [12]. Однако иммунные клетки, к которым относятся опухолевые макрофаги и моноциты, могут блокировать или нивелировать эффект химиотерапевтического лечения [5, 14]. При этом остаются невыясненными вопросы, как цитостатическое лечение влияет на программирование циркулирующих моноцитов и могут ли моноциты как предшественники ОАМ изменять их популяционное представительство в опухоли. В последнее десятилетие вопрос о вовлечении клеток иммунной системы в реализацию терапевтических эффектов цитостатического лечения активно обсужда-

ется [12, 15]. Изучение функционального профиля моноцитов при РМЖ в условиях химиотерапии представляется актуальным для клинической онкологии [12, 16].

**Цель исследования** — охарактеризовать изменение фенотипического и транскриптомного профилей моноцитов больных РМЖ до и после химиотерапевтического лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Пациенты.** В исследование включены 50 больных РМЖ Т1–3N0–3M0 I–III стадии с инвазивной карциномой неспецифического типа (табл. 1). Средний возраст больных составил 52 года (46–63 года). Исследование проводили в двух точках: до НАХТ и после 4 курсов НАХТ по схеме АС (доксорубин и циклофосфамид). Эффективность терапии после 4 курсов оценивали согласно критериям Всемирной организации здравоохранения. Регистрировали полную регрессию (100 % редукция опухоли), частичную регрессию (уменьшение объема опухоли более чем на 50 %), стабилизацию (уменьшение объема опухоли на 25–50 %) и прогрессирование процесса (увеличение объема опухоли более чем на 25 %). В соответствии с международными рекомендациями пациенты со стабилизацией и прогрессированием составили группу плохого ответа на химиотерапию (не ответивших на НАХТ), а пациенты с полной и частичной регрессией — группу объективного ответа.

**Фенотипирование моноцитов периферической крови.** Проведена оценка уровней CD14<sup>+</sup>-, CD16<sup>+</sup>-, CD163<sup>+</sup>- и HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов в крови больных. Венозная кровь взята в вакуумные системы сбора крови, стабилизированные К3-ЭДТА. Кровь (100 мкл) окрашивали набором меченных моноклональных антител против маркеров CD45, CD14, CD16, CD163 и HLA-DR (табл. 2). Для блокирования неспецифического связывания применяли Human TruStain FcX™ (Biolegend, США). В контрольный образец добавляли соответствующий изотипический контроль в аналогичной концентрации. Все образцы анализировали на проточном цитометре NovoCyte (ACEA Bioscience, США). Тактика гейтирования представлена на рис. 1. Обработку полученных данных проводили с помощью программного пакета NovoExpress SoftWare (Acea, США).

**Массовое параллельное РНК-секвенирование и биоинформатический анализ данных.** В исследование вошли 9 пациенток с РМЖ до и после НАХТ. Для анализа транскриптома моноцитов использовали 18 мл крови, забранной в вакуумные системы с К3-ЭДТА. Предварительно на градиенте плотности раствора фиколла-урографина (1,077 г/см<sup>3</sup>) из крови получена фракция мононуклеарных клеток, а далее с помощью проточной цитометрической сортировки — CD14<sup>+</sup>-моноциты. Использовалась панель конъюгированных моноклональных антител против маркеров CD45, CD56, CD14 и 7-AAD (см. табл. 2). Сортировка образцов

проводилась на клеточном сортере MoFlo XDP (Beckman Coulter, США).

Сортировку моноцитов выполняли в режиме Purify 1–2; эффективность сортировки в данном режиме составляла 70 %, а чистота целевой популяции — 98–99 %. Далее из полученного лизата клеток не более чем через 60 мин выделяли тотальную РНК с использованием набора RNAeasy mini kit plus (Qiagen, Германия). Качество полученной РНК оценивали с помощью станции автоматического капиллярного электрофореза TapeStation 4150 (Agilent Technology, США). Показатель

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика больных раком молочной железы (n = 50)  
Table 1. Clinical characteristics of patients with breast cancer in this study (n = 50)

Показатель Parameter	Число пациентов, абс. (%) Number of patients, abs. (%)
Состояние менструальной функции: Menses:	
сохранена saved	24 (48,2)
пременопауза + перименопаза premenopausal + perimenopause	26 (51,8)
постменопауза postmenopausal	—
Стадия: Stage:	
I	7 (14,0)
II	23 (46)
III	20 (40)
Молекулярно-биологический подтип: Molecular subtype:	
люминальный B luminal B	25 (50,0)
трижды негативный подтип triple-negative	19 (38,0)
HER2-положительный HER2-positive	6 (12,0)
Лимфогенное метастазирование: Lymph node metastases:	
есть yes	22 (46,5)
нет no	28 (53,5)
Эффект неoadъювантной химиотерапии: Neoadjuvant chemotherapy clinical response:	
полная + частичная регрессия complete response + partial response	34 (68,0)
стабилизация stable disease	8 (16,0)
прогрессирование progression disease	8 (16,0)

**Примечание.** HER2 — рецептор эпидермального фактора роста человека 2.  
*Note.* HER2 — human epidermal growth factor receptor-2.

Таблица 2. Антитела и изотипические контроли, применяемые для фенотипирования моноцитов

Table 2. Antibodies and isotype controls

Антитела, красители Antibodies, dyes	Клон Clone	Изотип Isotype	Производитель Manufacturer
CD45-APC-Cy7	2D1	Mouse IgG1, κ	BD Bioscience, США BD Bioscience, USA
CD14-FITC	M5E2	Mouse IgG2a, κ	
CD16-APC	3G8	Mouse IgG1, κ	
CD163-PE	GHI/61	Mouse IgG1, κ	
HLA-DR-PE-Cy5	G46-6	Mouse IgG2a, κ	
Isotype PE-Cy <sup>TM</sup> 5	G155-178	Mouse IgG2a, κ	
7-AAD	—	—	
CD56-PE-Cy7	CMSSB	Mouse IgG1, κ	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, США eBioscience, Thermo Fisher Scientific, USA
Isotype PE	P3.6.2.8.1	Mouse IgG1, κ	

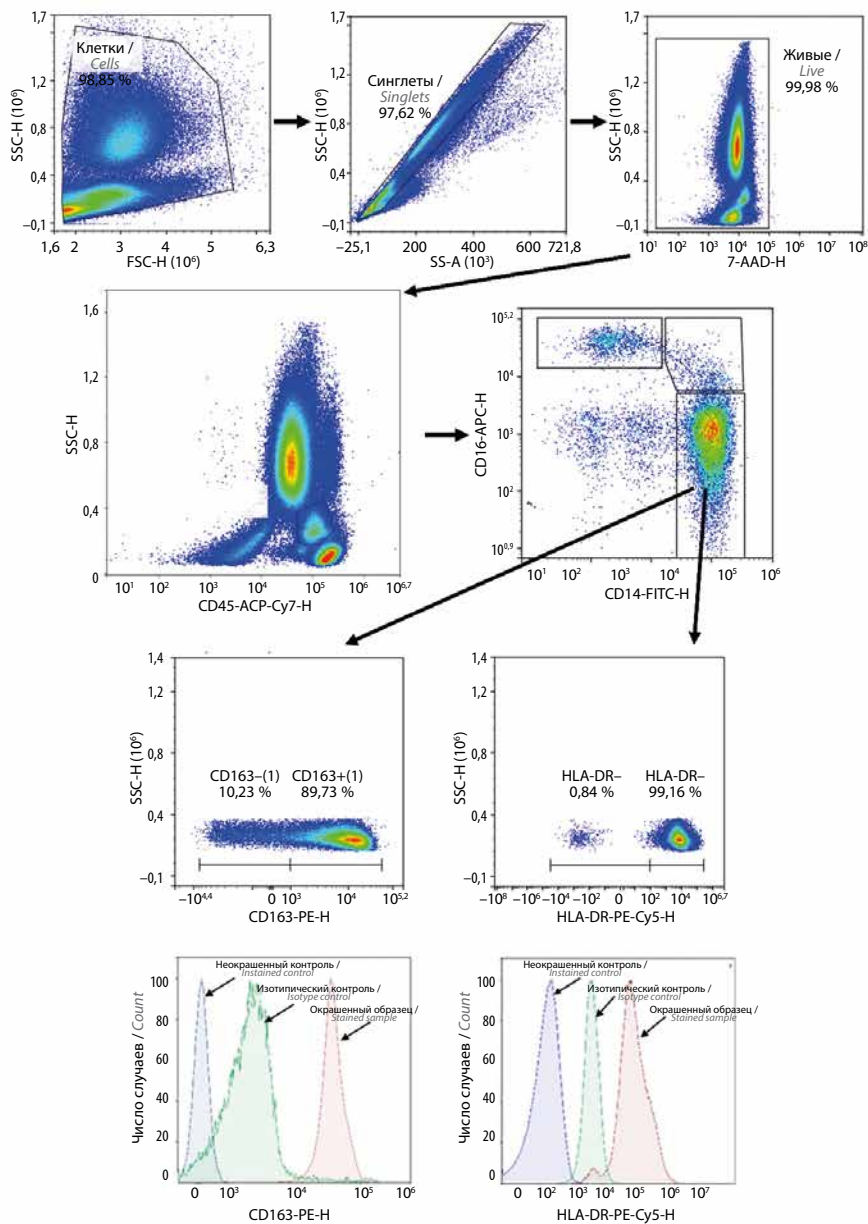
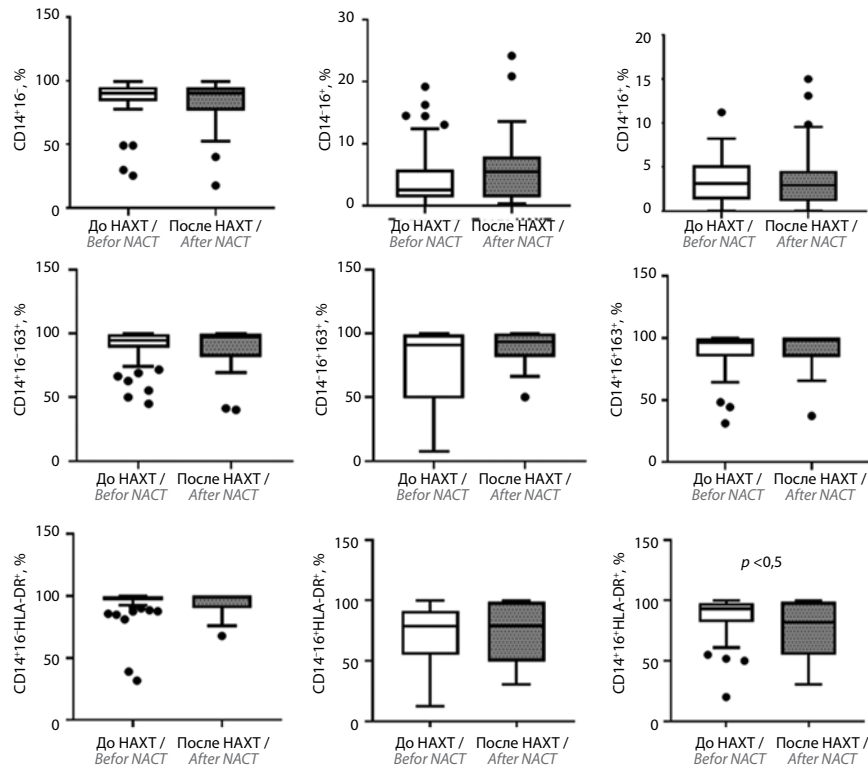


Рис. 1. Тактика гейтирования для идентификации фенотипа моноцитов крови

Fig. 1. Flow cytometry gating strategy for the identification of human monocytes



**Рис. 2.** Субпопуляционный состав моноцитов у больных раком молочной железы до и после 4 курсов неoadъювантной химиотерапии (НАХТ)  
**Fig. 2.** Circulating monocytes subsets in breast cancer patient before and after neoadjuvant chemotherapy (NACT)

целостности РНК (RIN) составил 8,5–9,9. Пробы тотальной РНК хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Полнотранскриптомный профиль моноцитов определен с помощью массового параллельного секвенирования. Библиотеки для него готовили с использованием набора NEXTE flex Rapid Directional qRNA-SeqKit и одноконцевых индексов NEXTEflex-qRNA-8nt-Barcodes (Perkin Elmer, США) по стандартному протоколу. Избавление от рибосомальной РНК осуществлялось с помощью набора NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (New England Biolabs, США). Из подготовленных библиотек формировали общий эквимольный пул и проводили секвенирование на платформе NextSeq500 (Illumina, США) с набором реактивов для одноконцевого чтения 1x75 (single read); осуществляли 50 циклов. На каждую библиотеку в среднем приходилось около 5 млн ридов.

**Методы статистической и биоинформатической обработки данных.** Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 8.0 for Windows (StatSoft Inc., США). Для проверки законов распределения исследуемых переменных на нормальность использовали критерий Колмогорова–Смирнова. После проверки все полученные числовые данные были представлены в виде медианы (LQu–UQu). Для определения статистически значимых различий в зависи-

мых группах использовали критерий Уилкоксона. Для построения математической модели применяли методы дискриминантного анализа и нелинейной логистической регрессии. Результаты проточной цитометрии представлены с помощью программы GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software Inc., США). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Картирование ридов на геном проводили с помощью программы STAR 2.5 [17]; в качестве референса использовали геномную сборку GRCh38 и аннотации GENCODE.R34. После картирования получали данные о количестве картирующихся ридов на индивидуальные гены с использованием программы QoRTs [18]. Затем с помощью программного пакета DESeq2, входящего в состав среды R, оценивали дифференциальную экспрессию генов в контрольных и экспериментальных группах. Для обогащения по биохимическим и регуляторным путям с использованием списков генов, ранжированных по уровню экспрессии log2FoldChange и  $p$ -value, применяли программы fgsea (<https://github.com/ctlab/fgsea>) и Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), а для эксперимента — базы данных Hallmark gene sets, Reactome и GO. Данные визуализировали с помощью программ FGSEA, Enricher и Phantasus (<https://genome.ifmo.ru/phantasus>), а также средствами среды R.



## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Изменение субпопуляционного состава и транскриптомного профиля моноцитов до и после неоадьювантной химиотерапии.** Проведено исследование фенотипа моноцитов крови до и после проведения 4 курсов НАХТ. Эта терапия не влияла на состав основных популяций моноцитов и экспрессию на них рецептора CD163 (рис. 2). Экспрессия HLA-DR на моноцитах CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>-классической и CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>-неклассической популяций также сохранялась на прежнем уровне после НАХТ. Однако количество CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> менялось после проведения химиотерапевтического лечения и составило до НАХТ 94 % (84,51–98,44 %), после нее – 84 % (62,61–98,87 %) ( $p = 0,04$ ) (см. рис. 2).

Транскриптомный профиль моноцитов проанализирован у 9 больных РМЖ до и после НАХТ с помощью метода главных компонент: различий до и после НАХТ выявлено не было (рис. 3а). Однако сравнение показателей каждого пациента показало индивидуальные различия в изменении транскриптомного профиля моноцитов после лечения (см. рис. 3а), а сравнение с помощью кластерного анализа – различия в этом профиле до и после химиотерапии (рис. 3б).

Анализ дифференциальной экспрессии отдельных генов позволил получить генную сигнатуру, характерную для моноцитов больных после проведения НАХТ (рис. 3в). Неоадьювантная химиотерапия инициировала повышение экспрессии в моноцитах 152 генов при  $\log_2\text{FoldChange} > 0,75$  и  $p\text{-value} < 0,001$ ; наиболее выраженными среди которых были гены гемоглобина бета (*HBB*), моноацилглицерол липазы (*MGLL*), транскрипционного фактора (*NR4A2*), уридин-цитидин киназы (*UCK1*), деубиквитиназы (*YOD2*), белка-транспортера (*ABCA2*), 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат синтазы 2 (*PAPSS2*), транспортера аденозинтрифосфата (АТФ) (*ATP10A*) и компонент комплекса ГТФазы (*SEPTIN1*). Снижение экспрессии отмечено для 89 генов с  $\log_2\text{FoldChange} > 0,75$  и  $p\text{-value} < 0,001$ , среди которых наиболее выражены гены регулятора нуклеоплазматического транспорта кариоферина  $\alpha 2$  (*KPNA2*), субъединицы эндонуклеазы (*ERCC4*), трансмембранного компонента эндоплазматического ретикулума (*JAGN1*), компонента аутофагосом (*RUBCNL*), катализатора метилирования гистонов (*SMYD4*) и галактозилтрансферазы (*B3GALT4*) (рис. 3в, г).

После проведения НАХТ в моноцитах активируются процессы, связанные с модификацией тубулина, ретроградная транспортировка липидов из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи с активацией каскада Rho ГТФазы, а также процессы формирования агрегосом (рис. 4) [19]. При этом подавляются процессы, ассоциированные с ответом на чужеродные молекулы и сигнальными путями интерферонов  $\gamma$  и  $\alpha$  (см. рис. 4).

**Предсказание эффективности неоадьювантной химиотерапии при раке молочной железы с учетом особенностей субпопуляций моноцитов.** Результаты, полученные с помощью метода нелинейной логистической регрессии, позволили нам разработать математическую модель прогноза для предсказания плохого ответа на НАХТ у больных РМЖ. При построении модели были использованы данные о популяционной структуре моноцитов у пациенток до лечения. Расчет вероятности ответа на НАХТ у больных РМЖ выполнялся по следующей формуле:

$$Y = 100,67 - 0,3X_1 - 0,08X_2 + 0,185X_3 + 0,259X_4 - 0,007X_5 + 0,503X_6,$$

где  $Y$  – функция, характеризующая больных РМЖ с отсутствием ответа на НАХТ;  $X_1$  – относительное количество CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>-моноцитов в крови;  $X_2$  – относительное количество CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>-моноцитов в крови;  $X_3$  – относительное количество CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>-моноцитов в крови;  $X_4$  – относительное количество CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов в крови;  $X_5$  – относительное количество CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов в крови;  $X_6$  – относительное количество CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов в крови.

Параметры модели:  $F(9,31) = 3,12$ ;  $\lambda$  Уилкса = 0,59;  $p < 0,017$ .

Чувствительность предсказательной модели составила 83 %, специфичность – 96 %.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Современная химиотерапия основана на системном введении одного препарата или комбинации лекарственных средств, обладающих цитостатическим и цитотоксическим действием. Помимо уничтожения раковых клеток химиотерапевтическое лечение влияет на другие делящиеся клетки организма [12]. Поскольку многие клетки иммунной системы, в частности моноциты, происходят из гемопоэтических клеток-предшественников, данная терапия может угнетать продукцию зрелых форм моноцитов [12, 13]. Исследования, которые сосредоточены на изучении влияния цитотоксических и цитостатических препаратов на моноциты в условиях *in vitro*, не позволяют учесть весь комплекс факторов организма. В этом аспекте НАХТ, которая проводится до резекции опухоли, является оптимальной биологической моделью исследования модулирующего влияния химиотерапии на клетки моноцитарно-макрофагального ряда.

Неоадьювантная химиотерапия в разной степени влияет на популяции циркулирующих моноцитов (см. рис. 2). Мы обнаружили, что данная терапия снижает содержание CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клеток (см. рис. 2). Ранее нами было продемонстрировано, что пониженное



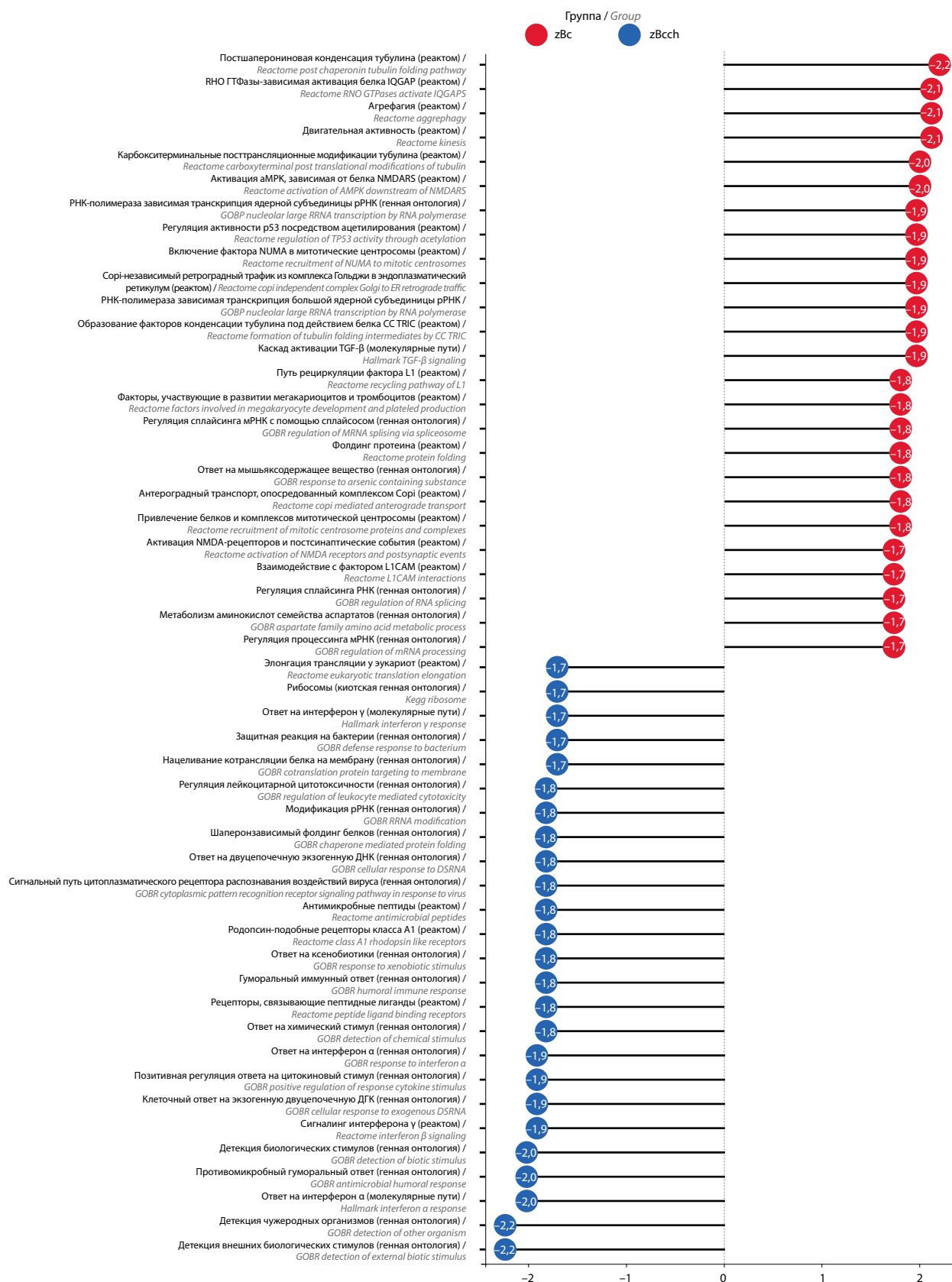


Рис. 4. Сигнальные пути, активированные (красный цвет) и угнетенные (синий цвет) в моноцитах у больных раком молочной железы после введения неоадьювантной химиотерапии. aBc — сигнальные пути со сниженной активацией; zBcch — сигнальные пути с повышенной активацией; NES — нормализованный показатель обогащения; TGF-β — фактор некроза опухоли β; мРНК — матричная РНК

Fig. 4. The results demonstrate top up-regulated (red) and down-regulated (blue) signaling pathways in monocytes of breast cancer patients. aBc — signaling pathways with reduced activation; zBcch — signaling pathways with increased activation; NES — normalized enrichment index; TGF-β — tumor necrosis factor β; mRNA — matrix RNA



количество клеток этой популяции характерно для пациентов, не отвечающих на НАХТ [10]. Доказано, что  $CD14^+16^+$ -клетки являются активными продуцентами основного провоспалительного цитокина — фактора некроза опухоли [20, 21], в то время как низкая экспрессия рецептора HLA-DR на моноцитах происходит при их дифференцировке в миелоидные клетки-супрессоры, которые подавляют иммунный ответ [22]. Таким образом, сниженная экспрессия рецептора HLA-DR на моноцитах  $CD14^+16^+$ -популяции может быть связана с иммуносупрессией, а содержание  $CD14^+16^+HLA-DR^+$ -моноцитов — являться чувствительным к НАХТ параметром, что позволяет рассматривать его в качестве маркера для прогнозирования эффективности данной терапии при РМЖ. Разработанная нами математическая модель для предсказания результата НАХТ подтверждает это предположение. Данная модель учитывает содержание основных популяций моноцитов и экспрессию на них HLA-DR и обладает высокими чувствительностью и специфичностью. Полученные результаты являются основанием для их дальнейшей верификации на больших выборках больных РМЖ с возможностью трансляции результатов в клиническую практику.

Ранее показано, что транскриптомный профиль моноцитов больных РМЖ и здоровых женщин имеет выраженные различия в модельных организмах и группах больных [6, 10, 23]. Неоадьювантная химиотерапия у больных РМЖ оказывает менее выраженное влияние на транскриптомный профиль моноцитов (см. рис. 3). Анализ с помощью метода главных компонент не показал сильных различий между группами образцов до и после лечения (см. рис. 3а). Однако сравнение образцов для каждой больной попарно до и после НАХТ показывает, что у большинства пациенток химиотерапия вызывает изменения в транскриптоме моноцитов, но на индивидуальном уровне (см. рис. 3а). Кроме того, результаты кластерного анализа подтвердили различия в транскриптомном профиле моноцитов до и после НАХТ (рис. 3б). Таким образом, отмечено моделирующее влияние данной терапии не только на абсолютное количество моноцитов крови, как это было показано ранее, но и на транскриптомный профиль и биологию клеток [24].

Сигнатура дифференциально экспрессированных генов свидетельствует об изменении биологических процессов в моноцитах после проведения химиотерапии (см. рис. 3в, г). После НАХТ в моноцитах повышается экспрессия транскриптов молекул, ответственных за транспорт липидов, таких как моноацилглице-

роллипаза (MGLL), и белка-транспортера ABCA2 [25, 26]. Последнее согласуется с активацией процесса транспортировки везикул из аппарата Гольджи в эндоплазматический ретикулум (см. рис. 4). Интересно, что дефицит MGLL способствует TLR4-зависимой активации модельных макрофагов, что свидетельствует о способности MGLL подавлять провоспалительную активность моноцитов и макрофагов [26]. Известно, что моноциты и макрофаги, находящиеся в состоянии противовоспалительной M2-подобной поляризации, характеризуются активацией липидного обмена [27]. Кроме того, после НАХТ в моноцитах повышается экспрессия ядерного фактора NR4A2, который обеспечивает их противовоспалительную активность [28, 29]. Повышение экспрессии этих генов свидетельствует об активации в моноцитах процессов, направленных на подавление воспаления. Кроме того, сигнальные пути, связанные с ответом иммунных клеток на интерфероны, эндогенную ДНК и цитокиновые стимулы, подавляются после НАХТ (см. рис. 4).

Известно, что цитостатические препараты, входящие в состав схем НАХТ, действуют на предшественники моноцитов и макрофагов. После НАХТ наблюдается повышение уровня экспрессии генов *UCK1* и *YOD1* в моноцитах (рис. 3в, г). Известно, что белки UCK1 и YOD1 обеспечивают в клетке процесс деубиквитинизации, связанный со снятием «меток смерти» с клеточной ДНК [30, 31]. Ранее в отношении моноцитов активация системы деубиквитинизации в ответ на действие цитостатических агентов описана не была. Мы предполагаем, что это может быть одним из механизмов восстановления пула моноцитов в ответ на НАХТ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе сравнительного исследования содержания HLA-DR<sup>+</sup>- и CD163<sup>+</sup>-моноцитов при РМЖ до и после НАХТ обнаружено снижение уровня  $CD14^+16^+$ -клеток, экспрессирующих рецептор HLA-DR, после лечения. Показано, что после НАХТ индивидуальный транскриптомный профиль моноцитов каждого пациента изменяется, а экспрессия генов, связанных с липидным обменом, подавлением воспалительного ответа и деубиквитинизации, повышается в моноцитах всех больных. Применение метода математического моделирования, определяющего содержание  $CD14^+16^+$ ,  $CD14^+16^-$  и  $CD14^-16^+$ -моноцитов до лечения и экспрессию рецептора HLA-DR на них, позволяет предсказать эффективность НАХТ с чувствительностью 83,3 % и специфичностью 96 %.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 252 с. Malignant tumors in Russia in 2022 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2022. 250 p. (In Russ.).
2. Kim G., Pastoriza J.M., Qin J. et al. Racial disparity in distant recurrence-free survival in patients with localized breast cancer: a pooled analysis of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project trials. *Cancer* 2022;128(14):2728–35. DOI: 10.1002/cncr.34241
3. Qiu S.Q., Waaijer S.J.H., Zwager M.C. et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: innocent bystander or important player? *Cancer Treat Rev* 2018;70:178–89. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.08.010
4. Linde N., Casanova-Acebes M., Sosa M.S. et al. Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nature Commun* 2018;9(1):21. DOI: 10.1038/s41467-017-02481-5
5. Larionova I., Tuguzbaeva G., Ponomaryova A. et al. Tumor-associated macrophages in human breast, colorectal, lung, ovarian and prostate cancers. *Front Oncol* 2020;10:566511. DOI: 10.3389/fonc.2020.566511
6. Cassetta L., Fraggogianni S., Sims A.H. et al. Human tumor-associated macrophage and monocyte transcriptional landscapes reveal cancer-specific reprogramming, biomarkers, and therapeutic targets. *Cancer Cell* 2019;35(4):588–602.e10. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.02.009
7. Ziegler-Heitbrock L. Blood monocytes and their subsets: established features and open questions. *Front Immunol* 2015;6:423. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00423
8. Olingy C.E., Dinh H.Q., Hedrick C.C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol* 2019;106(2):309–22. DOI: 10.1002/JLB.4RI0818-311R
9. Zhang B., Cao M., He Y. et al. Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer. *Tumour Biol* 2017;39(6):1010428317711571. DOI: 10.1177/1010428317711571
10. Patysheva M., Larionova I., Stakheyeva M. et al. Effect of early-stage human breast carcinoma on monocyte programming. *Front Oncol* 2022;11:800235. DOI: 10.3389/fonc.2021.800235
11. Cassetta L., Pollard J.W. A timeline of tumour-associated macrophage biology. *Nat Rev Cancer* 2023;23(4):238–57. DOI: 10.1038/s41568-022-00547-1
12. Galluzzi L., Buqué A., Kepp O. et al. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer Cell* 2015;28(6):690–714. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.10.012
13. Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F. et al. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008;8(1):59–73. DOI: 10.1038/nri2216
14. Hughes R., Qian B.-Z., Rowan C. et al. Perivascular M2 macrophages stimulate tumor relapse after chemotherapy. *Cancer Res* 2015;75(17):3479–91. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3587
15. Kroemer G., Galassi C., Zitvogel L. et al. Immunogenic cell stress and death. *Nat Immunol* 2022;23(4):487–500. DOI: 10.1038/s41590-022-01132-2
16. Stakheyeva M., Eidenzon D., Slonimskaya E. et al. Integral characteristic of the immune system state predicts breast cancer outcome. *Exp Oncol* 2019;41(1):32–8.
17. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013;29(1):15–21. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts635
18. Hartley S.W., Mullikin J.C. QoRTs: a comprehensive toolset for quality control and data processing of RNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 2015;16(1):224. DOI: 10.1186/s12859-015-0670-5
19. van Helden S.F., Anthony E.C., Dee R. et al. Rho GTPase expression in human myeloid cells. *PLoS One* 2012;7(8):e42563. DOI: 10.1371/journal.pone.0042563
20. Belge K.U., Dayyani F., Horelt A. et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002;168(7):3536–42. DOI: 10.4049/jimmunol.168.7.3536
21. Myśliwska J., Smardzewski M., Marek-Trzonkowska N. et al. Expansion of CD14+CD16+ monocytes producing TNF- $\alpha$  in complication-free diabetes type 1 juvenile onset patients. *Cytokine* 2012;60(1):309–17. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.03.010
22. Mengos A.E., Gastineau D.A., Gustafson M.P. The CD14(+)HLA-DR(lo/neg) monocyte: an immunosuppressive phenotype that restrains responses to cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2019;10:1147. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01147
23. Robinson A., Burgess M., Webb S. et al. Systemic influences of mammary cancer on monocytes in mice. *Cancers* 2022;14(3):833. DOI: 10.3390/cancers14030833
24. Foulds G.A., Vadakekolathu J., Abdel-Fatah T.M.A. et al. Immune-phenotyping and transcriptomic profiling of peripheral blood mononuclear cells from patients with breast cancer: identification of a 3 gene signature which predicts relapse of triple negative breast cancer. *Front Immunol* 2018;9:2028. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02028
25. Rahaman O., Ganguly D. Endocannabinoids in immune regulation and immunopathologies. *Immunology* 2021;164:242–52. DOI: 10.1111/imm.13378
26. Xiang W., Shi R., Kang X. et al. Monoacylglycerol lipase regulates cannabinoid receptor 2-dependent macrophage activation and cancer progression. *Nat Commun* 2018;9(1):2574. DOI: 10.1038/s41467-018-04999-8
27. Li L., Tian Y. The role of metabolic reprogramming of tumor-associated macrophages in shaping the immunosuppressive tumor microenvironment. *Biomed Pharmac* 2023;161:114504. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114504
28. Navone N.D., Perga S., Martire S. et al. Monocytes and CD4+ T cells contribution to the under-expression of NR4A2 and TNFAIP3 genes in patients with multiple sclerosis. *J Uroimmunol* 2014;272(1–2): 99–102. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.04.017
29. Crean D., Cummins E.P., Bahar B. et al. Adenosine modulates NR4A orphan nuclear receptors to attenuate hyperinflammatory responses in monocytic cells. *J Immunol* 2015;195(4):143648. DOI: 10.4049/jimmunol.1402039
30. Matchett E.C., Ambrose E.C., Kornbluth J. Characterization of uridine-cytidine kinase like-1 nucleoside kinase activity and its role in tumor growth. *Biochem J* 2022;479(11):1149–64. DOI: 10.1042/BCJ20210770
31. Han Z., Jia Q., Zhang J. et al. Deubiquitylase YOD1 regulates CDK1 stability and drives triple-negative breast cancer tumorigenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 2023;42(1):228. DOI: 10.1186/s13046-023-02781-3

**Вклад авторов**

М.Р. Патышева: разработка дизайна исследования, выполнение проточной цитометрии, РНК-секвенирование моноцитов крови, анализ данных, написание текста статьи;  
М.Н. Стахеева: разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных, написание текста статьи;  
Е.С. Григорьева: выполнение проточной цитометрии и проточной цитометрической сортировки моноцитов крови;  
П.С. Ямшиков: биоинформатическая обработка данных РНК-секвенирования;  
И.В. Ларионова: подготовка библиотек секвенирования;  
А.А. Будницкая: обработка данных проточной цитометрии, подготовка базы данных о пациентах, подготовка иллюстративного материала;  
Н.А. Тарабановская: подбор пациентов, сбор клинических данных о пациентах;  
Н.В. Чердынцева: разработка дизайна исследования, обработка и анализ результатов;  
Ю.Г. Кжышкова: разработка концепции исследования, поиск грантовой поддержки исследования, обработка и анализ результатов.

**Authors' contribution**

M.R. Patysheva: development of the study design, execution of flow cytometry, RNA sequencing of blood monocytes, data analysis, article writing;  
M.N. Stakheeva: development of the concept and design of the study, data analysis, article writing;  
E.S. Grigorieva: performing flow cytometry and flow cytometric sorting of blood monocytes;  
P.S. Yamshchikov: bioinformatic processing of RNA sequencing data;  
I.V. Larionova: preparation of sequencing libraries;  
A.A. Budnitskaya: processing of flow cytometry data, preparation of a patient database, preparation of illustrative material;  
N.A. Tarabanovskaya: selection of patients, collection of clinical data on patients;  
N.V. Cherdyntseva: development of the research design, processing and analysis of the results;  
Yu.G. Kzhyshkovska: development of the research concept, search for grant support for the research, processing and analysis of the results.

**ORCID авторов / ORCID authors**

М.Р. Патышева / M.R. Patysheva: <https://orcid.org/0000-0003-2865-7576>  
М.Н. Стахеева / M.N. Stakheeva: <https://orcid.org/0000-0003-0601-2240>  
Е.С. Григорьева / E.S. Grigoryeva: <https://orcid.org/0000-0003-4671-6306>  
П.С. Ямшиков / P.S. Iamshchikov: <https://orcid.org/0000-0002-0646-6093>  
И.В. Ларионова / I.V. Larionova :<https://orcid.org/0000-0001-5758-7330>  
Н.А. Тарабановская / N.A. Tarabanovskaya: <https://orcid.org/0000-0003-1630-4466>  
Н.В. Чердынцева / N.V. Cherdyntseva: <https://orcid.org/0000-0003-1526-9013>  
Ю.Г. Кжышкова / J.G. Kzhyshkovska: <https://orcid.org/0000-0003-0898-3075>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00435).

**Funding.** The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 22-25-00435).

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (протокол № 10 от 05.12.2019 г.).

Все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics**

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (protocol No. 10 dated 05.12.2019).

All patients gave written informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 09.11.2023. **Принята к публикации:** 13.02.2024.

**Article submitted:** 09.11.2023. **Accepted for publication:** 13.02.2024.