

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи



ФЕДОРОВ АНТОН АНДРЕЕВИЧ

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК МОНОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО РЯДА
У БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО
С БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНОЙ ГИПЕРПЛАЗИЕЙ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, Стахеева Марина Николаевна
доктор биологических наук, Денисов Евгений Владимирович

Томск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1 Гетерогенность клеток моноцитарно-макрофагальных линии	19
1.2 Роль моноцитов и макрофагов в патогенезе злокачественных новообразований	23
1.3 Предопухолевые изменения бронхиального эпителия и их место в патогенезе немелкоклеточного рака легкого	32
1.4 Генетические полиморфизмы при НМРЛ и их связь со свойствами клеток моноцитарно-макрофагальной линии.....	36
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1 Характеристика клинического материала	46
2.2 Описание методов исследования	52
2.2.1 Морфологическая верификация предопухолевых изменений бронхиального эпителия в мелких бронхах у пациентов с НМРЛ	52
2.2.2 Выделение фракции мононуклеарных клеток из периферической крови	52
2.2.3 Индукция макрофагов из моноцитов периферической крови.....	53
2.2.4 Оценка фенотипических особенностей моноцитов и индуцированных <i>in vitro</i> макрофагов.....	54
2.2.5 Выделение ДНК из образцов периферической крови	56
2.2.6 Подготовка ДНК-библиотек	56
2.2.7 Массовое параллельное секвенирование и биоинформатический анализ данных ДНК-библиотек	57
2.2.8 Выделение РНК из индуцированных макрофагов, подготовка библиотек и биоинформатическая обработка данных	58

2.2.9 Статистическая обработка данных	59
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	60
3.1 Частота встречаемости SNP у больных НМРЛ в зависимости от наличия или отсутствия изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов	60
3.2 Взаимосвязь наличия изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов с фенотипическим профилем моноцитов и макрофагов у больных НМРЛ	64
3.3 Взаимосвязь наличия изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов со способностью макрофагов, индуцированных из моноцитов <i>in vitro</i> , к ответу на поляризующие стимулы ИЛ-4 и ЛПС у больных НМРЛ	66
3.4 Взаимосвязь наличия изолированной БКГ в респираторном эпителии с транскриптомным профилем макрофагов, индуцированных из моноцитов <i>in vitro</i> , у больных НМРЛ.....	69
3.5 Связь SNP с фенотипическими особенностями моноцитов периферической крови и индуцированных <i>in vitro</i> макрофагов у больных НМРЛ.	76
3.6 Ассоциация фенотипических и генотипических особенностей клеток моноцитарно-макрофагальной линии с риском развития гематогенных метастазов у больных НМРЛ.....	82
3.6.1 Оценка показателей безметастатической выживаемости у больных НМРЛ в зависимости от наличия изолированной БКГ или отсутствия предопухолевых изменений в эпителии бронхов.....	82
3.6.2 Частота встречаемости гематогенных метастазов среди пациентов с изолированной БКГ и с отсутствием предопухолевых изменений в респираторном эпителии.....	84
3.6.3 Частоты встречаемости SNP у больных НМРЛ в зависимости от развития гематогенных метастазов	85
3.6.4 Взаимосвязь гематогенного метастазирования с особенностями клеток моноцитарно-макрофагальной линии у больных НМРЛ.....	87

3.6.5 Фенотипические особенности моноцитов периферической крови и индуцированных макрофагов у больных НМРЛ с развившимися гематогенными метастазами в зависимости от наличия или отсутствия базальноклеточной гиперплазии	89
3.6.6 Математическая модель предсказания риска развития гематогенных метастазов у больных НМРЛ с учетом особенностей клеток моноцитарно- макрофагального ряда	92
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
ВЫВОДЫ	110
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	113

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААГ – атипичная аденоматозная гиперплазия

БКГ – базальноклеточная гиперплазия

Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ИЛ – интерлейкин

ИФН- γ – интерферон гамма

ЛПС – липополисахарид

М-КСФ – макрофагальный колониестимулирующий фактор

МСК – миелоидные супрессорные клетки

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

ОАМ – опухолеассоциированные макрофаги

ПМ – плоскоклеточная метаплазия

РЛ – рак легкого

ТФР- β - трансформирующий фактор роста β

ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

CIS – карцинома *in situ*

CNV – вариации числа копий

GWAS – полногеномное ассоциативное исследование

NGS – секвенирование нового поколения

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

TLR – Toll-подобный рецептор

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Рак является основной проблемой общественного здравоохранения во всем мире [91]. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет до 85% всех злокачественных опухолей легких [204]. Несмотря на высокие достижения в области диагностики и лечения рака легкого, общая 5-летняя выживаемость для НМРЛ остается низкой, достигая 68% у пациентов с IB-стадией и находясь на уровне от 0% до 10% у пациентов с IVA-IVB стадией [69]. Одной из основных причин смертности при раке легкого является прогрессирование после проведенного противоопухолевого лечения. У 30% больных НМРЛ, подвергнутых радикальному хирургическому лечению совместно с химиотерапией, в течение 2 лет отмечено развитие рецидива [154]. Умение предсказать риск прогрессирования НМРЛ, а тем более предотвратить его развитие, является актуальной целью современной онкологии.

В последние годы исследованиями, выполненными О.В. Панковой с соавторами (2008–2018), была показана прогностическая ценность состояния респираторного эпителия бронхов в отдалении от первичного опухолевого узла. Так, было выявлено, что наличие базальноклеточной гиперплазии (БКГ) в эпителии бронхов в отдалении от первичного опухолевого узла ассоциировано с высоким риском развития гематогенных метастазов. Интересно, что гематогенные метастазы не были обнаружены в группе больных НМРЛ, у которых в отдалении от опухолевого очага не встречались морфологические изменения в слизистой оболочке бронхов. Механизм, лежащий в основе выявленного феномена (взаимосвязи предопухолевых изменений в отдалении от первичного опухолевого узла и прогрессирования опухоли), пока остается неясным.

С одной стороны, известно, что предопухолевые изменения на фоне хронического воспаления в респираторном эпителии бронхов являются важным этапом злокачественной трансформации [148] и проходят через несколько стадий: базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия, дисплазия (легкая,

средняя и тяжелая) и карцинома *in situ* [148]. Фактически, наличие стойкой или прогрессирующей дисплазии высокой степени (умеренной или тяжелой) является маркером повышенного риска рака легкого. Однако в настоящее время не хватает эффективных инструментов для выявления данных предопухолевых изменений с высоким риском прогрессирования в карциному *in situ*. Междисциплинарным научным коллективом Томского НИИ онкологии исследуется предположение о том, что связь реактивных изменений слизистой бронхов в отдалении от новообразования с особенностями протекания опухолевого процесса может быть обусловлена конститутивными генотипическими характеристиками. Вероятно, тот факт, что у пациентов развиваются разные варианты опухолевой прогрессии либо она отсутствует вообще, напрямую связан с конститутивными особенностями развития воспаления [178]. Предполагается, что морфологические изменения в бронхах являются косвенным отражением иммуновоспалительных процессов в опухоли, которые и определяют путь прогрессирования заболевания. Индивидуальные аллельные варианты генов, определяющие функциональность иммунной системы, могут влиять как на протекание предопухолевых процессов, так и на паренхиматозно-стромальные отношения в самой опухоли.

С другой стороны, к сегодняшнему дню показана роль клеток моноцитарно-макрофагального ряда в патогенезе злокачественных новообразований [26]. Участие моноцитов в патогенезе злокачественного роста, прежде всего, связано с пополнением различных клеточных популяций опухолевого микроокружения, таких как опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ), супрессорные клетки миелоидного происхождения и определенная часть дендритных клеток.

Пул моноцитов периферической крови гетерогенен: выделяют 3 основные популяции моноцитов – классические (CD14⁺CD16⁻, Ly6C^{hi}CX₃CR1^{low}), неклассические (CD14⁻CD16⁺, Ly6C^{low}CX₃CR1^{hi}) и промежуточные (CD14⁺CD16⁺) моноциты. Так, микроокружение экспериментальных опухолей содержит значительное количество Ly6C⁺⁺ моноцитов, соответствующих CD14⁺ клеткам человека. Именно клетки данной субпопуляции являются предшественниками опухолеассоциированных макрофагов и дендритных клеток

[197]. Классические моноциты играют важную роль в создании микроокружения, резистентного к терапии [43, 108, 243]. Было установлено, что CCR2⁺моноциты ответственны за устойчивость к доксорубину, способствуя рецидиву опухоли после лечения [108]. Моноциты Ly6C^{hi}/CD14⁺CD16⁻ также способствуют инвазии раковых клеток и метастазированию посредством экспрессии фактора свертываемости F13a1 при раке легкого человека, что связано с худшей выживаемостью [81].

Макрофаги являются представителями конечного этапа дифференцировки моноцитарно-макрофагального ростка [136]. Данные, полученные на модели перевиваемых опухолей у мышей, показывают, что опухолеассоциированные макрофаги как в первичных опухолевых узлах, так и в метастазах происходят из предшественников моноцитов [60, 110, 140, 203]. К настоящему моменту вопрос о том, насколько значим вклад моноцитов в пополнение основного пула опухолеассоциированных макрофагов человека, остается открытым. Высказываются предположения о том, что статус моноцитов в периферической крови может определять свойства, которые проявят в опухоли тканевые макрофаги [158].

Значительное количество данных, полученных в экспериментальных моделях и клинических наблюдениях, указывает на существенную роль макрофагов в развитии и прогрессии злокачественных новообразований. При этом роль ОАМ в патогенезе злокачественного роста определяется их функциональной поляризацией. Макрофаги, присутствующие в разных тканях, поляризуются в соответствии с изменениями окружающей среды, образуя разные подтипы макрофагов, такие как М1-макрофаги, активируемые по классическому типу, и М2-макрофаги, альтернативно активируемые [132]. М1-макрофаги способны вызывать провоспалительные реакции и продуцировать провоспалительные факторы, такие как ИЛ-6, ИЛ-12 и фактор некроза опухоли. Напротив, М2-макрофаги способны оказывать противовоспалительный ответ и восстанавливать поврежденные ткани [132]. Было показано, что высокая инфильтрация активированных по классическому пути М1-макрофагов в островках опухоли была связана с

увеличением общей выживаемости при НМРЛ, а высокая инфильтрация альтернативно активированных M2-макрофагов в строме и опухолевых островках была связана со снижением общей выживаемости [66]. Показано, что фенотип M2 ОАМ связан с худшей выживаемостью пациентов при раке молочной железы, раке яичников, раке желудка, почечно-клеточном раке, гепатоцеллюлярной карциноме, множественной миеломе и остеосаркоме [31, 77, 114, 183, 206, 227, 240].

ОАМ могут регулировать пути выживания опухолевых клеток путем продукции цитокинов и про-онкогенных протеаз. Кроме того, ОАМ могут способствовать защите опухоли при проведении цитостатической химиотерапии. Fu et al. в своем исследовании показали, что клетки гепатоцеллюлярной карциномы проявляли повышенную устойчивость к оксалиплатину после совместного культивирования с макрофагами *in vitro* и *in vivo* [242].

Известно, что клетки моноцитарно-макрофагальной линии обладают высокой пластичностью, т.е. их фенотип может изменяться под влиянием различных факторов внутренней среды и микроокружения. Так, в ответ на липополисахарид (ЛПС) и интерферон гамма (ИФН- γ) моноциты/макрофаги подвергаются классической активации M1, в то время как при воздействии ИЛ-4, трансформирующего фактора роста β (ТФР- β), ИЛ-10 индуцируется альтернативная активация M2 [14].

Фенотипические особенности клеток манифестируются на уровне экспрессии генов и реализуется на уровне экспрессии белков. В настоящее время известны следующие поверхностные маркеры M1- и M2-поляризации клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Макрофаги M1 имеют следующие поверхностные маркеры: TLR-2, TLR-4, CD80, CD86, iNOS и MHC-II [251]. Макрофаги M2 могут быть идентифицированы по экспрессии поверхностных маркеров, таких как рецептор маннозы CD206, CD163, CD209, FIZZ1 и Ym1 [251].

В исследовании Italiani et al. была разработана модель *in vitro*, которая помогала понять регуляцию функциональной дифференцировки моноцитов/макрофагов, где моноциты периферической крови человека подвергались последовательным изменениям в условиях микроокружения [238].

Путем транскриптомного анализа микрочипов было обнаружено, что гены, связанные с воспалением и дифференцировкой, активировали M1-поляризацию макрофагов (*IL12B*, *PTX3*, *CCL4*, *IL1RN*, *TNF*, *IL6*, *CCL20*, *IL1A*, *ICAM1*, *NFKB1*, *TRAF1*, *SERPINB9*, *IL1F9*, *MAFF*, *CXCL1*, *DRAM*, *TNIP3*, *CCL2*, *SLAMF7*, *CCR7*, *TNFAIP6*), тогда как противовоспалительные гены (*P2RY5*, *FGL2*, *CD1D*) ингибировали M1-поляризацию. В свою очередь гены, связанные с положительной дифференцировкой и фазой разрешения воспаления, активировали M2-поляризацию (*TREM2*, *A2M*, *NUPR1*, *C1QA*, *MS4A4A*, *APOE*, *APOC1*, *ADORA3*, *ADAMDEC1*, *CD59*, *TFPI*, *CCL3*), в отличие от генов, связанных с негативной дифференцировкой (*FCER1A*, *LGALS2*, *PF4*, *CD69*, *CD93*, *NR4A2*, *VCAN*, *CD62L*, *ICAM3*, *NLRP3*, *ERG1*), которые ингибировали данный тип поляризации [238]. В модели макрофагов, индуцированных из моноцитов периферической крови здорового человека, было показано, что гены *CYBB* (Cytochrome b-245) и *DHCR7* (7-Dehydrocholesterol Reductase) регулируют поляризацию M1- и M2-макрофагов соответственно [236].

Вероятно, что, наряду с фенотипической пластичностью, существует генетически детерминированный функциональный профиль моноцитов/макрофагов, определяющий возможную вариативность их свойств и поведение в конкретных условиях. Однонуклеотидные полиморфизмы генов (SNP) являются наиболее распространенным типом генетических вариаций среди людей. Появление SNP может приводить к изменению функции гена, что в свою очередь может влиять на развитие и исход заболевания. В ряде исследований были обнаружены SNP, связанные с функциональной активностью клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Было показано, что наличие двух SNP в гене *IL1 β* , находящиеся в промоторной области в положениях -511 (CT; rs16944) и -31 (TC; rs1143627), напрямую связано с повышенным риском развития рака легкого [176]. ИЛ-1 β представляет собой провоспалительный цитокин, продуцируемый в основном моноцитами крови и тканевыми макрофагами, который способен запускать каскад воспалительных реакций посредством индукции генов, связанных с воспалением и активацией реактивных форм кислорода [176]. Два других SNP

(rs17484273, rs1484751) в гене *SR-A1* были значимо связаны с худшей общей выживаемостью у пациентов с НМРЛ на поздней стадии. В экспериментальной модели делеция гена *SR-A1* активировала сывороточный амилоид A1 (SAA1) в макрофагах посредством передачи сигналов MAPK/I κ B/NF κ B, который стимулирует инвазию опухолевых клеток и миграцию макрофагов [202]. У больных НМРЛ, имеющих SNP в гене *CD47* (rs3804639) и генотип GG, была выявлена более длительная выживаемость без прогрессирования при лечении ниволумабом, чем у больных с генотипами GT или TT [29]. Ингибирование CD47 с помощью специфических антител к данному белку при немелкоклеточном раке легкого увеличивает фагоцитарную и цитотоксическую активность макрофагов против клеток НМРЛ [29].

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что моноциты и макрофаги с различными конститутивными особенностями будут иметь различный фенотипический профиль, что может критически повлиять на их роль в паренхиматозно-стромальных взаимоотношениях и привести к различному состоянию респираторного эпителия и исходам заболевания, в частности, развитию гематогенных метастазов у больных НМРЛ.

Степень разработанности темы

Иммунная система играет важную роль в патогенезе рака легкого [224]. Клетки моноцитарно-макрофагальной линии являются основными клетками опухолевого микроокружения, которые могут способствовать прогрессированию злокачественных новообразований [137, 151]. Фенотип моноцитов и макрофагов у больных раком легкого и здоровых лиц имеет отличия [117, 241]. Однако сегодня нет точных данных о том, какую роль клетки моноцитарно-макрофагального ряда играют в перестройке респираторного эпителия и его переходе в злокачественную опухоль. Неизвестно, как наличие и фенотип клеток моноцитарно-макрофагального ряда могут быть связаны с прогрессированием НМРЛ в зависимости от предопухолевых изменений. Неизвестно, насколько генетически

детерминированы свойства клеток моноцитарно-макрофагального ряда, связанные с наличием предопухолевых изменений в респираторном эпителии.

Цель исследования

Изучить фенотипические особенности моноцитов периферической крови и *in vitro* индуцированных макрофагов в зависимости от генетических особенностей организма и состояния респираторного эпителия в сопоставлении с риском развития гематогенных метастазов у пациентов с немелкоклеточным раком легкого.

Задачи

1. Выявить генетические особенности (частоты полиморфных вариантов), связанные с наличием изолированной БКГ или отсутствием предопухолевых изменений у больных НМРЛ.

2. Изучить фенотипические варианты моноцитов периферической крови и индуцированных из них *in vitro* макрофагов, их связь с наличием изолированной БКГ или отсутствием предопухолевых изменений в мелких бронхах, смежных с опухолью.

3. Оценить способность макрофагов, индуцированных из моноцитов, к ответу на поляризующие стимулы ИЛ-4 и ЛПС у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ или отсутствием предопухолевых изменений.

4. Изучить экспрессию генов, функционально значимых для опухолевой прогрессии и иммуновоспалительных реакций, в макрофагах, индуцированных *in vitro* из моноцитов, больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ или отсутствием предопухолевых изменений.

5. Исследовать связь фенотипического профиля моноцитов периферической крови и макрофагов, индуцированных *in vitro*, с генотипическими характеристиками больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ или отсутствием предопухолевых изменений.

6. Определить совокупность фенотипических и генотипических характеристик клеток моноцитарно-макрофагальной линии, ассоциированных с риском развития гематогенных метастазов у больных НМРЛ.

Научная новизна

Впервые показано, что у больных НМРЛ с изолированной БКГ реже встречаются гетерозиготные генотипы по следующим полиморфным вариантам rs17416074 G>A (*CNTN2*), rs2297336 A>G (*POLR1C*), rs74821923 G>C (*PTPRZ1*), rs11176826 C>T (*MUC19*), rs61752771 T>C (*DNJA4*), а также гомозиготный генотип TT по полиморфному варианту rs11176826 C>T (*MUC19*) в сравнении с пациентами без предопухолевых изменений.

Новыми являются сведения о том, что наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии у больных НМРЛ сопровождается снижением числа дифференцированных CD68+макрофагов как при инкубации с M1-индуктором ЛПС, так и с M2-индуктором ИЛ-4, а также более выраженными признаками неадекватного ответа на M1- полярирующий сигнал, что проявляется в увеличенной экспрессии маркеров M2-поляризации CD163 и CD206 на поверхности индуцированных макрофагов. Новыми являются сведения о транскриптомном профиле макрофагов, индуцированных *in vitro* из моноцитов, у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ. Впервые показано, что при БКГ в клетках данного пула гиперэкспрессированы гены *ABCA7*, *PLXNA3*, *ACP5*, *NBPF9*, *NBPF15*, *MYOM1*, *FBF1*, *MEGF6*, *B3GALT2*, *SNORD15B*, *ITGA6*, *NPIP15*, в то время как гены *CCL18*, *ENPP2*, *PDPN*, *STEAP4*, *FPRI*, *BMP2*, *CRISPLD2*, *NTRK2*, *CD163*, *SCG5*, *MYORG*, *TNIP3*, *CDCA3*, *CDCA2*, *INTS13*, *NQO2*, *SRGN* гипоекспрессированы в сравнении пациентами без предопухолевых изменений.

Впервые выявлено, что наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии у больных НМРЛ связано с активацией сигнальных путей, связанных с mTOR, с рецептором NMDA, синтезом и метаболизмом фосфоинозитол фосфатов, движением ресничек, клеточной адгезией, синтезом липопротеинов и с подавлением процессов клеточного цикла, цитокин-цитокиновых взаимодействий,

процессинга и презентации антигенов, воспалительных процессов, ответа на ИФН γ и ИФН α , IL2/STAT5, IL6/JAK/STAT3, mTORC1, Toll-подобных рецепторов, T-клеточных рецепторов, дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток.

Впервые установлено, что для пациентов с НМРЛ – носителей гетерозиготного генотипа AG гена *POLR1C* – характерно увеличение количества CD68+популяций макрофагов как в условиях спонтанного культивирования, так и при добавлении M1-индуктора поляризации; снижение уровня экспрессии M2-маркера CD206 на поверхности макрофагов при добавлении M1-индуктора (ЛПС). Гетерозиготный генотип СТ гена *MUC19* у больных НМРЛ ассоциирован со снижением ко-рецептора к ЛПС CD14 при добавлении M1-индуктора ЛПС в сравнении с показателями у представителей гомозиготного генотипа СС гена *MUC19*.

Впервые показано, что гематогенные метастазы чаще развиваются у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ и гомозиготным генотипом СС гена *MUC19*.

Впервые создана математическая модель предсказания риска развития гематогенного метастазирования у больных НМРЛ, включающая в себя показатели фенотипического профиля клеток моноцитарно-макрофагального ряда, генотипические и клинические особенности пациентов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты выполненной работы предоставляют сведения о генетической детерминации состояния респираторного эпителия бронхов и риска развития гематогенных метастазов. Показано значение фенотипических особенностей клеток моноцитарно-макрофагального ряда как фактора связи состояния респираторного эпителия отдаленных бронхов и риска развития гематогенных метастазов при НМРЛ. Полученные данные о различии фенотипических особенностей клеток моноцитарно-макрофагальной линии, сигнатуры дифференциально экспрессированных генов и ассоциированных с ними сигнальных путей у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ и отсутствием

предопухолевых изменений внесут вклад в фундаментальные знания о биологических закономерностях развития предопухолевых изменений в эпителии бронхов и опухолевой прогрессии, в частности гематогенного метастазирования, и о роли клеток моноцитарно-макрофагального ряда в данных процессах.

Практическую значимость работы составляет представленная совокупность фенотипических параметров клеток моноцитарно-макрофагального ряда, клинических и генотипических особенностей пациентов, связанных с развитием гематогенных метастазов, направленная на формирование групп повышенного риска прогрессирования НМРЛ. Создана математическая модель, позволяющая прогнозировать вероятность развития гематогенных метастазов у больных НМРЛ с высокой чувствительностью и специфичностью, включающая в себя показатели фенотипического профиля клеток моноцитарно-макрофагального ряда, клинически и генотипические особенности пациентов. Выявленные в результате исследования сведения об особенностях ответа макрофагов, индуцированных *in vitro* из моноцитов периферической крови, на стимулы M1- и M2-поляризации, ассоциированные с состоянием респираторного эпителия в мелких бронхах, смежных с опухолью, лягут в основу разработки новых терапевтических стратегий предупреждения прогрессирования НМРЛ.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала оценку ассоциативных связей, изучаемых фенотипических, экспрессионных и функциональных показателей клеток моноцитарно-макрофагальной линии и генетических характеристик данной популяции клеток у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ или отсутствием предопухолевых изменений в респираторном эпителии бронхов, а также оценку вовлеченности данных популяций в опухолевую прогрессию. Изучение молекулярных механизмов связи изолированной БКГ с фенотипическими и экспрессионными характеристиками макрофагов проведено методами многоцветной проточной цитометрии и полнотранскриптомного секвенирования с использованием модельной системы. Изучение генетических

особенностей (частоты полиморфных вариантов генов) моноцитов и индуцированных *in vitro* макрофагов у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ или отсутствием предопухолевых изменений в респираторном эпителии бронхов проведено методом полноэкзомного секвенирования. Биоинформатический анализ выявленных при секвенировании однонуклеотидных полиморфизмов генов позволил определить полиморфные варианты в генах, активность которых, предположительно, может быть связана с функциональными проявлениями клеток моноцитарно-макрофагальной линии.

Работа выполнена с применением современных методов, позволяющих решить поставленные задачи, которыми в полной мере владеет соискатель: полнотранскриптомное секвенирование, полноэкзомное секвенирование, биоинформатический поиск с использованием современных баз данных, многоцветная проточная цитометрия, ведение культур клеток. Соискатель работал с медицинской документацией для формирования баз данных пациентов, вовлеченных в исследование.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии, развитие гематогенных метастазов и фенотипический профиль клеток моноцитарно-макрофагального ряда связаны с генетическими особенностями пациентов с НМРЛ.

2. Наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии у больных НМРЛ ассоциировано с особенностями транскриптного профиля индуцированных *in vitro* макрофагов и их ответом на индукторы поляризации, но не с фенотипическими особенностями клеток моноцитарно-макрофагального ряда.

3. Генотипические особенности и показатели фенотипического профиля клеток моноцитарно-макрофагального ряда у пациентов с НМРЛ обладают прогностической ценностью для риска развития гематогенных метастазов.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным клиническим материалом проспективного исследования, высоким методологическим и методическим уровнем с использованием современных информативных методов исследования: иммунологических, биоинформатических, молекулярно-генетических, морфологических, экспериментальных моделей *in vitro*. Обоснованность полученных результатов подтверждается корректной статистической обработкой материала.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации изложены и обсуждены на международной конференции «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2019), всероссийском конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2020), международной конференции «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2021). Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-315-90055 «Взаимосвязь фенотипического профиля клеток моноцитарно-макрофагального ряда с риском прогрессирования немелкоклеточного рака легкого у больных с различными вариантами предопухолевых изменений респираторного эпителия».

Публикации

По теме опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 статьи – в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в изучении и анализе литературы по теме диссертационного исследования. Соискатель самостоятельно проводил комплекс исследований по изучению клеток моноцитарно-макрофагальной линии и их особенностей у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ или отсутствием предопухолевых изменений в респираторном эпителии бронхов, включающие создание системы модельных макрофагов *in vitro*, полнотранскриптомное секвенирование и обработку полученных биоинформатических данных, многоцветную проточную цитометрию. Полноэкзомное секвенирование проводилось соискателем совместно с сотрудниками лаборатории биологии опухолевой прогрессии НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Разработка дизайна исследования и определение методологии исследования, анализ, создание электронной базы, а также подготовка научных публикаций проводилась вместе с руководителем. Статистическая обработка материала, обобщение полученных данных и интерпретация результатов, оформление диссертации проводились самостоятельно.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 138 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав (аналитического обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения), выводов, списка условных сокращений и указателя литературы, включающего 254 источника, из них 4 отечественных и 250 иностранных. Работа содержит 9 таблиц и 25 рисунков.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Гетерогенность клеток моноцитарно-макрофагальных линии

Макрофаги присутствуют во всех тканях организма в виде фенотипически пластичных обособленных резидентных популяций, играющих чрезвычайно важную роль в поддержании тканевого гомеостаза, иммунных реакциях, регенерации и репарации тканей [126, 164, 250]. Тканевые макрофаги могут отличаться друг от друга по анатомической локализации, морфологии, фенотипу, функциональным особенностям и транскрипционным профилям. Такие различия во многом объясняются тем, что макрофаги очень тонко реагируют на различные сигналы из тканевого окружения. Однако, как стало известно относительно недавно, разнообразие макрофагов может объясняться и их различным происхождением.

Фактически известны три источника тканевых макрофагов: эмбриональный желточный мешок, печень плода и костный мозг [250]. Исследования на животных в последние десятилетия свидетельствуют о том, что в нормальных условиях большинство резидентных макрофагов происходят из эмбриональных предшественников желточного мешка [162]. В некоторых органах, например в почках и легких, макрофаги имеют химерное происхождение и представлены популяциями, берущими начало из желточного мешка и костного мозга [8]. Численность тканевых макрофагов в норме поддерживается за счет пролиферации. Однако в патологических условиях пролиферативного потенциала резидентных макрофагов становится недостаточно, и для пополнения пула тканевых макрофагов из кровеносного русла рекрутируются моноциты, которые в дальнейшем дифференцируются в макрофаги по мере миграции в поврежденную ткань [73, 250].

В зависимости от условий тканевого микроокружения макрофаги способны приобретать разный фенотип, отражающий их функциональную направленность. Выделяют два основных подтипа макрофагов, обозначаемых как M1- и M2-макрофаги, проявляющие противоположные свойства. Считается, что макрофаги

M1, или классически активированные макрофаги, активно стимулируют и поддерживают воспалительную реакцию, направленную на борьбу с патогенами. M1-макрофаги активируются под действием лигандов толл-подобных рецепторов (TLR), таких как ИФН- γ или ЛПС бактерий. В активации M1-макрофагов принимают участие транскрипционные факторы NF- κ B, STAT1 и IRF5, которые взаимодействуют друг с другом, усиливая экспрессию воспалительных генов. Макрофаги M1 продуцируют воспалительные цитокины фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), ИЛ-1, реактивные формы азота и кислорода и стимулируют другие клетки-эффекторы воспаления, такие как Th1 и Th17, за счет продукции ИЛ-12 и ИЛ-23 [156, 166, 239, 250]. Среди факторов, приводящих к активации M2-макрофагов, или альтернативно активированных макрофагов, выделяют ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13, глюкокортикоиды, которые передают сигнал с помощью транскрипционных факторов STAT3, STAT6, IRF4 и PPAR γ . M2-макрофаги обладают противовоспалительными свойствами и участвуют в ремоделировании тканей, ангиогенезе и прогрессировании опухолей [84, 156, 166].

Разделение макрофагов на M1 и M2 часто используется в литературе и является полезным, однако необходимо помнить, что в действительности мы имеем дело с континуумом или, иными словами, непрерывным спектром фенотипов [84]. M1 и M2 являются крайними точками этого спектра. Для адекватного иммунного ответа и восстановления целостности ткани требуется тонкая регуляция соотношений популяций M1- и M2-макрофагов. Когда провоспалительная активность M1-макрофагов становится излишней, часть из них изменяет свой фенотип в сторону M2 [156, 164], который предотвращает повреждение ткани от чрезмерной воспалительной реакции и обеспечивает своевременную репарацию. В действительности фенотипический профиль макрофагов не ограничивается фенотипами M1 и M2 [126, 237], и в настоящее время такая дихотомическая классификация подвергается пересмотру. Однако дихотомическая классификация является более удобной для исследования в экспериментах *in vitro*.

В настоящее время накопленные данные заставили расширить границы упрощенной дихотомической классификации [14, 210, 221]. Так, среди M2-

макрофагов выделяют подгруппы: M2a, M2b, M2c и M2d [133]. Подгруппы M2a, M2c характеризуются присутствием аргиназы 1 типа [25, 48, 57, 106]. M2-макрофаги экспрессируют скавенджер-рецепторы CD163 на клеточной поверхности, которые распознают комплексы гаптоглобин-гемоглобин и используются для идентификации M2-макрофагов. M2d-субпопуляция макрофагов участвует в процессах ангиогенеза, продуцируя интерлейкин-10 (ИЛ-10) и фактор роста эндотелия сосудов [83, 200, 218].

При изучении пула макрофагов в ряде исследований авторы выделяют шесть дополнительных субпопуляций: регуляторные (Mreg), гематофаг-ассоциированные (Mha), окислительные (Mox), макрофаги M3, M4 и M17 [102, 129, 180, 254]. Популяция Mreg, отвечая на стимуляцию регуляторных Т-клеток, индуцирует процессы репарации, а также ингибирует выработку провоспалительных цитокинов в поврежденной ткани [61, 105, 234]. Макрофаги Mox отличаются от других типов клеток экспрессией окислительного фосфолипида 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (ОхРАРС), гемоксигеназы-1 и сульфиредоксины-1 [21, 121, 139]. Макрофаги данного типа оказывают влияние на запуск окислительных реакций [21, 121, 139]. M3-макрофаги известны как коммутирующие макрофаги, появление которых зависит от переключения между подтипами M1 и M2 [142]. M4-макрофаги также относятся к группе недавно идентифицированных клеток [48, 144]. M4-макрофаги дифференцируются в присутствии CXCL4. Маркерами данного типа макрофагов являются CD206, CD68, MMP7, MMP12 и S100A8. Данные клетки продуцируют ИЛ-6, ФНО- α , а также CCL18 и CCL20 [23, 223]. Макрофаги M4 высоко экспрессируют рецептор липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), при хронических поражениях данные клетки образуют большое количество пенистых клеток, которые вовлекаются в воспалительный процесс [89, 96, 143]. Образование M17-макрофагов, предположительно, вызвано кортикостероидами, гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ) или ИЛ-10. Ключевой особенностью M17-макрофагов является обретение устойчивости к апоптозу после взаимодействия ИЛ-17 [107].

Таким образом, фенотип и свойства макрофагов динамичны и напрямую зависят от сигналов, поступающих из микроокружения. В этом выражается фенотипическая и функциональная пластичность макрофагов, обуславливающая ключевую роль этих клеток в поддержании тканевого гомеостаза. Очевидно, что разнообразные “поломки” механизмов поддержания баланса между функциональными подтипами макрофагов могут иметь значимую роль в этиологии и патогенезе многих заболеваний. Так, на сегодняшний день показано, что макрофаги играют ведущую роль в организации и течении хронического воспаления и связанных с ним патологий [7, 164], таких как атеросклероз, ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника, бронхиальная астма, онкологические заболевания и др. [174, 250].

Моноциты и макрофаги входят в группу клеток, именуемых системой мононуклеарных фагоцитов, к которым также относятся дендритные клетки. Как и резидентные макрофаги, моноциты участвуют в поддержании тканевого гомеостаза, ответа на микробные патогены и разрешении этого ответа.

Моноциты человека экспрессируют антиген МНС класса II HLA-DR, интегрин α M (CD11b) и CD86. Однако в последние десятилетия было накоплено множество данных, свидетельствующих о том, что вышедшие в периферическую кровь моноциты так же, как и макрофаги, не однородны по фенотипу и свойствам [165]. В 2010 году была утверждена классификация моноцитов на основании экспрессии ими молекул CD14 (рецептора к ЛПС) и CD16 (Fc γ RIII, компонент рецептора к IgG). В данную классификацию вошли 3 группы: классические (CD14+CD16-), промежуточные (CD14+CD16+) и неклассические (CD14-CD16+) моноциты [3].

Моноциты происходят из моноцитарных предшественников костного мозга, где они дифференцируются и приобретают определенный фенотип, после чего выходят в кровеносное русло. Выход моноцитов из костного мозга в кровь, а позже из крови в ткани происходит под действием хемокинов – CCL2, CCL7, CCL12. Механизмы, лежащие в основе тканеспецифических различий в рекрутировании

моноцитов, остаются неясными, но они, вероятно, зависят от молекулярных сигналов, поступающих из тканей [165].

Судьба моноцитов после их выхода в ткани пока остается не ясной. Как уже было сказано, находясь в тканях, моноциты могут дифференцироваться в макрофаги, пополняя таким образом пул тканевых макрофагов. С другой стороны, есть данные о том, что моноциты, пришедшие в ткань, могут не подвергаться дифференцировке и при этом реализовывать свои функции [165]. Существуют исследования, показывающие, что неклассические моноциты после выхода из циркулирующего русла в определенных условиях окружения дают начало альтернативно-активированным макрофагам и проявляют противовоспалительные свойства [165]. Кроме того, необходимо помнить, что моноциты также способны дифференцироваться в дендритные клетки [165].

Так или иначе, механизмы, определяющие судьбу моноцитов, остаются малоизученными и ожидается, что весомый вклад в их исследование внесут протеомный и транскриптомный анализ моноцитов, макрофагов и дендритных клеток, включая их субпопуляции.

1.2 Роль моноцитов и макрофагов в патогенезе злокачественных новообразований

В настоящее время установлено, что в патогенезе злокачественных новообразований чрезвычайно важную роль играет опухолевое микроокружение и сопутствующая воспалительная реакция. В результате воспаления, возникающего в опухолевом микроокружении, выделяются факторы, необходимые для роста и пролиферации опухолевых клеток, а также вещества, способствующие ангиогенезу, инвазии, метастазированию и уклонению опухоли от иммунного надзора [93, 225].

Опухолевое микроокружение включает в себя клеточные компоненты, факторы роста, протеазы, кровеносные и лимфатические сосуды и внеклеточный матрикс [225]. Благодаря согласованным действиям между клетками опухоли и

внутриопухолевыми стромальными клетками, строма подвергается “обучению” опухоли, или “репрограммированию”. Это происходит за счет локального выделения опухолью различных биологически активных веществ, которые становятся паракринными регуляторами функций стромальных клеток. Клетки стромы становятся “активированными” и приобретают проопухолевый фенотип, вовлекаясь в канцерогенез. Репрограммированная строма вносит вклад в воспаление, иммуносупрессию, резистентность опухоли к терапии и формирование так называемых метастатических ниш. К таким активированным опухолью элементам стромы относятся и макрофаги, которые становятся ОАМ [225]. ОАМ, как и тканевые макрофаги, могут иметь двойственное происхождение, то есть возникать из резидентных макрофагов или из циркулирующих моноцитов [126]. В сформировавшейся опухоли ОАМ стимулируют миграцию, инвазию и интравазацию опухолевых клеток, а также необходимый для роста опухоли ангиогенез [152].

Однако влияние опухоли на фенотип и функции миелоидных клеток начинается еще на этапе миелопоэза. Неопластические клетки вместе с опухолеассоциированными стромальными клетками выделяют множество растворимых факторов, нарушающих нормальное развитие миелоидного компартмента. Такие цитокины, как ГМ-КСФ, макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), фактор стволовых клеток (SCF, известный также как KIT ligand), VEGF и ИЛ-3 способствуют миелопоэзу и частично блокируют созревание миелоидных клеток. Секретируемые опухолью провоспалительные факторы (ИЛ-1 β , ИЛ-6, S100A8, S100A9), а также цитокины, высвобождаемые активированными Т-лимфоцитами (ИНФ γ , ИЛ-4, ИЛ-10 и ИЛ-13), способствуют превращению незрелых миелоидных клеток в миелоидные супрессорные клетки (МСК), а затем ведут к их дифференцировке в иммуносупрессивные макрофаги и дендритные клетки [84].

Опухолевые клетки способны продуцировать хемокины CCL2, CCL5, CCL22 привлекающие регуляторные Т-клетки, МСК и ОАМ. Происходит накопление этих

клеток в опухоли и угнетение противоопухолевого Т-клеточного иммунитета [84, 193] посредством механизмов, описанных ниже. В рекрутировании незрелых миелоидных клеток в очаг опухоли также принимают участие факторы CCL12, CXCL5, прокинетицин 2 (PROK2), S100A8 и S100A9. Высокая степень инфильтрации опухолевой ткани именно миеломоноцитарными клетками объясняется, в частности, и тем, что CCL2 в опухолевом микроокружении нередко присутствует в нитрированной или нитрозилированной форме, способной привлекать незрелые миелоидные клетки, но не CD8⁺ Т-лимфоциты [40].

Формирование и развитие опухоли тесно связано с локальной гипоксией и воспалением [80], необходимым для привлечения клеток моноцитарно-макрофагальной линии [166], причем ключевую роль в этом процессе играют провоспалительные медиаторы CCL2 и плазминоген [84, 225].

Попав в опухолевое окружение, макрофаги подвергаются воздействию множества регуляторных сигналов, поступающих одновременно из разных источников. Это ведет к фенотипическим и функциональным изменениям этих клеток, определяющим их дальнейшую роль. Влияние опухоли на поляризацию макрофагов может быть прямым и опосредованным.

К факторам, продуцируемым самой опухолью и участвующим в поляризации макрофагов, относят ФНО, связанный с индукцией экспрессии у макрофагов скавенджер-рецепторы I и II типов, простагландин E2 (PGE2). Продуцируемые клетками опухоли компоненты внеклеточного матрикса, ИЛ-10, CSF-1 и хемокины (CCL2, CCL18, CCL17 и CXCL4), способствуют переходу макрофагов в сторону M2 [166]. Кроме того, было показано, что клетки опухоли непосредственно вызывают экспрессию в макрофагах ИЛ-10, ИЛ-1 β , CCL5, CCL22, MMP-7, MMP-9, CD206 (маннозный рецептор) и CD163 (scavenger receptor) [84, 103].

Опосредованная регуляция свойств макрофагов осуществляется с участием других компонентов опухолевого микроокружения. В экспериментах *in vivo* было продемонстрировано, что поляризация и функции макрофагов внутри опухоли подвержены влиянию Т- и В-лимфоцитов, за счет продукции ими ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13, ИНФ γ , ФНО α и иммуноглобулинов [201]. Так, Th2-лимфоциты направляют

поляризацию ОАМ в сторону М2-фенотипа. В-лимфоциты вызывают снижение продукции макрофагами ФНО, ИЛ-1 β и ССЛ3 и усиливают продукцию ими ИЛ-10, что ведет к проявлению проопухолевых свойств макрофагов. Регуляторные Т-клетки также вносят вклад в функции опухолевых макрофагов. Они за счет продукции ИЛ-4, ИЛ-10 и ИЛ-13 способствуют дифференцировке классических моноцитов в сторону М2-макрофагов, ингибируя их ответ на ЛПС и усиливая экспрессию CD206 и CD163 [84, 165].

Исследования взаимосвязи фенотипических особенностей макрофагов и их функциональных особенностей в патогенезе опухоли демонстрируют, что М1-макрофаги осуществляют протективную роль, активируя механизмы направленные на уничтожение опухоли и выступая в качестве антагониста проопухолевых М2-макрофагов, ОАМ, МСК и регуляторных макрофагов. С другой стороны, известно, что на этапе формирования опухоли постоянная активация М1-макрофагов может привести к повреждению тканей и тем самым способствовать процессу злокачественной трансформации [5]. ОАМ, в свою очередь, имеют М2-подобный фенотип [172]. Однако, обладая присущей всем макрофагам фенотипической пластичностью, ОАМ часто экспрессируют маркеры, характерные для обоих типов поляризации [67]. Однако в непрогрессирующих или регрессирующих опухолях ОАМ часто проявляют М1-подобный фенотип, реализуя свои провоспалительные свойства и участвуя в лизисе опухолевых клеток [239].

ОАМ опосредуют свои проопухолевые эффекты за счет иммунных и неиммунных механизмов [156]. Неиммунный механизм включает в себя участие в ангиогенезе, инвазии опухолевых клеток и их метастазировании [84, 156].

Критическим этапом для роста опухоли или прогрессии метастазов является так называемое ангиогенное переключение, которое заключается в увеличении количества сосудов на единицу объема ткани, то есть плотности сосудистой сети. Примечательно, что нередко повышенная плотность сосудистой сети и экспрессия проангиогенных факторов выявляется еще на этапе предопухолевых изменений в легочной ткани [188]. Резидентные и рекрутированные клетки-участники воспаления, в особенности макрофаги, играют неоспоримо важную роль в данном

процессе [188, 250]. Клетки миелоидного ряда, в том числе моноциты и макрофаги, в большом количестве присутствуют в опухолях и секретируют VEGF-A, основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, bFGF), тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor, PDGF), плацентарный фактор роста (placental growth factor, PIGF) и белок Bv8 (PROK2), что вносит значительный вклад в ремоделирование сосудистой сети опухоли во и её прогрессии. Помимо VEGF, в процессе ангиогенеза может принимать участие белок Bv8 [225, 250]. Хотя макрофаги не обязательно являются доминирующим источником VEGF-A в опухолевой ткани, специфическая делеция VEGF-A в макрофагах показала их роль в формировании аномальных сосудистых фенотипов в опухоли, влияющих на гемодинамику опухоли и доставку лекарственных препаратов [201].

Многие авторы выделяют отдельную ангиогенную субпопуляцию ОАМ, экспрессирующих рецептор к ангиопоэтину 2 (TIE2) [250]. В различных экспериментальных моделях абляция этой популяции макрофагов подавляла ангиогенез опухоли и, как следствие, ее рост и метастазирование [171, 231]. Было показано, что периваскулярно расположенные TIE2+ ОАМ вовлечены в рецидив рака легкого (РЛ) после химиотерапии [62].

Миелоидные клетки также секретируют протеазы, участвующие в деградации внеклеточного матрикса, что способствует высвобождению и распространению ангиогенных факторов, миграции эндотелиальных клеток и опухолевой инвазии. К таким протеазам относятся матриксные металлопротеиназы MMP-2, MMP-7, MMP-9 и урокиназный активатор плазминогена (urokinase-type plasminogen activator, uPA). ОАМ также секретируют цистеиновые протеазы (катепсины), поддерживающие рост опухоли и придающие ей резистентность к терапии [225, 250].

Иммунный механизм проопухолевого действия ОАМ подразумевает блокировку противоопухолевого иммунитета за счет нарушения активации Т-клеток и ослабления реакций врожденного иммунитета, опосредованного M1-макрофагами. ИЛ-12, продуцируемый M1-макрофагами, стимулирует активацию NK-клеток и Th1-лимфоцитов, которые, в свою очередь, стимулируют активность

цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Однако, как известно, ОАМ, имеющие М2-подобный фенотип, лишь в небольших количествах секретируют ИЛ-12, поэтому их вклад в активацию NK и Th1-клеток минимален. Напротив, ОАМ в большом количестве выделяют ИЛ-10, участвующий в развитии Th2-клеток, которые не поддерживают ЦТЛ-опосредованные реакции, но продуцируют ИЛ-4 и ИЛ-13, что способствует развитию самих ОАМ и их большей поляризации в сторону М2-фенотипа [8]. ОАМ совместно с самими опухолевыми клетками также выделяют CCL22, являющийся хемокином для регуляторных Т-клеток, ингибирующих активацию Т-клеток [84, 193].

Помимо вышесказанного, ОАМ способны напрямую индуцировать апоптоз Т-клеток за счет экспрессии PD-L1, который связывается с соответствующим рецептором PD1 (programmed cell death 1) на активированных Т-лимфоцитах. Свой вклад в иммуносупрессию ОАМ вносят за счет продукции PGE2 и ТФР- β [103]. Кроме того, находясь в условиях опухолевого микроокружения, макрофаги становятся неспособными эффективно осуществлять свою антигенпрезентирующую функцию, необходимую для активации адаптивного иммунного ответа [84, 193].

Еще одним важным аспектом прогрессирования злокачественных новообразований является их склонность к инвазии и метастазированию. Метастазирование представляет собой сложный процесс, в ходе которого опухолевыми клеткам необходимо покинуть первичный опухолевый очаг, попасть в циркуляторное русло, выжить во время циркуляции и покинуть сосудистую сеть, после чего осуществить колонизацию нового участка [215].

Макрофаги и их моноцитарные предшественники вовлечены во все стадии метастазирования опухоли. Так, на моделях развития опухолей у мышей с деплецией макрофагов или их репрограммированием метастатическая нагрузка на конечной стадии была снижена. Прямым доказательством прометастатической роли макрофагов являются исследования, в которых продемонстрирована миграция неопластических клеток в ответ на секретируемые макрофагами молекулы [201].

Как было упомянуто выше, одним из механизмов, за счет которых ОАМ способствуют метастазированию опухоли, является продукция матриксных металлопротеиназ, катепсинов, uPA, а также матрикс-ремоделирующих ферментов, таких как лизилоксидаза. Перечисленные энзимы расщепляют внеклеточный матрикс, тем самым освобождая путь для опухолевых клеток и факторов (например, гепарин-связывающий EGF, HB-EGF), способствующих инвазии опухолевых клеток и метастазированию [250].

Как известно, опухоли имеют склонность метастазировать в определенные участки или органы. Существуют данные, свидетельствующие о том, что подготовка опухоли так называемых “преметастатических ниш” к принятию циркулирующих опухолевых клеток происходит с участием миелоидных клеток, экспрессирующих CD11b и VEGFR1 [250].

Моноцитам, как и макрофагам, в настоящее время присваивают важную регуляторную роль в развитии и прогрессии рака [165]. Существуют клинические исследования, показывающие, что у пациентов со злокачественными новообразованиями наблюдается повышенное количество моноцитов, циркулирующих в периферической крови [165].

Вклад моноцитов в патогенез опухоли прежде всего связан с продукцией ими цитокинов и хемокинов, поддерживающих хроническое воспаление и рекрутирующих новые популяции иммунных клеток [165]. Кроме того, моноциты могут становиться источником опухолиассоциированных макрофагов и дендритных клеток, формирующих опухолевое микроокружение [165].

Рекрутирование моноцитов в очаг опухоли имеет отрицательную взаимосвязь с инфильтрацией опухолевой ткани CD8⁺ лимфоцитами. Так, ингибирование CCR2 или CSF1R предотвращает накопление клеток, происходящих из моноцитов, в опухолях поджелудочной железы, печени и меланоме, что связано с инфильтрацией большего количества CD8⁺ Т-клеток и снижением роста опухоли [42, 214]. В одной из работ было обнаружено, что мыши с дефицитом CCR2 имеют больше инфильтрирующих опухоль CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, но не имеют различий в составе Т-клеток лимфатических узлов,

дренирующих опухоль [45]. В этих исследованиях дефицит CCR2 не влиял на рост подкожно имплантированной меланомы и опухоли легких, что позволяет предположить, что некоторые опухоли могут в меньшей степени зависеть от моноцитарного источника создания противоопухолевого иммунитета [165].

Подобно макрофагам, значительный вклад в развитие злокачественных новообразований вносит популяция ангиогенных TIE2⁺ моноцитов, рекрутируемых в опухоль. Считается, что такие моноциты уже на уровне циркуляции готовы к выполнению проангиогенной функции, так как у них была отмечена высокая экспрессия MMP-9, факторов группы VEGF и др. Существует гипотеза, согласно которой опухоль, подобно тому, как она перепрограммирует свое микроокружение, способна выделять растворимые факторы в кровь, оказывая на клетки миелоидного ряда дистанционный эффект [86, 170]. В результате такого воздействия моноциты могут приобретать макрофагоподобный фенотип и участвовать в выполнении функций, присущих ОАМ [86]. Тем не менее вопрос о том, способны ли моноциты непосредственно поддерживать ангиогенез или в первую очередь им необходимо дифференцироваться в макрофаги, остается неясным и требует дальнейшего исследования [165]. При этом известно, что не только наличие опухоли влияет на свойства моноцитов, но также и гистологический подтип опухоли. Это объясняется тем, что разные по происхождению опухоли секретируют различные факторы, модулирующие функции моноцитов [3].

Как было сказано выше, в условиях патологического процесса моноциты периферической крови становятся источником восполнения популяции тканевых макрофагов. Это наблюдение относится и к развитию злокачественных новообразований. Существуют данные, подтверждающие, что ОАМ в первичных опухолевых узлах и в метастазах происходят из моноцитов-предшественников [3], которые чаще всего имеют фенотип классических моноцитов [165]. Предполагается также, что свойства таких моноцитов-предшественников могут в дальнейшем определять и функции тканевых макрофагов в очаге опухоли. Однако до сих пор остается неизвестным, насколько значим вклад моноцитов

периферической крови в пополнение пула ОАМ [3]. Даже в том случае, когда в очаг опухоли поступает моноцит, способный оказывать противоопухолевое воздействие, клетки новообразования используют механизмы ускользания от этого воздействия. Например, опухолевые клетки способны защищаться от фагоцитоза посредством экспрессии CD47. Высокий уровень экспрессии CD47 опухолевыми клетками ассоциирован с неблагоприятным исходом заболевания при многих типах рака, включая рак яичников, глиобластому и НМРЛ. У пациентов с НМРЛ избегание клетками опухоли фагоцитоза с участием CD47 также имеет критическую роль в метастазировании рака [165].

Неклассическим моноцитам приписываются преимущественно противоопухолевые свойства [165]. Они, проникая в метастатические очаги, поглощают клетки опухоли и выделяют регуляторные факторы, активирующие противоопухолевый иммунитет, в частности, рекрутируют НК-клетки. Однако одновременно с этим отмечена роль неклассических моноцитов и в усилении ангиогенеза в первичном опухолевом узле [165].

Таким образом, становится очевидным, что злокачественная опухоль и ее микроокружение оказывают непосредственное влияние на клетки моноцитарно-макрофагального ряда, начиная с их созревания из предшественников и заканчивая определением статуса тканевых макрофагов. Описанные данные демонстрируют, что существуют тесные и сложные взаимосвязи внутри самой системы мононуклеарных фагоцитов. Изучение биологических механизмов таких взаимосвязей и путей их пересечения с патогенезом опухоли позволит расширить наши знания о роли клеток врожденного иммунитета в канцерогенезе, о причинах осложнений и рецидива злокачественных новообразований, а также их резистентности к терапии. В то же время известны множественные эффекты, которые моноциты и макрофаги могут оказывать на все этапы канцерогенеза и прогрессии опухоли, причем эти эффекты зачастую ассоциированы с их фенотипом. Однако функциональные характеристики макрофагов настолько разнообразны, что не сводятся к отдельным фенотипическим подкатегориям, идентифицируемым исключительно по поверхностным маркерам. Для понимания

закономерностей модуляции свойств моноцитарно-макрофагальных клеток в зависимости от условий окружения необходимо их тщательное исследование на молекулярном, генетическом и эпигенетическом уровнях.

1.3 Предопухолевые изменения бронхиального эпителия и их место в патогенезе немелкоклеточного рака легкого

Рак легкого развивается на фоне тех или иных предопухолевых изменений эпителия. С точки зрения гистологии выделяют различные варианты предопухолевых изменений для разных типов РЛ. При этом считается, что большинство аденокарцином легкого возникают в его периферических отделах и непосредственно легочной паренхиме, в то время как в центральных отделах легкого формируются плоскоклеточные карциномы [159].

Предопухолевые изменения в бронхиальном эпителии развиваются до тех пор, пока базальная мембрана остается интактной [177]. Классификация ВОЗ 2021 года включает следующие виды предопухолевых поражений в легких: атипичная аденоматозная гиперплазия (ААГ); аденокарцинома *in situ*; плоскоклеточная карцинома *in situ*; плоскоклеточная дисплазия легкой (I), умеренной (II) и тяжелой (III) степеней; диффузная идиопатическая гиперплазия нейроэндокринных клеток [217]. Морфологическая картина перечисленных состояний описана во многих работах [56, 122, 248].

На сегодняшний день установлены и описаны последовательные предопухолевые изменения для центрально расположенных плоскоклеточных карцином. Однако для остальных распространенных типов РЛ пренеопластические процессы остаются мало изученными. Единственные идентифицированные морфологические изменения, предшествующие развитию инвазивной аденокарциномы легкого, включают в себя ААГ и аденокарциному *in situ* [124, 159, 248], которую раньше именовали как бронхоальвеолярный рак. ААГ чаще всего обнаруживается при аденокарциноме легкого, однако реже она может встречаться и при других типах рака [36], поэтому вопрос о том, какова точная

последовательность морфологических изменений, приводящая к развитию аденокарциномы легкого, остается открытым.

Разница в объеме сведений о предопухолевых поражениях центральных и периферических опухолей легкого объясняется тем, что бронхиальный эпителий в крупных бронхах доступен для бронхоскопии и взятия биопсийного материала. На сегодняшний день существует большое количество высокочувствительных бронхоскопических методов, таких как аутофлюоресцентная бронхоскопия, узкоспектральная визуализация и др., позволяющих весьма эффективно обнаруживать непосредственно пораженные участки в эпителии бронхов [229].

Как уже упоминалось, четкая последовательность предопухолевых изменений бронхиального эпителия на сегодняшний день выявлена только для плоскоклеточного РЛ. Важно отметить, что в норме воздухоносные пути не содержат плоских эпителиальных клеток. Более того, клетки-предшественники или стволовые клетки плоского метапластического эпителия не идентифицированы. Высказывается предположение, что базальные клетки в крупных дыхательных путях начинают проявлять плюрипотентные свойства после воздействия повреждающих факторов, например сигаретного дыма, что приводит к образованию метапластических и диспластических изменений, которые, в свою очередь, функционируют как предшественники плоскоклеточного рака [124]. Последовательность морфологических изменений в бронхиальном эпителии, предшествующих формированию плоскоклеточной карциномы, включает в себя БКГ, плоскоклеточную метаплазию (ПМ), дисплазию трех степеней тяжести и карциному *in situ* (carcinoma *in situ* – CIS) [177, 248]. Таким образом, БКГ и ПМ – одни из первых морфологически идентифицируемых изменений бронхиального эпителия. Среди перечисленного к поражениям с высоким потенциалом малигнизации относят плоскоклеточную тяжелую дисплазию и CIS [177].

Показано, что БКГ, ПМ и дисплазия, с одной стороны являющиеся ступенями одного процесса, могут обнаруживаться одновременно в одном и том же бронхе, и возможны различные сочетания этих изменений [2, 191]. Помимо этого, существуют данные о том, что БКГ, ПМ и дисплазия могут развиваться вне того

континуума, который рассматривают в качестве предопухолевого процесса для плоскоклеточного РЛ. То есть эти морфологические изменения могут развиваться независимо друг от друга в разных участках бронхов [179]. В то же время известно, что все эти состояния, за исключением дисплазии тяжелой степени, выступая в качестве реактивных процессов, возникающих в ответ на повреждение респираторного эпителия и воспаление, могут подвергаться обратному развитию [82]. Однако на сегодняшний день отсутствуют однозначные критерии, позволяющие предсказать вероятность трансформации или регрессии этих изменений и определить скорость их развития. Кроме того, по-прежнему существует необходимость в определении маркеров перехода тяжелой дисплазии в плоскоклеточную карциному.

Так, например, Ponticiello et al. продемонстрировали, что среди пациентов с дисплазией I, II и III степеней в течение 4 лет происходила ее прогрессия и озлокачествление в 25, 50 и 75% случаев соответственно, однако статистически значимой взаимосвязи между степенью дисплазии и ее малигнизацией выявлено не было [168]. В другом исследовании, выполненном Breuer et al. [226], было показано, что у 9% пациентов из группы с ПМ и у 9% из группы с дисплазией I/II степени наблюдалась прогрессия изменений до CIS или плоскоклеточного рака, а в группе с тяжелой дисплазией – у 32%. Регрессия же наблюдалась у 42, 64 и 52% пациентов в группах с ПМ, дисплазией I/II степени и дисплазией III степени соответственно.

В последнее время появляются сведения о том, что прогностическую роль при РЛ могут играть не только сами отдельно выявленные предопухолевые изменения, но и их сочетания. Существует предположение, что изолированная БКГ может свидетельствовать об остановке предракового процесса, однако ее обнаружение в сочетании с ПМ – о прогрессии. Аналогично выявленное сочетание ПМ и дисплазии говорят о трансформации метаплазии в дисплазию [179]. Такое представление подтверждается тем, что БКГ в сочетании с ПМ в тканях, прилежащих к НМРЛ, часто приводит к рецидиву заболевания, в отличие от изолированной БКГ [191], а дисплазия в сочетании с ПМ чаще прогрессирует в рак,

чем изолированная дисплазия. При этом изолированная дисплазия в большом проценте случаев подвергается регрессии [4]. Известно также и то, что скорость спонтанной регрессии дисплазии, даже высокой степени, значительно выше (>50%), чем для CIS (~13%) [159].

Существуют работы, показывающие, что предопухолевые изменения в бронхиальном эпителии на отдалении от первичного опухолевого узла могут служить предикторами рецидива РЛ. Так, изолированная БКГ ассоциирована с повышенным риском отдаленного метастазирования и с меньшей вероятностью локорегионального рецидива [178]. Напротив, сочетание БКГ и ПМ ассоциировано с высокой вероятностью локального рецидива и низким риском отдаленных метастазов [161, 191].

Суммируя вышесказанное, можно обобщить, что каждое из предопухолевых изменений РЛ может подвергаться прогрессии, регрессии или же оставаться неизменным. Однако, чем тяжелее степень изменений, тем выше вероятность их прогрессии, которая в итоге может привести к малигнизации [16]. Сроки трансформации пренеопластических процессов из одного в другой варьируют от нескольких месяцев до нескольких десятилетий [179]. Предсказать скорость и характер этих изменений до сих пор невозможно. Несомненно, подробное исследование течения предопухолевых процессов позволит прогнозировать вероятность и сроки развития РЛ, его исходов и осложнений, а также разработать превентивные меры, которые в будущем помогут спасти жизни миллионам пациентов.

Пролить свет на происхождение и значимость различных сочетаний предопухолевых изменений в развитии инвазивной опухоли и ее осложнений может тщательное исследование микроокружения как в самой опухоли, так и в участках тканей, прилегающих к ней. Особо важное значение в этом контексте принимает хроническое воспаление, сопровождающееся формированием и развитием предопухолевых изменений [159, 189], а в последующем и канцерогенеза [93]. Давно известно, что хроническое воспаление формирует благоприятные условия для развития опухоли за счет усиления местных

пролиферативных и регенераторных процессов, которые становятся основой для накопления молекулярных, генетических и эпигенетических нарушений в клетках. К моменту формирования опухолевого очага связь между малигнизированными клетками и процессами воспаления становится двусторонней, то есть сама опухоль начинает влиять на микроокружение, трансформируя его под свои нужды [93].

Канцерогенез в бронхиальном эпителии не является исключением. Хроническое воспаление дыхательных путей характерно для хронической обструктивной болезни легкого (ХОБЛ), бронхиальной астмы, хронического бронхита, фиброза легкого и других нозологических форм. Существуют убедительные доказательства того, что хроническое легочное воспаление ассоциировано с более высоким риском развития предопухолевых изменений бронхиального эпителия и РЛ [35, 230]. На сегодняшний день известно, что особенности воспаления, предшествующего развитию РЛ и сопровождающего его, не случайны и могут служить предикторами течения, исходов и осложнений заболевания. При этом имеют значение как показатели местного [119, 225, 230], так и системного воспаления [184, 233].

В связи с вышесказанным становится очевидной необходимость тщательного изучения взаимодействий между воспалительными процессами в легких с развитием предопухолевых изменений и их трансформацией в злокачественную опухоль. Детальное понимание того, как влияют друг на друга хроническое воспаление, опухоль и ее микроокружение, позволит усовершенствовать раннюю диагностику легочных патологий, обладающих высоким риском малигнизации, разработать новые прогностические модели и выявить молекулярные мишени для ранней терапии, предотвращающей или задерживающей развитие РЛ.

1.4 Генетические полиморфизмы при НМРЛ и их связь со свойствами клеток моноцитарно-макрофагальной линии

Функционально-фенотипические характеристики макрофагов, как и любых других клеток, детерминированы на генетическом и эпигенетическом уровнях. Это

подтверждается работой Italiani et al., где авторы с помощью транскриптомного анализа на кинетической модели воспаления *in vitro* выявили гены, экспрессия которых изменялась в ходе приобретения клетками M1- и M2-типа поляризации. Так, для фенотипа M1 была характерна активация генов *IL12B*, *PTX3*, *CCL4*, *IL1RN*, *TNF*, *IL6*, *CCL20*, *IL1A*, *ICAM1*, *NFKB1*, *TRAF1*, *SERPINB9*, *IL1F9*, *MAFF*, *CXCL1*, *DRAM*, *TNIP3*, *CCL2*, *SLAMF7*, *CCR7*, *TNFAIP6*, в отличие от генов *P2RY5*, *FGL2*, *CD1D*, экспрессия которых была ингибирована. Аналогично в клетках с M2-поляризацией наблюдалось повышение регуляции генов *TREM2*, *A2M*, *NUPR1*, *CIQA*, *MS4A4A*, *APOE*, *APOC1*, *ADORA3* в сочетании со снижением регуляции генов *FCER1A*, *LGALS2*, *PF4*, *CD69*, *CD93*, *NR4A2*, *VCAN*, *CD62L*, *ICAM3*, *NLRP3*, *ERGI* [238].

Объединив полученные данные с имеющимися представлениями о значимости макрофагов и хронического воспаления в развитии НМРЛ, можно предположить наличие тех или иных ассоциаций между фенотипическими признаками клеток моноцитарно-макрофагального ряда и генетическими особенностями пациентов с НМРЛ.

Спектр соматических мутаций при НМРЛ хорошо изучен. Известны многие драйверные мутации в бронхиальном эпителии, характерные для опухолей многих локализаций, затрагивающие гены *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *PIK3CA*, *KRAS*, *ROS1*, *MET*, *RET*, *TP53*, *RBI* и др. [124, 163, 170]. Связь некоторых молекулярных маркеров с прогрессированием и неблагоприятным прогнозом НМРЛ была обнаружена в ряде исследований. Так, риск метастазирования был выше у больных I и II стадии с гиперэкспрессией cyclin E [55] и рецепторов тирозинкиназ (RTK): *IR*, *NTRK1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *PDGFR-β*, *FGFR1* и *LTK* [104]. Напротив, экспрессия *EPHB6* или *DKFZ1* ассоциирована с низкой вероятностью метастазирования [104]. В других исследованиях показано, что гиперэкспрессия генов тимозина β4 и фактора инициации трансляции эукариот 4A1 (*eIF4A1*) [141], хемокиновых рецепторов *CXCR4* и *CXCR7* [95], а также *MCRS1* и *SPOCK1* [211, 221] чаще наблюдается у больных НМРЛ с гематогенными метастазами. Метастазирование НМРЛ в головной мозг, а также общая выживаемость и выживаемость без

прогрессирования заболевания связана с экспрессией гена *GAP43*. В исследовании *in vitro* показано, что *GAP43* стимулирует миграцию клеток через активацию Ras1 и предотвращение деполимеризации F-актина [252]. Для прогнозирования отдаленного метастазирования НМРЛ предложена сигнатура, основанная на оценке экспрессии 4 генов мезенхимальных стволовых клеток (*GREM1*, *LOXL2*, *ADAMTS12*, *ITGA11*) [190]. Лимфогенное метастазирование у больных НМРЛ ассоциировано с гиперэкспрессией генов *hMTH1*, *SPD*, *ITGA11*, *COL11A1* [92], *CXCR4*, *CXCR7*, *CXCL12* [41, 50] и *PRMT5* [186]. Согласно литературным данным, *PRMT5* усиливает миграцию и инвазию клеток рака лёгкого через активацию *FGFR3* (за счет подавления miR-99) и стимулирует метастазирование НМРЛ [186]. В других исследованиях показано, что лимфогенное метастазирование и худшая безрецидивная выживаемость пациентов с аденокарциномой лёгкого ассоциированы с повышенной экспрессией генов *MACC1* [130] и *MTA2* [252]. Недавняя работа указывает на вовлеченность гипоэкспрессии фактора специфичности расщепления и полиаденилирования 3 (*CPSF3*) в метастазирование в лимфатические узлы и уменьшение общей и безрецидивной выживаемости у пациентов с НМРЛ [52]. Однако на формирование, течение и исход злокачественного новообразования, являющегося по своей сути многофакторным заболеванием, в значительной степени влияет уже имеющийся наследственный генетический ландшафт, который может как способствовать, так и препятствовать опухолевой прогрессии.

Для оценки генетических полиморфизмов часто используют такие показатели, как однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP) и вариации числа копий (copy number variation, CNV). SNP представляют собой главную, наиболее часто встречающуюся форму генетических полиморфизмов. Считается, что SNP встречаются примерно через каждые 300–400 пар оснований [1]. Клинически значимыми, как правило, являются вариации в кодирующих и регуляторных участках гена. Хотя SNP долгое время считались мощными маркерами для идентификации генетических локусов, которые вносят вклад в этиологию заболеваний человека, за последние несколько лет все чаще

оценивают другую форму общей генетической изменчивости, относящуюся к структурным геномным вариантам [59]. К таковым относятся CNV, которые представляют собой различия по числу копий сегментов хромосом размером от 1 тысячи до нескольких миллионов пар оснований. Это явление возникает вследствие несбалансированных хромосомных перестроек – делеций и дупликаций. Считается, что в настоящее время CNV охватывают более 6% референсной ДНК человека [59].

Несомненно, описание генетических полиморфизмов каждого отдельно взятого индивида – задача чрезвычайно трудоемкая. Однако считается, что повсеместное внедрение в клиническую практику современных методов быстрого прочтения ДНК, таких как NGS (new generation sequencing, секвенирование нового поколения), позволит выявлять в образце каждого пациента все возможные генетические вариации, значительно ускорив развитие персонализированной медицины.

На сегодняшний день известно немало генетических вариантов, ассоциированных с НМРЛ. Так, высокий уровень значимости ассоциаций с предрасположенностью к НМРЛ демонстрируют однонуклеотидные варианты в генах *CHRNA3* (rs12914385), *CHRNA5* (rs16969968), *CLPTMIL* (rs402710), *CYP2E1* (rs6413432), *ERCC1* (rs11615, rs3212986), *FGFR4* (rs351855), *HYKK* (rs931794), *MIR146A* (rs2910164), *TERT* (rs2736098) [6, 87, 185]. Показано, что полиморфизм *CTLA-4* +49 A/G (rs231775), не являясь фактором риска РЛ, ассоциирован с НМРЛ[247]. Известны также герминальные мутации генов *BRCA*, *TP53*, *HER2*, *YAP1*, *ARHGEF5*, *ANKRD20A2*, *ZNF595*, *ZNF812*, *MYO18B*, *BPIFB1* (rs6141383), *CHD4* (rs74790047), *PARP1* (rs3219145), *NUDT1* (rs4866), *RAD52* (rs4987207), *MELTF* (rs17129219), *IL1B* (rs16944, rs1143623), которые могут значительно повышать или снижать риск РЛ [10, 116]. Распространенная и широко исследуемая герминальная мутация гена *EGFR* T790M (rs121434569) связана не только с возникновением НМРЛ, но и с формированием устойчивости к терапии ингибиторами тирозинкиназ. В этом контексте исследуются и другие варианты гена *EGFR*, в числе которых мутации R776H, R776G, V843I и P848L [10, 207].

Худший ответ на химиотерапию имеют также пациенты, обладающие генотипом *ERCC1* rs3212986 CA [228]. Полиморфные варианты (rs1064607, rs3796283, rs2378456) еще одного гена *LPP* связаны с повышенной восприимчивостью к РЛ среди мужской популяции Китая [209]. При этом к генам, в которых при НМРЛ наиболее часто выявляются CNV, относятся *TERT*, *EGFR*, *RICTOR* и *PIK3CA* [221].

Говоря о гистологических подтипах НМРЛ, выявлено, что для плоскоклеточного РЛ показана ассоциация с редкими вариантами *BRCA2*-K3326X (rs11571833) и *CHEK2*-I157T (rs17879961) [189], а также с вариантом rs6489769 гена *RAD52* [118], в то время как при аденокарциноме легкого значительно чаще, чем при других гистологических подтипах, встречаются однонуклеотидные варианты rs2736100 (*TERT*) [58, 185] и rs1064607 (*LPP*) [209].

Помимо связи непосредственно с развитием опухоли, известны ассоциации полиморфных вариантов некоторых генов с различными типами прогрессирования НМРЛ [181]. Так, генотип AA гена *TNS3* (rs9876) связан с высоким риском метастазирования в лимфатические узлы [209], а частота локорегионального рецидивирования зависит от полиморфизма C609T гена *NQO1* [47]. Отдаленные метастазы характерны для носителей полиморфных вариантов генов *RETN* (rs3219175) [51], *SPP1* (rs11730582) [167], *CD44* (rs187115) [12], *TGFB1* (rs1800469) [199] и др.

Некоторые полиморфные варианты демонстрируют разнонаправленные взаимосвязи, что показано в работе Wagner K.W. et al. [88]. Например, однонуклеотидный вариант rs11016885 (*MGMT*) ассоциирован со снижением риска рецидива НМРЛ после хирургического лечения, но предрасполагает к рецидиву после комбинации хирургической резекции и адъювантной химиотерапии. Другие варианты гена *MGMT* (rs10764896, rs11016879, rs7068306), а также варианты rs140695 (*MBD4*) и rs603097 (*MBD2*) снижали риск рецидива после хирургического лечения, в отличие от rs12259379 (*MGMT*) и rs4792953, rs7359598 гена *EZH1*, которые этот риск повышали. После совместного применения хирургической резекции и адъювантной химиотерапии повышенный риск рецидива НМРЛ имели

пациенты с вариантами rs4751115, rs4751104, rs1762429, rs12763287, rs11016798, rs1762438 гена *MGMT*, а также rs11121832 (*MTHFR*) и rs16828708 (*MBD5*).

Наследственная генетическая вариативность, несомненно, вносит вклад в особенности врожденного и адаптивного иммунного ответа. Таким образом, особенности воспалительных процессов уже на этапе предопухолевых изменений могут предрасполагать к дальнейшему озлокачествлению. Зная о роли клеток моноцитарно-макрофагального ряда в хроническом воспалении и канцерогенезе, представляется интересным проследить связь между ассоциированными с НМРЛ генетическими вариантами и функционально-фенотипическими особенностями клеток моноцитарно-макрофагального ряда.

Некоторые из вышеупомянутых генов тем или иным образом связаны с функциями макрофагов. Например, ген *CYP2E1*, кодирующий белок семейства цитохрома Р450 и экспрессирующийся в альвеолярных макрофагах, может быть задействован в метаболизме легочных канцерогенов [79] и, таким образом, иметь отношение к канцерогенезу в легких. Другой пример – ген *ERCC1*, кодирующий белок эксцизионной репарации ДНК. Показано, что в клетках моноцитарно-макрофагальной линии U937, подвергнутых воздействию смеси частиц, имитирующих частицы окружающего воздуха, активировалась экспрессия ряда генов, в числе которых был *ERCC1* [235]. Исходя из этого, можно предположить, что полиморфизм гена *ERCC1* может влиять на характер ответной реакции макрофагов на стрессовые факторы.

Помимо этого, в литературе существуют сведения о непосредственном влиянии продуктов определенных генов на поляризацию макрофагов. При этом их мишенью могут быть внутриклеточные сигнальные пути, например, с участием транскрипционного фактора NF-κB, или же другие механизмы, воздействующие на способность макрофагов к продукции цитокинов.

Так, например, ИЛ-1β и ТФР-β1 – макрофагальные цитокины, характерные для М1- и М2-поляризации соответственно. Известно, что основным источником ИЛ-1β в организме человека являются активированные макрофаги. Активация транскрипции гена *IL1B* происходит в процессе дифференцировки моноцитов в

сторону М1-макрофагов. ИЛ-1 β способствует секреции матричных металлопротеиназ и ангиогенных факторов в опухолевом микроокружении. При этом отмечено, что повышение экспрессии ИЛ-1 β в нормальной легочной ткани связано с повышенным риском развития РЛ [38]. В свою очередь, ТФР- β , известный своим участием в подавлении противоопухолевого иммунного ответа, секретируется М2-поляризованными макрофагами [71], а при формировании легочного фиброза М2-макрофаги являются главным источником этого фактора [146]. В ходе канцерогенеза передача сигналов ТФР β 1/ТФР β R1 активируется как в макрофагах, так и в опухолевых клетках, и предполагается, что этот лиганд-рецепторный сигналинг реализуется в паракринном взаимодействии между макрофагами и клетками опухоли [221].

В отличие от ИЛ-1 β и ТФР- β 1, продукты других генов не являются маркерными для того или иного фенотипа макрофагов, однако для некоторых из них описана роль и механизм регуляции фенотипических особенностей макрофагов. Несколько генов вносят вклад в модуляцию сигнального пути с участием транскрипционного фактора NF- κ B, который связан с проявлением провоспалительного фенотипа классически активированных макрофагов. В частности, установлено, что miR-146a, продукт гена *MIR146A*, является негативным регулятором NF- κ B-ассоциированной активации макрофагов. Сверхэкспрессия miR-146a приводит к снижению продукции макрофагами провоспалительных факторов, в числе которых ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α [239, 249].

Другой пример гена и его продукта, способствующих реализации противовоспалительного фенотипа макрофагов, – ген NAD(P)H-хинон оксидоредуктазы 1 (*NQO1*). Считается, что этот фермент участвует в метаболической активации и детоксикации канцерогенов, а также в регуляции воспалительной активности, в том числе путем удаления активных кислородных радикалов [18]. У мышей с двойным нокаутом генов *NQO1* и *NQO2* ассоциированная с бронхами лимфоидная ткань (BALT) высоко инфильтрирована макрофагами и нейтрофилами, что коррелировало с повышенными сывороточными значениями ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6, а также с повышенной

экспрессией iNOS в легочных макрофагах [15]. При этом воспалительные цитокины, включая ИЛ-1 β и ФНО- α , подавляют активность NQO-1 [115]. Приведенные данные указывают на то, что NQO-1 играет протективную роль в формировании легочного воспаления и немаловажное место в реализации этого свойства отведено макрофагам.

Противоположным эффектом обладает фермент PARP-1, продукт одноименного гена, осуществляющий поли-АДФ-рибозилирование различных субстратов. Показано, что PARP-1 участвует в регуляции воспалительных свойств легочных макрофагов при остром повреждении легкого, индуцированном ЛПС. В основе этого лежит PARP-1-опосредованное поли-АДФ-рибозилирование транскрипционного фактора NFATc3, что делает этот фактор способным активно связываться с промоторными участками генов, кодирующих индуцибельную NO-синтазу (iNOS) и ФНО- α , усиливая их экспрессию [175]. В то же время фосфорилированная форма PARP-1 макрофагов у мышей RAW 264.7 необходима для АДФ-рибозилирования белка p65 (RelA) – одной из субъединиц фактора NF- κ B [24]. Посредством этого PARP-1 участвует в коактивации NF- κ B [74, 175], регулируя иммунный ответ и ассоциированные с ним нарушения функций воздухоносных путей. Описана также роль PARP-1 в рекрутировании макрофагов в патологический очаг легочной ткани. CNV гена *PARP1* ассоциированы со снижением инфильтрации макрофагов в опухолевый очаг при многих видах злокачественных новообразований, включая аденокарциному легкого [169]. Однако делеция *PARP1* влечет за собой значительное снижение рекрутирования легочных макрофагов в ответ на воздействие ЛПС или ФНО [70].

EZH1 – еще один ген, участвующий в NF- κ B-опосредованной активации макрофагов. Ингибирование сигнального пути с участием NF- κ B приводит к значительному снижению экспрессии *EZH1*. Подавление активности гена *EZH1* в макрофагах сопровождается снижением экспрессии M1 маркеров ФНО- α , ИНФ- γ и ИЛ-6 [12, 80], что подтверждает позитивную роль *EZH1* в поляризации макрофагов в сторону фенотипа M1.

Различными авторами описана роль белка резистина, продукта гена *RETN*, в легочной патологии и регуляции свойств моноцитарно-макрофагальных клеток. В организме человека макрофаги служат основным источником резистина [98, 195]. Добавление рекомбинантного человеческого резистина (hRETN) к макрофагам мышей и человека индуцирует ядерную транслокацию NF-κB и приводит к усилению секреции провоспалительных цитокинов ФНО-α и ИЛ-12 [99], характерных для M1-поляризации. Известно, что резистин высоко экспрессируется в тканях аденокарциномы легкого, способствует инвазии и метастазированию опухолевых клеток [196]. В то же время экзогенное введение мышам hRETN усиливает рекрутирование моноцитов в легочную ткань и экспрессию провоспалительных цитокинов [135]. Высокий уровень экспрессии резистина в тканях аденокарциномы легкого связан с плохим клинико-патологическим статусом и выживаемостью [112]. Учитывая вышесказанное, не остается сомнений, что клетки моноцитарно-макрофагальной линии играют в этом значительную роль.

Рассмотрим еще один белок, исследование функций которого представляется перспективным в контексте легочного канцерогенеза. SPP-1, секретируемый фосфопротеин или остеопонтин, является продуктом гена *SPP1*. Было выявлено, что этот белок высоко экспрессируется в ОАМ, полученных из ткани аденокарциномы легкого. Более того, показано, что клетки РЛ индуцируют экспрессию SPP-1 в макрофагах [246]. Интересно, что остеопонтин в большей степени экспрессируется в макрофагах, подверженных гипоксии, и в таких макрофагах также повышена экспрессия MMP-9, ассоциированной с ремоделированием внеклеточного матрикса. Это наблюдение может объяснять повышенную склонность к инвазии клеток РЛ, подвергнутым воздействию SPP-1 [39]. Более того, ингибирование SPP-1 вызывало снижение экспрессии макрофагами PD-L1, а нокдаун SPP-1 ослабляет проопухолевые эффекты макрофагов на клетки РЛ *in vitro*, а также способствует пролиферации Т-клеток и Th1-опосредованному иммунному ответу [246]. Следует отметить, что молекула CD44, кодируемая одноименным геном, полиморфизм которого ассоциирован с

отдаленным метастазированием РЛ, является одним из рецепторов к SPP-1, что усиливает значимость остеопонтин-зависимой регуляции свойств ОАМ при РЛ.

Суммируя вышесказанное, можно сделать вывод, что клетки моноцитарно-макрофагального ряда имеют разнообразные фенотипические и генетические особенности в норме и при патологии. Генетические полиморфизмы, влияющие на многие аспекты течения заболеваний, могут быть реализованы на уровне измененных характеристик иммунного ответа. Не остается сомнений, что генетические полиморфизмы вносят вклад в этиологию, патогенез, прогрессию и исходы НМРЛ. С другой стороны, очевидно, что важное место в этих процессах отведено клеткам моноцитарно-макрофагальной линии. Управление свойствами этих клеток представляет большой интерес для медицины. На сегодняшний день известно, что реполяризация ОАМ из М2 в М1 фенотип при НМРЛ может помочь в преодолении лекарственной устойчивости, часто возникающей на фоне мутации EGFR T790M [17, 194]. Однако эффективная и направленная модуляция свойств макрофагов возможна лишь при глубоком понимании механизмов, лежащих в основе функциональной пластичности этих клеток. Эта непростая задача требует тщательного анализа взаимосвязей генетических детерминант с функционально-фенотипическими характеристиками клеток моноцитарно-макрофагальной линии на разных этапах канцерогенеза, начиная с предопухолевых изменений, и в разных условиях микроокружения.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика клинического материала

В исследование было включено 116 пациентов с впервые диагностированным и морфологически подтвержденным НМРЛ I-III стадии (T1-4N0-3M0), поступивших на лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН в период с 2013 по 2022 год. Больные были разделены на подгруппы в зависимости от состояния респираторного эпителия (1-я подгруппа – отсутствие предопухолевых изменений; 2-я подгруппа – наличие изолированной БКГ).

Клинико-анамнестические данные были получены при анализе историй болезни и амбулаторных карт пациентов, данные представлены в таблицах 1–3. Исследование проходило в соответствии с Хельсинской Декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.) и с разрешения локального этического комитета НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол номер 10 от 28.11.2019 г.), все пациенты подписали информированное согласие на исследование.

Таблица 1 – Клинико-морфологические параметры больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ и с отсутствием предопухолевых изменений в респираторном эпителии

Клинико-морфологические параметры	Подгруппа 1 (с отсутствием предопухолевых изменений)	Подгруппа 2 (БКГ)	р
Количество	21	95	
Возраст	62,9±7,3	59,9±8,7	0,14
Пол			
мужской	18 (85,7)	65 (68,4)	0,18
женский	3 (14,3)	30 (31,6)	
Аденокарцинома	8 (38,1)	43 (45,3)	0,85
Плоскоклеточный рак	12 (57,1)	52 (54,7)	
Смешанный	1 (4,8)	0 (0,0)	
Стадия			
I	5 (23,8)	23 (24,2)	0,8
II	6 (28,6)	22 (23,2)	0,8
III	10 (47,6)	50 (52,6)	1

Продолжение таблицы 1

Клинико-морфологические параметры	Подгруппа 1 (с отсутствием предопухолевых изменений)	Подгруппа 2 (БКГ)	p
Размер опухоли			
T1-2	16 (76,2)	51 (53,7)	0,09
T3-4	5 (23,8)	44 (46,3)	
Вовлеченность регионарных лимфатических узлов (N)			
0	8 (38,1)	50 (52,6)	0,33
1	9 (42,9)	24 (25,3)	0,17
2	4 (19,0)	21 (22,1)	0,98
Неoadъювантная химиотерапия			
проводилась	6 (29,4)	30 (31,6)	0,99
не проводилась	15 (70,6)	65 (68,4)	
Оперативное вмешательство			
пульмонэктомия	8 (38,1)	25 (26,3)	0,41
билобэктомия	0 (0,0)	5 (5,3)	0,57
лобэктоми	13 (61,9)	65 (68,4)	0,84
Адъювантная химиотерапия			
проводилась	7 (35,3)	32 (34,0)	0,82
не проводилась	14 (64,7)	63 (66,0)	
Развитие гематогенных метастазов (исход)			
есть	3 (14,3)	42 (44,2)	0,02
нет	18 (85,7)	53 (55,8)	

Среди пациентов, вошедших в исследование, были 83 мужчины и 33 женщины. Средний возраст составил $60,5 \pm 8,5$ лет (от 42 до 77 лет). Плоскоклеточный рак верифицирован у 64 человек, аденокарцинома у 51 человека и у 1 пациента наблюдался смешанный тип. Были выявлены следующие предопухолевые изменения респираторного эпителия: отсутствие предопухолевых

изменений у 21 человека, изолированная БКГ у 95 человек. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

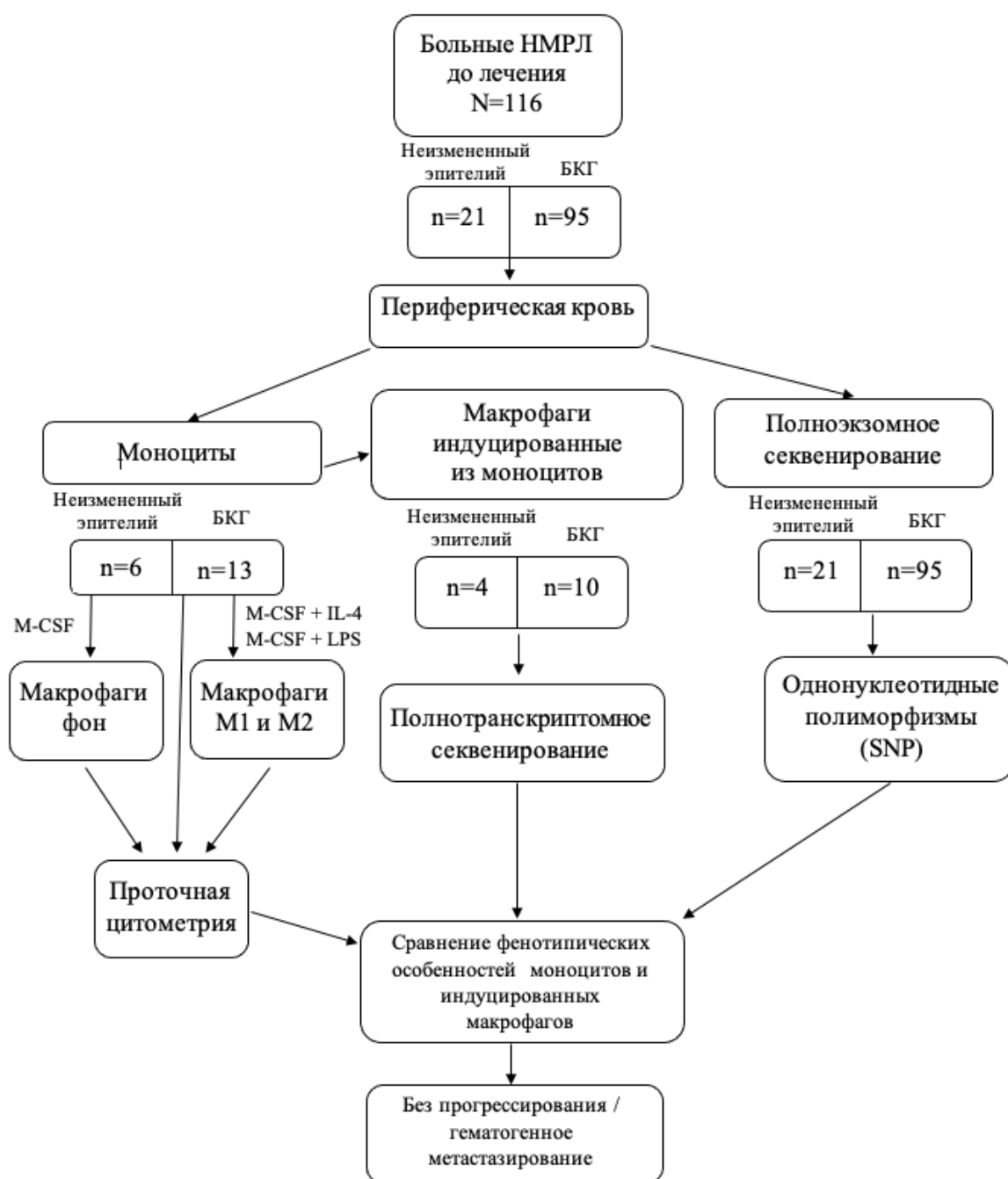


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Как видно из таблицы 1, пациенты с наличием изолированной БКГ и с отсутствием предопухолевых изменений в респираторном эпителии статистически значительно различались по частоте развившихся гематогенных метастазов. Поскольку клинико-морфологические параметры пациентов, а также объем проведенного

лечения оказывают влияние на исход НМРЛ [34, 192, 222], была выполнена оценка частоты встречаемости данных факторов в зависимости от того, развились метастазы или нет в течение срока исследования (таблицы 2 и 3). Значимых различий в частоте встречаемости данных факторов за исключением возраста в группах с изолированной БКГ и с отсутствием предопухолевых изменений в респираторном эпителии у больных НМРЛ выявлено не было.

Таблица 2 – Клинико-морфологические параметры больных НМРЛ с наличием гематогенных метастазов в зависимости от присутствия изолированной БКГ или отсутствия предопухолевых изменений в респираторном эпителии

Клинико-морфологические параметры	Подгруппа 1 (с отсутствием предопухолевых изменений)	Подгруппа 2 (БКГ)	Р
Количество	3	42	
Возраст	71,3±4,3	60,5±1,2	0,04
Пол			
Мужской	3 (100,0)	32 (76,2)	0,46
Женский	0 (0,0)	10 (23,8)	
Гистологический тип			
Аденокарцинома	2 (33,3)	24 (57,1)	0,62
Плоскоклеточный рак	1 (66,7)	18 (42,9)	
Стадия			
I	1 (33,3)	4 (9,5)	0,30
II	2 (66,7)	28 (66,7)	0,75
III	0 (0,0)	10 (23,8)	0,46
Размер опухоли			
T1-2	3 (100,0)	17 (40,5)	0,08
T3-4	0 (0,0)	25 (59,5)	
0	1 (33,3)	22 (52,4)	0,48
1-2	2 (66,7)	20 (47,6)	
Неoadъювантная химиотерапия			
проводилась	1 (33,3)	18 (42,9)	0,62
не проводилась	2 (66,7)	24 (57,1)	

Продолжение таблицы 2

Клинико-морфологические параметры	Подгруппа 1 (с отсутствием предопухолевых изменений)	Подгруппа 2 (БКГ)	Р
Оперативное вмешательство			
пульмонэктомия	1 (33,3)	10 (23,8)	0,58
билобэктомия	0 (0,0)	2 (4,8)	0,87
лобэктомия	2 (66,7)	30 (71,4)	0,65
Адьювантная химиотерапия			
проводилась	0 (0,0)	17 (40,5)	0,23
не проводилась	3 (100,0)	25 (59,5)	

Таблица 3 – Клинико-морфологические параметры больных НМРЛ с отсутствием отдаленного метастазирования в зависимости от наличия изолированной БКГ или отсутствия предопухолевых изменений в респираторном эпителии

Клинико-морфологические параметры	Подгруппа 1 (с отсутствием предопухолевых изменений)	Подгруппа 2 (БКГ)	Р
Количество	18	53	
Возраст	61,3±1,5	60,2±1,3	0,57
Пол			
Мужской	15 (83,3)	33 (62,3)	0,08
Женский	3 (16,7)	20 (37,7)	
Гистологический тип			
Аденокарцинома	6 (33,3)	26 (49,1)	0,38
Плоскоклеточный рак	11 (61,1)	27 (50,9)	0,64
Смешанный	1 (5,6)	0 (0,0)	
Стадия			
I	0 (0,0)	4 (7,5)	0,30
II	12 (66,7)	36 (67,9)	0,85
III	6 (33,3)	13 (24,5)	0,67
Размер опухоли:			
T1-2	13 (72,2)	34 (64,2)	0,74
T3-4	5 (27,8)	19 (35,8)	

Продолжение таблицы 3

Клинико-морфологические параметры	Подгруппа 1 (с отсутствием предопухолевых изменений)	Подгруппа 2 (БКГ)	Р
Вовлеченность лимфатических узлов (N)			
0	6 (33,3)	28 (52,8)	0,25
1-2	12 (66,7)	25 (47,2)	
Неoadьювантная химиотерапия:			
проводилась	6 (33,3)	11 (20,8)	0,44
не проводилась	12 (66,7)	42 (79,2)	
Оперативное вмешательство			
пульмонэктомия	5 (27,8)	14 (26,4)	0,85
билобэктомия	0 (0,0)	4 (7,5)	0,30
лобэктомия	13 (72,2)	35 (66,0)	0,85
Адьювантная химиотерапия:			
проводилась	6 (33,3)	12 (22,6)	0,55
не проводилась	12 (66,7)	41 (77,4)	

Исследование периферической крови и генетических особенностей проводилось до начала лечения. Оценка предопухолевых изменений осуществлялась на материале, полученном во время операции.

В качестве материала исследования выступала венозная кровь и образцы ткани легкого в отдалении от первичного опухолевого очага на 4–5 см. Образцы ткани использовались для оценки предопухолевых изменений в респираторном эпителии бронхов (см. рисунок 1).

Исследование моноцитов периферической крови заключалось в оценке их субпопуляционного состава на основании экспрессии фенотипических маркеров. Исследование макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови в условиях *in vitro*, заключалось в характеристике их субпопуляционного состава, а также в оценке способности к ответу на индукторы M1 и M2 поляризации. Анализ экспрессии генов, функционально значимых для опухолевой прогрессии и иммуновоспалительных реакций, проводился в макрофагах, индуцированных из

моноцитов, под действием М-КСФ и без добавления индукторов М1 и М2 поляризации путем полнотранскриптомного секвенирования. Оценка генетических особенностей, в частности SNP, проводилась путем выделения ДНК и подготовки библиотек из замороженной крови (см. рисунок 1).

Основными критериями включения пациентов в исследование стали:

- 1) общее удовлетворительное состояние по шкале ECOG <2;
- 2) согласие пациента на участие в исследовании;
- 3) морфологически верифицированный диагноз НМРЛ;
- 4) возраст больных старше 18 лет;
- 5) отсутствие противоопухолевого лечения на момент включения в исследование.

2.2 Описание методов исследования

2.2.1 Морфологическая верификация предопухолевых изменений бронхиального эпителия в мелких бронхах у пациентов с НМРЛ

У всех пациентов с НМРЛ был проведен анализ морфологических изменений эпителия малых бронхов в отдалении (4–5 см) от первичного опухолевого очага. Объектами исследования являлись мелкие бронхи ($d=0,5-2$ мм), реже – сегментарные и субсегментарные бронхи ($d=2-5$ мм). Для этого из фиксированных в формалине и залитых парафином образцов ткани легкого были подготовлены срезы, проведено их окрашивание с помощью гематоксилина и эозина, и выполнен анализ с помощью световой микроскопии (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Германия).

2.2.2 Выделение фракции мононуклеарных клеток из периферической крови

Венозную кровь забирали в пробирки-вакутейнеры, обработанные КЗ ЭДТА, утром натощак в количестве 20 мл от каждого пациента. Кровь в соотношении 1:1 смешивали со средой для отмывки, состоявшей из среды RPMI-1640 (ПанЭко,

Россия), в которую предварительно были добавлены L-глутамин, пенициллин и стрептомицин (ПанЭко, Россия). Полученную смесь в количестве 30 мл наслаивали на 15 мл фиколла ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) (ПанЭко, Россия) и центрифугировали при 1600 оборотах в минуту без встряхивания в течение 30 минут при 22 °С. Затем полученное интерфазное кольцо, содержащее фракцию моноцитов и лимфоцитов, аккуратно собирали при помощи пастеровской пипетки и дважды отмывали средой для отмывки при 1200 оборотах в минуту в течение 10 минут при 4 °С. Отмытые мононуклеарные клетки разводили в полной культуральной среде до концентрации 2×10^6 клеток/мл (среда DMEM, L-глутамин, пенициллин и стрептомицин, 10 % термически инактивированной фетальной сыворотки теленка (ПанЭко, Россия)).

2.2.3 Индукция макрофагов из моноцитов периферической крови

Выделенные мононуклеарные клетки в количестве 2×10^6 в 1 мл полной культуральной среды помещали в лунку 24-луночного плоскодонного планшета для культивирования клеток (TPP, Швейцария). Для каждого исследования ставились 3 пробы: 1 – контрольная проба, 2 – проба для индукции M1-макрофагов, 3 – проба для индукции M2-макрофагов. Во все лунки добавляли М-КСФ в дозе 20 нг/мл. Через 5 суток инкубации клеток в атмосфере 5% CO₂ во вторую пробу в качестве индуктора M1-макрофагов добавляли 100 нг/мл ЛПС (Sigma), а в третью пробу в качестве индуктора M2-макрофагов добавляли 10 нг/мл ИЛ-4 (Sigma). Через 24 часа инкубации фракцию не прилипших к пластику клеток удаляли смыванием. Прилипшие клетки – макрофаги – отделяли от дна лунки скрепером, собирали в пробирки с полной культуральной средой, фиксировали, а затем окрашивали для исследования индуцированного фенотипа макрофагов.

2.2.4 Оценка фенотипических особенностей моноцитов и индуцированных *in vitro* макрофагов

Фенотипические особенности индуцированных из моноцитов макрофагов были изучены методом проточной цитофлуориметрии. Изученные в работе маркеры моноцитов и макрофагов представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Молекулярные маркеры основных популяций и типа поляризации макрофагов, использованные в работе

Антиген	Конъюгированный флуорохром	Клон	Маркер
CD45	PerCP	2D1	Общий маркер лейкоцитов
CD14	FITC	M5E2	Маркер моноцитов/макрофагов
CD16	APC-H7	3G8	Маркер моноцитов/макрофагов
CD68	PECy7	Y1/82A	Маркер макрофагов
CD163	AlexaFlour 647	GHI/61	Маркер M2 противовоспалительных моноцитов/макрофагов
CD206	PE	19.2	Маркер M2 противовоспалительных моноцитов/макрофагов
HLA-DR	APC-Cy7	L243	Маркер M1 провоспалительных моноцитов/макрофагов
CD11b	FITC	CBRM1/5	Маркер моноцитов/макрофагов

К 1×10^6 индуцированных макрофагов добавляли по 5 мкл моноклональных мышиных антител к антигенам человека, указанным в таблице 4, в соответствии с рекомендациями производителя. Все антитела получены от BD (США). Параллельно ставилась неокрашенная проба (негативный контроль) и проба с изотипическими антителами (положительный контроль). Пробы инкубировались в

темноте при комнатной температуре в течение 40 мин и затем отмывались дважды раствором BDCellWash (BD, США). После отмывки к клеткам добавляли раствор BDFlow (BD, США) и проводили анализ фенотипических особенностей индуцированных макрофагов на проточном цитофлюориметре BD FACSCantoII (BD, США).

Для окрашивания моноцитов к 100 мкл цельной крови добавляли моноклональные антитела (таблица 4), инкубировали в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Затем лизировали эритроциты с использованием лизирующего раствора Lysing Solution (BD, США). Пробы инкубировали в течение 15 мин в темноте, отмывали 2 раза с помощью Cell Wash (BD, США). Далее проводили анализ фенотипических особенностей исследуемых клеток.

Данные визуализировали и анализировали с использованием программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3. Предварительно исключали из анализа дуплеты и разрушенные клетки. В образцах цельной крови выделяли гейт CD45+моноцитов, из которого на основании экспрессии молекул CD14 и CD16 идентифицировали CD14+CD16-классическую субпопуляцию, CD14+CD16+промежуточную субпопуляцию и CD14-CD16+неклассическую субпопуляцию моноцитов. В каждой из данных субпопуляций определяли долю CD68+, CD163+, CD206 и HLA-DR+клеток, а также их субпопуляции, дважды положительные по данным маркерам. Для индуцированных *in vitro* макрофагов исследованию подвергали весь пул CD45+клеток, полученных после сбора прилипшей фракции, полагая, что данный пул содержит только клетки моноцитарно-макрофагального ряда после проведенных манипуляций (выделение на градиенте плотности и удаление неприлипшей фракции). Далее стратегию гейтирования проводили по алгоритму, описанному для моноцитов. Также оценивали медиану флюорисценции (MFI) в популяции интереса, которая отражает плотность экспрессируемого маркера.

2.2.5 Выделение ДНК из образцов периферической крови

Из образцов периферической крови выделяли ДНК фенол-хлороформным методом с использованием протеиназы К по стандартному протоколу. С помощью методов спектрометрии (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, США) и флуориметрии (Qubit 4.0, Thermo Fisher Scientific, США) оценивали качество и концентрацию образцов ДНК. На станции автоматического гель-электрофореза 4150 TapeStation (Agilent, США) для образцов ДНК были оценены их размер и целостность с помощью набора Genomic DNA Screen Tape. Концентрация ДНК варьировала от 7,76 до 98,4 нг/мкл, показатель «260/280» (отношение поглощения при 260 нм и 280 нм используется для оценки чистоты ДНК и РНК) был больше 1,8. DIN (от англ. DNA integrity) в диапазоне 8,3–9,4. Размер ДНК во всех образцах составил более 48 500 пар оснований. Образцы ДНК помещались на хранение при температуре –80 °С до этапа подготовки ДНК-библиотек.

2.2.6 Подготовка ДНК-библиотек

Подготовка ДНК-библиотек осуществлялась с помощью набора SureSelect XT Human All Exon v7 (Agilent, США) и включала в себя ультразвуковую фрагментацию ДНК с использованием аппарата Covaris E220 (Covaris, США). Все образцы ДНК были фрагментированы до целевого размера – 150–200 пар оснований (п.о.). Размер ДНК фрагментов был оценен на станции автоматического гель-электрофореза 4150 TapeStation (Agilent, США) с помощью набора HS D1000 ScreenTape. Репарация концевых участков фрагментов ДНК, полиаденилирование 3'-концов фрагментов ДНК, лигирование спаренно-концевых адаптеров и отбор целевых фрагментов ДНК осуществлялся с помощью частиц AMPure (Beckman Coulter, США). Далее был проведен этап амплификации библиотек с адаптерами. Оценка концентрации и качества геномных ДНК-библиотек на флуориметре Qubit 4.0 осуществлялась с помощью набора dsDNA BR (Thermo Scientific, США) и станции автоматического гель-электрофореза 4150 TapeStation (Agilent, США) с

помощью набора D1000 ScreenTape. Размер варьировал от 244 до 272 п.о. Средняя концентрация составила 91 нг/мкл.

Также была проведена гибридизация с экзомными зондами. Захват гибридизированной ДНК осуществлялся с использованием стрептавидиновых частиц. Амплификация ДНК-библиотек с индексирующими праймерами и отбор целевых фрагментов ДНК выполнялись с помощью частиц AMPure (Beckman Coulter, США). Оценка качества и количества экзомных ДНК-библиотек была проведена на флуориметре Qubit 4.0 с помощью набора dsDNA HS (Thermo Scientific, США) и станции автоматического гель-электрофореза 4150 TapeStation (Agilent, США) с помощью набора HS D1000 ScreenTape. Размер готовых библиотек варьировал от 279 до 334 п.о. Средняя концентрация составила 7,04 нг/мкл.

2.2.7 Массовое параллельное секвенирование и биоинформатический анализ данных ДНК-библиотек

Секвенирование выполнено на платформе NextSeq 2000 (Illumina, США) в режиме двуконцевого прочтения по 100 нуклеотидов со средним покрытием 30х. Готовые экзомные библиотеки были разведены до концентрации 2 нМ и объединены в пул согласно руководству по эксплуатации системы секвенирования NextSeq 2000 (Illumina, США). Пул библиотек был денатурирован и разведен до конечной концентрации 650 пМ, объемная доля PhiX в пуле составляла 1%.

Нуклеотидные последовательности, полученные в ходе секвенирования, выравнивались на референсный геном GRCh38. Выявление генетических вариантов проводилось с помощью пайплайна GATK [130], поиск SNPs, характерных для пациентов с изолированной БКГ, по сравнению с пациентами, у которых отсутствовали предопухолевые изменения (низкий риск метастазирования), выполнялся с помощью инструментов VEP (105.0) и Nail (Ver:0.2.82-2ab242915c2c). Из исходных данных секвенирования оставлены варианты со значениями глубины секвенирования, равными или выше 8 ($DP \geq 8$), со значениями качества генотипа, равными или выше 20 ($GQ \geq 20$).

2.2.8 Выделение РНК из индуцированных макрофагов, подготовка библиотек и биоинформатическая обработка данных

В каждую лунку с индуцированными *in vitro* макрофагами, культивированными без добавления индукторов поляризации (аналогично контрольной пробе), добавляли по 350 мкл лизирующего буфера RLT Buffer (Qiagen, Германия). Полученные лизаты собирали в пробирки и хранили при -80°C до этапа выделения РНК. Для выделения РНК был использован набор с ДНК элиминирующими колонками RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Германия). Целостность выделенной РНК оценивали при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, USA). RIN составил 6,5–9,0. Библиотеки готовили при помощи набора Qiaseq Stranded total RNA library kit (Qiagen, Германия) по стандартному протоколу. Избавление от рибосомальной РНК осуществляли при помощи набора NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat). Подготовленные библиотеки затем объединяли в пул и проводили секвенирование на приборах Illumina NextSeq 500 и Illumina NextSeq 2000 с набором реактивов для одноконцевого чтения 1x75 и 1x100 (single read) циклов, соответственно. На каждую библиотеку в среднем приходилось около 39 миллионов прочтений (ридов).

Контроль качества, выполненного секвенирования проводили с помощью программных пакетов FastQC (URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>), QoRTs [94] и MultiQC [155]. Картирование ридов на геном проводили при помощи программы STAR [212], в качестве референса использовали геномную сборку GRCh38 и аннотации GENCODE.R42. После картирования при помощи программы HTSeq-count [11] получали данные о количестве картирующихся ридов на индивидуальные гены. После этого этапа при помощи программного пакета DESeq2 [127] в среде R проводили нормализацию по глубине секвенирования и анализ дифференциальной экспрессии между генами группы больных НМРЛ с отсутствием

предопухолевых изменений и группы больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ. При помощи пакета svaseq [125] устраняли влияние несмоделированных эффектов, вызванных преимущественно наличием шума в данных. При помощи программы fgsea (URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/060012v3>) проводили обогащение биохимических и регуляторных путей с использованием списков генов, ранжированных по уровню экспрессии и p-value. Для эксперимента использовали базы данных Hallmark gene sets, Reactome, KEGG. Данные визуализировали при помощи программ fgsea и Phantasus (URL: <https://genome.ifmo.ru/phantasus>), а также средствами среды R.

2.2.9 Статистическая обработка данных

Для оценки полученных данных и их сравнения был использован статистический пакет программ «Statistica 12».

Проверку признаков на нормальность осуществляли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка в зависимости от объема выборки. Исследуемые показатели не были распределены по нормальному закону, поэтому описательная статистика представлена в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q1:Q3). Анализ выживаемости проводили с использованием метода Каплана-Майера и критерия Гехана-Вилкоксона. Для выявления значимых различий между параметрами моноцитов и индуцированных *in vitro* макрофагов использовался критерий Манна – Уитни для независимых выборок. Для анализа частот встречаемости признаков применяли критерий χ^2 и точный критерий Фишера. Указывались статистически значимые различия при уровне значимости $p < 0,05$. Данные с тенденцией к статистически значимым событиям ($p < 0,1$) также обсуждались. Для построения графиков использовался программный пакет GraphPad Prism (версия 9.4.1).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Частота встречаемости SNP у больных НМРЛ в зависимости от наличия или отсутствия изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов

Высокая частота развития гематогенных метастазов и позднее обнаружение опухолевого процесса являются основными причинами высокой смертности пациентов с раком легкого [90]. Коллективом НИИ онкологии Томского НИМЦ показана значимая ассоциация между характером предопухолевых изменений в эпителии мелких бронхов и прогрессией НМРЛ вне зависимости от гистологического типа опухоли. Так, гематогенные метастазы чаще всего наблюдались у пациентов, у которых в отдаленных от опухоли в мелких бронхах определялась изолированная БКГ [178]. У больных НМРЛ без морфологических изменений в слизистой оболочке бронхов гематогенные метастазы не выявлялись. Таким образом, наличие изолированной БКГ указывает на высокий риск, а отсутствие респираторных изменений - на низкий риск развития гематогенных метастазов. Связь реактивных изменений слизистой бронхов в отдалении от новообразования и отдаленного метастазирования может быть обусловлена конститутивными генотипическими характеристиками, которые могут способствовать развитию предопухолевых изменений и гематогенному метастазированию. Генотипирование пациентов с наличием изолированной БКГ и больных без респираторных изменений позволит идентифицировать герминальные генетические варианты, предопределяющие риск развития метастатической болезни при НМРЛ.

В результате биоинформатического анализа данных полноэкзомного секвенирования, а именно полногеномного ассоциативного исследования (GWAS), не было обнаружено однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNP), достигающих пороговой значимости $P(-\log_{10}) > 10^{-8}$. Это может быть связано с недостаточным объемом выборки и её неоднородностью, которые могут мешать достижению пороговых значений. Мы выбрали пять SNP с

предполагаемым порогом значимости на уровне $P(-\log_{10}) > 10^{-3,7}$, различия в частоте встречаемости которых достигали наибольшего уровня значимости у больных НМРЛ с отсутствием предопухоловых изменений и с наличием изолированной БКГ: *CNTN2* (rs17416074 G>A), *POLR1C* (rs2297336 A>G), *PTPRZ1* (rs74821923 G>C), *MUC19* (rs11176826 C>T), *DNJA4* (rs61752771 T>C) (рисунок 2).

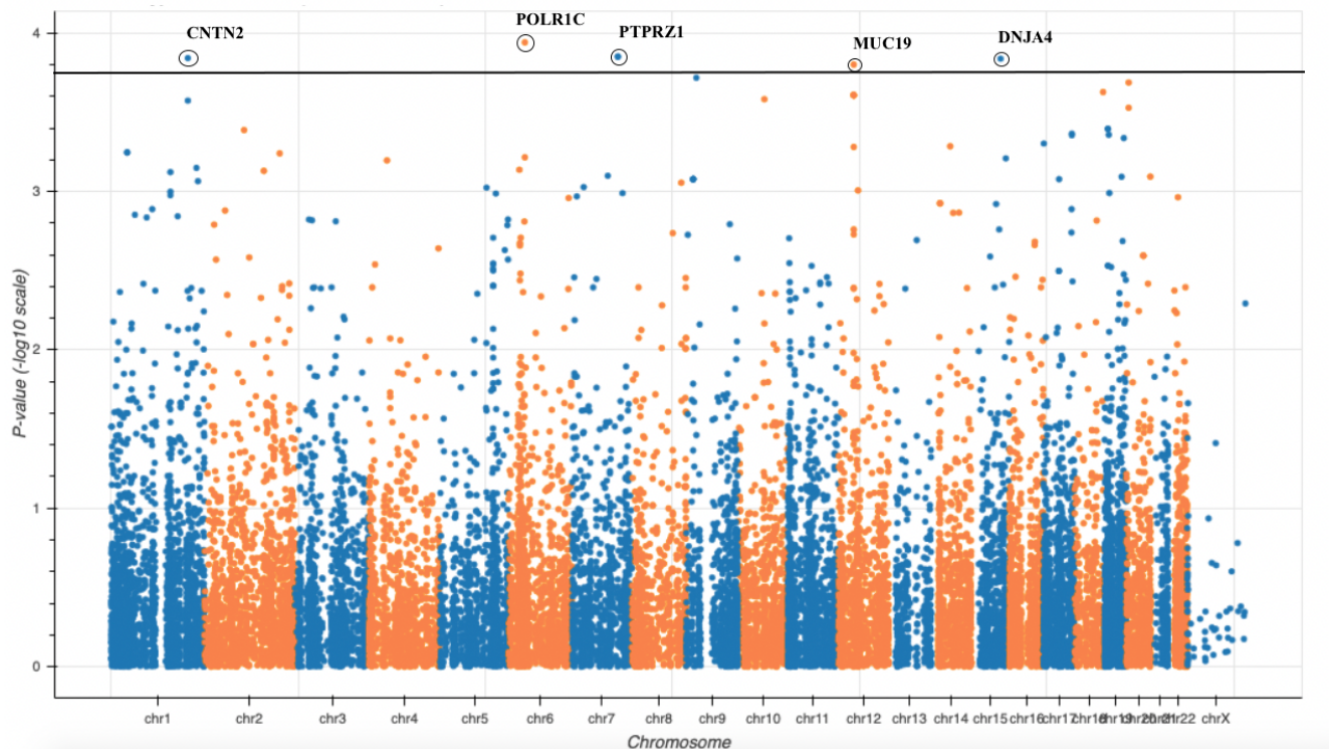


Рисунок 2 – Манхэттенский график полногеномного ассоциативного исследования в группах больных НМРЛ с отсутствием предопухоловых изменений и больных с изолированной БКГ

Далее нами было проведено сравнение частот встречаемости генотипов и аллелей перечисленных генов у больных НМРЛ с отсутствием предопухоловых изменений и с наличием изолированной БКГ (таблицы 5, 6). Распределение частот генотипов найденных полиморфизмов в группах соответствовало ожидаемому закону равновесия Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Таблица 5 – Частоты встречаемости генотипов генов *CNTN2*, *POLRIC*, *PTPRZ1*, *MUC19*, *DNJA4* у больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений и у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ

SNP	Отсутствие предопухолевых изменений	БКГ	Отсутствие предопухолевых изменений	БКГ	Отсутствие предопухолевых изменений	БКГ
<i>CNTN2</i> rs17416074 G>A	GG		GA		AA	
	18/85,7	95/100,0	3/14,3	0/0,0	0/0,0	0/0,0
	p=0,003					
<i>POLRIC</i> rs2297336 A>G	AA		AG		GG	
	11/52,4	80/84,2	9/42,9	13/15,8	1/4,7	0/0,0
	p=0,041					
<i>PTPRZ1</i> rs74821923 G>C	GG		GC		CC	
	19/90,5	95/100,0	2/9,5	0/0,0	0/0,0	0/0,0
	p=0,035					
<i>MUC19</i> rs11176826 C>T	CC		CT		TT	
	9/42,9	71/74,7	9/42,9	21/22,1	3/14,2	1/3,2
	p=0,005					
	p=0,038					
<i>DNJA4</i> rs61752771 T>C	TT		TC		CC	
	19/90,5	95/100,0	2/9,5	0/0,0	0/0,0	0/0,0
	p=0,036					
Примечание: n – абсолютная частота встречаемости генотипа; % – частота встречаемости генотипа, выраженная в процентах; p – уровень значимости при сравнении частот встречаемости генотипов						

Частоты встречаемости гетерозиготных генотипов генов *CNTN2* (GA), *POLRIC* (AG), *PTPRZ1* (GC), *MUC19* (CT), *DNJA4* (TC) статистически значимо ниже у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии по сравнению с больными, у которых отсутствовали предопухолевые изменения ($p<0,05$, таблица 5). Также было обнаружено, что частота встречаемости гомозиготного генотипа по аллелю Т гена *MUC19* (ТТ) достоверно ниже у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии по сравнению с

группой больных, у которых предопухоловые изменения отсутствовали ($p < 0,05$, таблица 5).

Таблица 6 – Частоты встречаемости аллелей генов *CNTN2*, *POLR1C*, *PTPRZ1*, *MUC19*, *DNJA4* у больных НМРЛ с отсутствием предопухоловых изменений и у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ

SNP	Частоты встречаемости аллелей				
	Отсутствие предопухоловых изменений n/%	БКГ n/%	Отсутствие предопухоловых изменений n/%	БКГ n/%	p χ^2
<i>CNTN2</i> rs17416074 G>A	G 39/93,0	G 190/100,0	A 3/7,0	A 0/0,0	p=0,003 $\chi^2=8,84$
<i>POLR1C</i> rs2297336 A>G	A 31/72,1	A 173/93,0	G 12/27,9	G 13/7,0	p=0,005 $\chi^2=12,04$
<i>PTPRZ1</i> rs74821923 G>C	G 40/95,2	G 190/100,0	C 2/4,8	C 0/0,0	p=0,035 $\chi^2=4,44$
<i>MUC19</i> rs11176826 C>T	C 27/64,3	C 163/87,2	T 15/35,7	T 24/12,8	p=0,006 $\chi^2=7,65$
<i>DNJA4</i> rs61752771 T>C	T 40/95,2	T 190/100,0	C 2/4,8	C 0/0,0	p=0,036 $\chi^2=4,39$
<i>Примечание:</i> n – абсолютная частота встречаемости аллеля; % – частота встречаемости аллеля, выраженная в процентах; p – уровень значимости различий					

Частоты встречаемости аллелей генов *CNTN2* (аллель A), *POLRIC* (аллель G), *PTPRZ1* (аллель C), *MUC19* (аллель T), *DNJA4* (аллель C) также были статистически значимо ниже в группе больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии по сравнению с группой больных, у которых предопухолевые изменения отсутствовали ($p < 0,05$, таблица 6).

Таким образом, наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов у больных НМРЛ ассоциировано с более низкой частотой встречаемости A(GA) в rs17416074 гена *CNTN2*, G(AG) в rs2297336 гена *POLRIC*, C(GC) в rs74821923 гена *PTPRZ1*, T(CT) в rs11176826 гена *MUC19*, T(TT) в rs11176826 гена *MUC19*, C(TC) в rs61752771 гена *DNJA4*, чем у пациентов с отсутствием предопухолевых изменений.

3.2 Взаимосвязь наличия изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов с фенотипическим профилем моноцитов и макрофагов у больных НМРЛ

В таблице 7 представлен спектр фенотипических признаков, которые были исследованы в моноцитах у больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений и с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов. Статистический анализ с применением критерия Манна – Уитни показал, что различий между фенотипическими особенностями моноцитов у больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений в респираторном эпителии и особенностями моноцитов у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии не было выявлено.

Макрофаги, культивированные без добавления индукторов поляризации, у больных НМРЛ в группах с отсутствием предопухолевых изменений и с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов не имели различий на уровне статистической значимости с $p < 0,05$.

Таблица 7 – Фенотипический профиль моноцитов в зависимости от наличия изолированной БКГ или отсутствия предопухолевых изменений в респираторном эпителии у больных НМРЛ (Me; Q1:Q3)

Показатель	Отсутствие предопухолевых изменений (n=6)	БКГ (n=13)
CD45+ моноциты	1,7 (0,2;3,0)	3,8 (2,5;5,6)
CD14+ моноциты	67,2 (67,2;67,2)	83,3 (47,8;85,05)
CD14-16+ моноциты	12,1 (5,3;21,6)	9,75 (4,7;15,6)
CD14-16+HLA+, %	13,2 (0,0;100,0)	55,8 (25,0;87,0)
CD14-16+HLA+, MFI	39184,0 (0,0;57841,0)	36424,5 (14809,0;54810,0)
CD14+16+ моноциты	4,7 (1,3;7,4)	3,8 (1,6;6,7)
CD14+16+HLA-DR+, %	93,0 (0,0;100,0)	47,1 (28,6;94,0)
CD14+16+HLA+, MFI	90154,0 (0,0;101141,0)	63350,0 (2411,0;98420,0)
CD14+16- моноциты	67,6 (64,7;73,9)	74,05 (54,6;84,7)
CD14+16-163+, %	0,0 (0,0;0,8)	5,2 (0,1;20,7)
CD14+16-163+, MFI	0,0 (0,0;2032,0)	1147,0 (932,0;3453,0)
CD14+16-HLA+, %	98,7 (95,7;98,8)	86,3 (57,9;99,2)
CD14+16-HLA+, MFI	14590,0 (7937,0;17322,0)	12243,5 (3389,0;50879,0)
CD68+ моноциты, %	2,3 (1,1;38,9)	2,4 (0,4;5)
CD68+, MFI	3205,5 (1485,0;30511,5)	2992 (961,5;43797,5)
CD163+ моноциты, %	12,3 (0,2;53,8)	3,65 (0,5;12,4)
CD163+, MFI	2483,5 (483,0;11509,0)	2509,0 (901,0;5392,5)
CD206+ моноциты, %	40,3 (30,3;59,5)	24,8 (13,7;53,2)
CD206, MFI	2673,5 (1917,0;5653,5)	2398,0 (1965,0;7157,0)
HLA-DR+ моноциты, %	65,9 (65,9;65,9)	60,2 (40,1;90,9)
HLA-DR+ моноциты, MFI	2185,0 (2185,0;2185,0)	2372,0 (2210,0;4316,0)

Однако на уровне статистической тенденции ($p < 0,1$) были обнаружены отличия между данными группами. Так, в группе больных с наличием изолированной БКГ количество CD68+макрофагов в 1,8 раза меньше, чем у пациентов с эпителием без изменений ($1,1[0,2;1,6]$ % против $2,0[1,6;4,0]$ %, $p=0,062$). Кроме того, наличие изолированной БКГ сопровождалось увеличением в 2,1 раза экспрессии рецептора CD163 на поверхности макрофагов по сравнению с соответствующими показателями в группе пациентов без предопухолевых изменений ($2346,0[1598,0;8931,0]$ усл. ед. против $1108,5[900,5;1631,5]$ усл. ед., $p=0,072$) (рисунок 3). Таким образом, наличие изолированной БКГ в эпителии

бронхов у больных НМРЛ сопровождается снижением пула CD68+макрофагов и увеличением экспрессии CD163 на их поверхности.

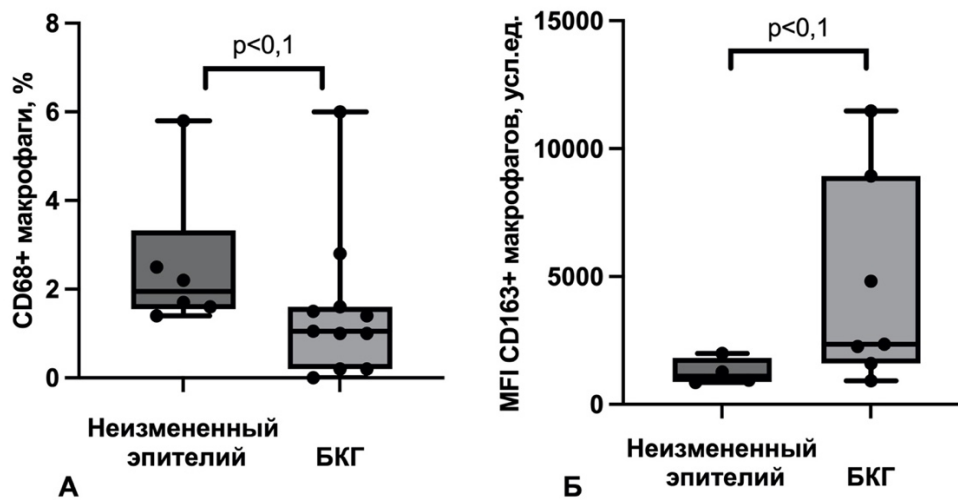


Рисунок 3 – Фенотипические особенности макрофагов, индуцированных из моноцитов периферической крови без добавления индукторов поляризации, в группе больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений и с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов: А – доля клеток, экспрессирующих CD68 рецептор; Б – MFI молекулы CD163. Примечание: p – уровень значимости различий; MFI – медиана интенсивности флюоресценции, измеряемая в условных единицах

3.3 Взаимосвязь наличия изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов со способностью макрофагов, индуцированных из моноцитов *in vitro*, к ответу на поляризующие стимулы ИЛ-4 и ЛПС у больных НМРЛ

В условиях *in vitro* макрофаги могут быть получены из моноцитов периферической крови путем воздействия на них индукторов и подвергаться классической (M1) или альтернативной (M2) активации, индукторами которой являются ЛПС и ИЛ-4 соответственно. Добавление индукторов M1 и M2 поляризации приводит к изменению экспрессии соответствующих маркеров. В данном исследовании признаком M1-поляризации следует считать увеличение популяции макрофагов, экспрессирующих маркер HLA-DR, а также макрофагов, у

которых отсутствует экспрессия маркеров M2-поляризации – антигенов CD163 и CD206.

Добавление в среду культивации макрофагов индуктора M2-поляризации ИЛ-4 повлияло на фенотип клеток (рисунок 4). Доля макрофагов, экспрессирующих молекулу CD68 при добавлении в культуру клеток ИЛ-4, у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ составила 0,5 [0,2;1,7] % от общего количества CD45+клеток, тогда как у пациентов с отсутствием предопухолевых изменений соответствующий показатель равнялся 2,1 [1,9;3,7] % ($p=0,031$) (рисунок 4, А). Кроме того, добавление ИЛ-4 в среду культивирования макрофагов, полученных у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ, сопровождалось более низким уровнем флюорисценции CD14+ клеток по сравнению таковым у пациентов с отсутствием предопухолевых изменений: 2279,5 [1991,0;3283,0] усл.ед. и 3618 [3421,0;4568,0] усл.ед., соответственно ($p=0,098$) (рисунок 4, Б).

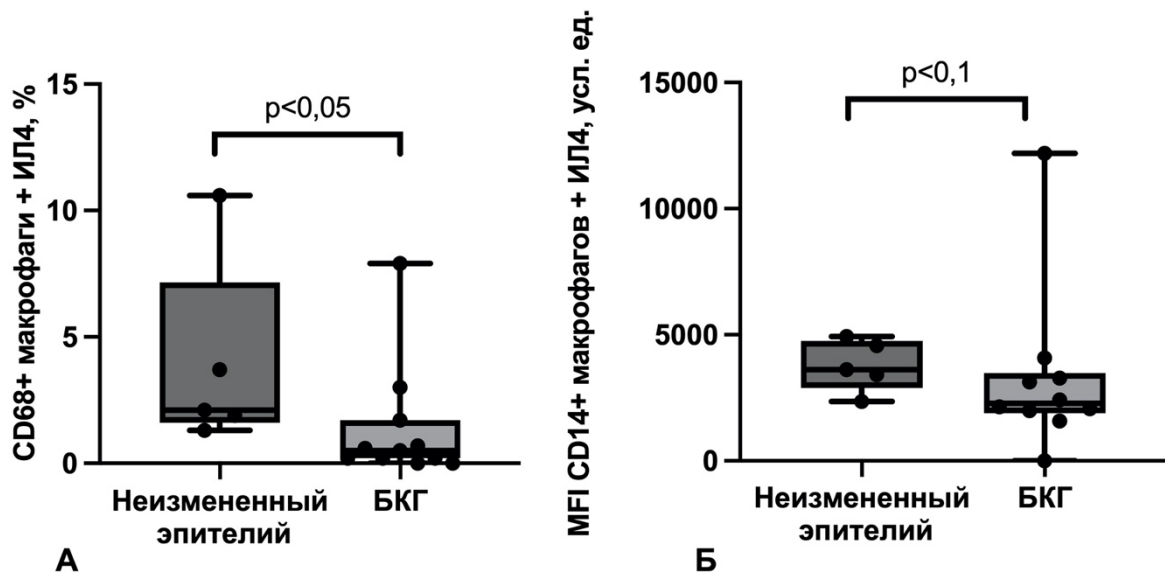


Рисунок 4 – Фенотипические особенности макрофагов, индуцированных из моноцитов периферической крови, с добавлением индуктора M2-поляризации ИЛ-4 в группе больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений и с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов:

А – доля CD68+клеток; Б – MFI молекулы CD14.

Примечание: p – уровень значимости различий; MFI – медиана интенсивности флюоресценции, измеряемая в условных единицах

Отмечено, что у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ со-
культивирование макрофагов с индуктором М1-поляризации ЛПС оказалось
ассоциировано с более низким количеством CD68+клеток в сравнении с
параметрами, выявленными у пациентов с отсутствием предопухолевых
изменений: 0,85 [0,1;1,2] % против 2,1 [1,5;3,4] % ($p=0,043$) (рисунок 5). Доля
макрофагов, экспрессирующих молекулы CD163 и CD206 при добавлении в
культуру клеток ЛПС, у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ составила
3703,5 [2105,0;8422,0] усл. ед. и 6389 [4296,0;7075,0] усл. ед. соответственно от
общего количества CD45+клеток, тогда как у пациентов с отсутствием
предопухолевых изменений соответствующие показатели равнялись 1073,5
[1014,5;1702,5] усл.ед. и 2570 [2349,5;3047,5] усл.ед. при уровне значимости
 $p=0,043$ и $p=0,025$ (рисунок 6).

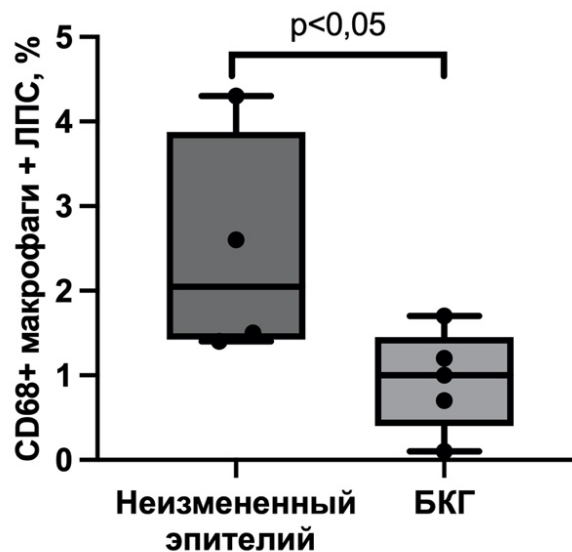


Рисунок 5 – Доля CD68+ макрофагов, культивируемых
с добавлением индуктора М1-поляризации ЛПС в группе
у больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений
и с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов.
Примечание: % – доля клеток; p – уровень значимости различий

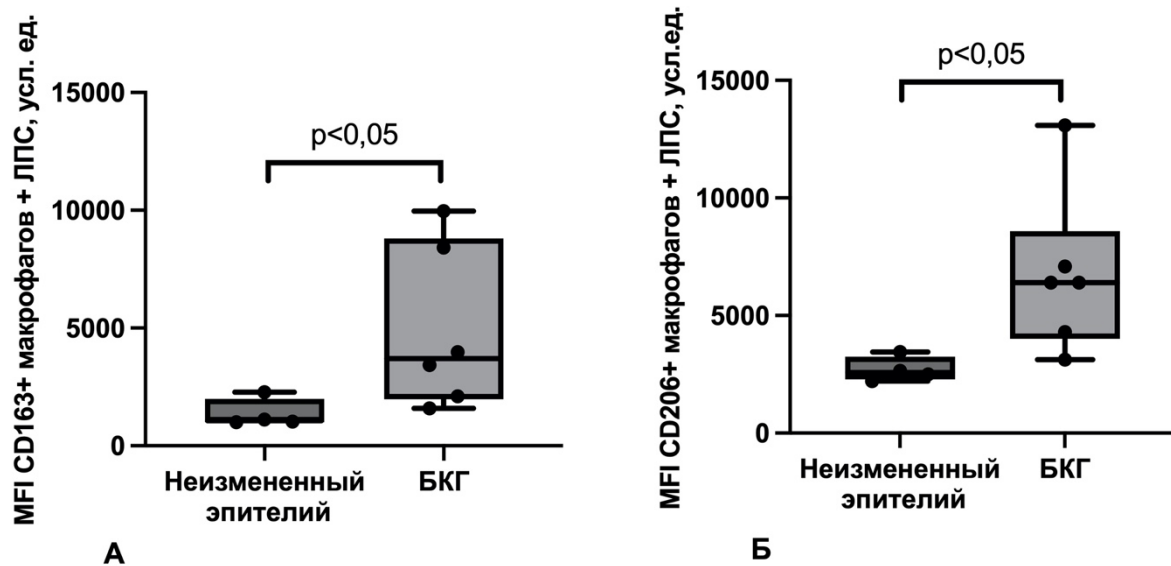


Рисунок 6 – Уровень флюоресценции M2-маркеров CD163 и CD206 на поверхности макрофагов, индуцированных из моноцитов периферической крови с добавлением индуктора M1-поляризации ЛПС в группе больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений и с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов: А – MFI молекулы CD163; Б – MFI молекулы CD206. Примечание: p – уровень значимости различий; MFI – медиана интенсивности флюоресценции, измеряемая в условных единицах

Таким образом, наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии у больных НМРЛ сопровождается снижением числа дифференцированных CD68+макрофагов, а также более выраженными признаками неадекватного ответа на M1- поляризующий сигнал, что проявляется в увеличенной экспрессии маркеров M2-поляризации CD163 и CD206 на поверхности индуцированных макрофагов.

3.4 Взаимосвязь наличия изолированной БКГ в респираторном эпителии с транскриптомным профилем макрофагов, индуцированных из моноцитов *in vitro*, у больных НМРЛ

Для понимания функциональной значимости для опухолевой прогрессии и иммуновоспалительных реакций генов, гиперэкспрессируемых или подавленных в макрофагах, было проведено полнотранскриптомное секвенирование 14 образцов *in vitro* индуцированных макрофагов, полученных у 14 больных НМРЛ с наличием

изолированной БКГ (n=10) и с отсутствием изменений в респираторном эпителии бронхов (n=4).

Транскриптомный профиль макрофагов, индуцированных из моноцитов *in vitro*, у больных НМРЛ без предопухолевых изменений и у пациентов с наличием изолированной БКГ при использовании метода главных компонент (МГК) не имел выраженных отличий (рисунок 7).

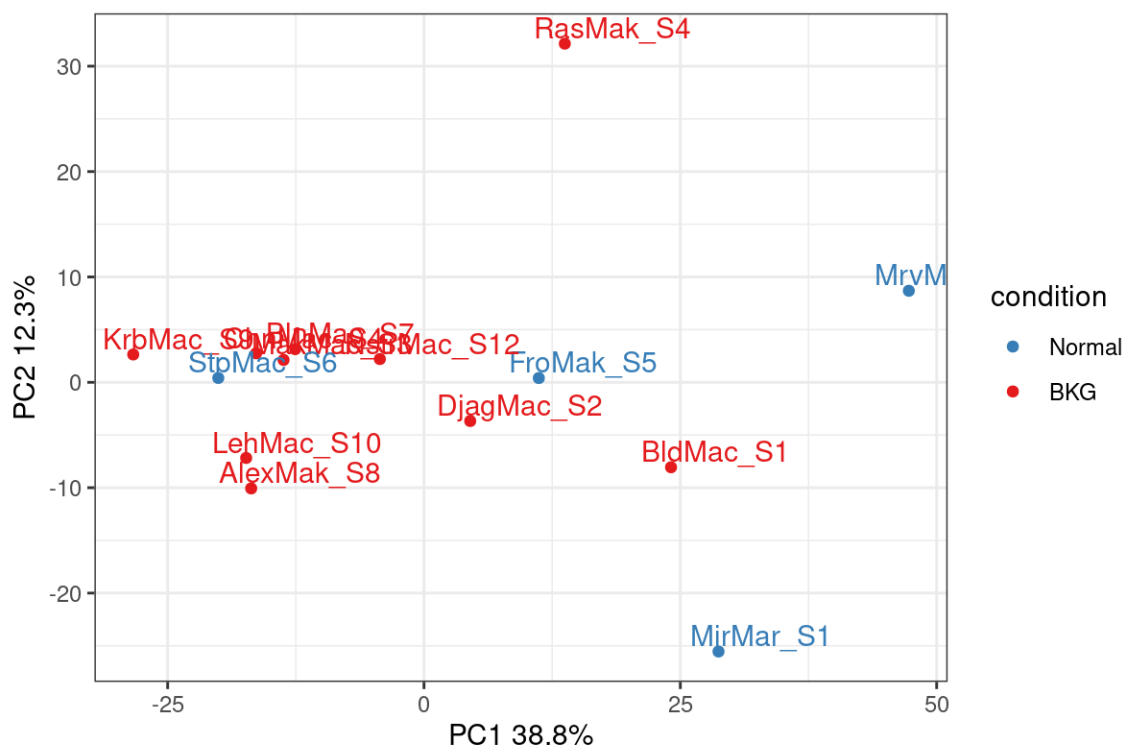


Рисунок 7 – Распределение образцов индуцированных макрофагов от больных без предопухолевых изменений (Normal) и с наличием изолированной БКГ (BKG) при использовании МГК

Дальнейший анализ дифференциальной экспрессии генов позволил выявить список гипо- и гиперэкспрессирующихся генов у больных НМРЛ в зависимости от наличия или отсутствия изолированной БКГ (рисунки 8–10). Было обнаружено 35 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), включая 21 гипоекспрессирующийся ген и 14 гиперэкспрессирующихся генов (рисунок 9). Далее в анализ были включены гены с $FDR < 0,05$ и $\log_2FC > 0,58$.

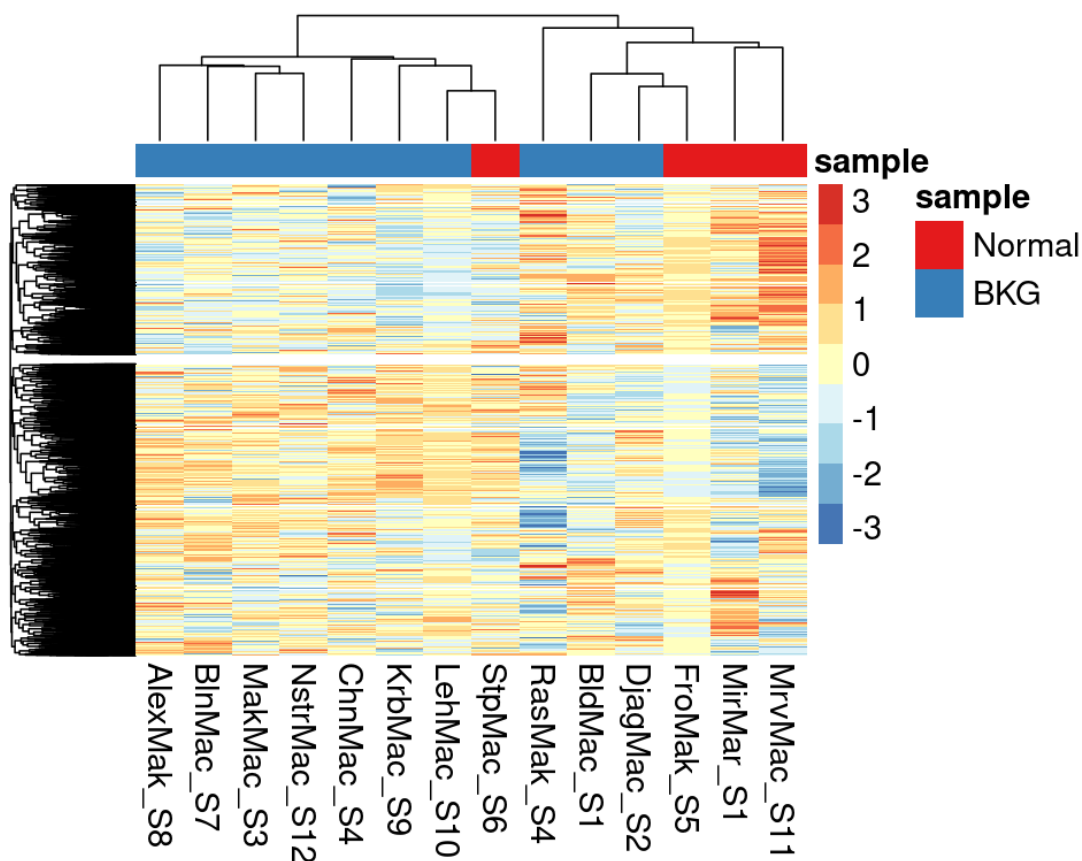


Рисунок 8 – Кластеризация образцов в зависимости от транскрипционной активности генов

Гипоэкспрессируемые гены у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ включали в себя: хемокиновый лиганд *CCL18*, эктонуклеотид пирофосфатаза *ENPP2*, подоплаин *PDPN*, металлоредуктаза *STEAP4*, рецептор формилпептида 1 *FPR1*, антисмысловая РНК *OVCH1-AS1*, костный морфогенетический белок 2 *BMP2*, богатый цистеином секреторный белок *CRISPLD2*, нейротрофический рецептор тирозинкиназы 2 *NTRK2*, рецептор-мусорщик *CD163*, секретогранин *SCG5*, гликозидаза *MYORG*, *TNIP3* (белок, взаимодействующий с *TNFAIP3*); гены, связанные с циклом клеточного деления *CDCA3*, *CDCA2*, *INTS13*; хинонредуктаза *NQO2*, серглицин *SRGN* с $\log_2FC > 0,58$ и $FDR < 0,05$ (рисунки 9, 10).

В список гиперэкспрессированных генов у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ вошли следующие: ABC транспортер *ABCA7*, плексин А3 *PLXNA3*, кислая фосфатаза *ACP5*, точек разрыва нейробластомы *NBPF9* и *NBPF15*,

миомезин *MYOM1*, Fas-связывающий фрагмент *FBF1*, EGF-подобный домен *MEGF6*, галактозилтрансфераза *B3GALT2*, малая нуклеолярная РНК *SNORD15B*, интегрин *ITGA6*, комплекс ядерных пор *NPIP15* с $\log_2FC > 0,58$ и $FDR < 0,05$ (см. рисунки 9, 10).

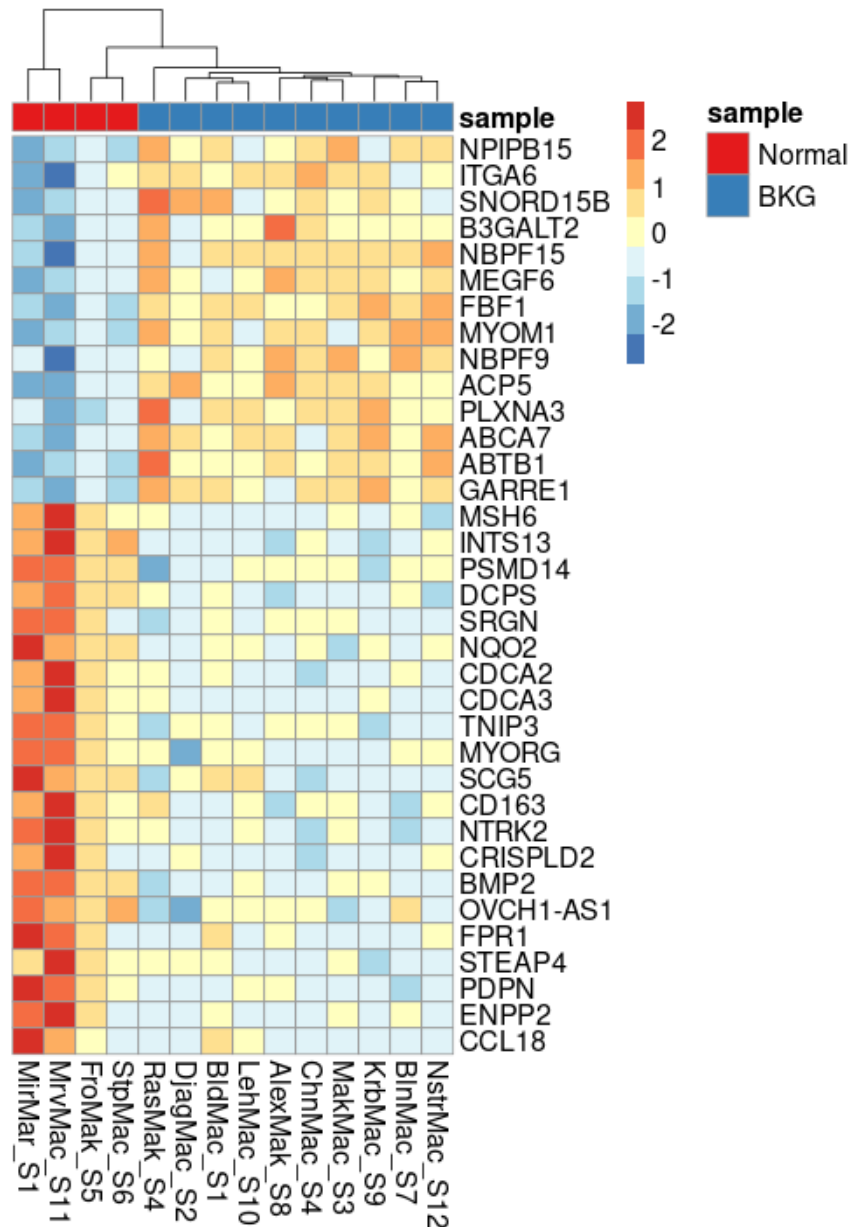


Рисунок 9 – Тепловая карта изменения уровня экспрессии генов ($\log_2FC$) макрофагов, индуцированных из моноцитов *in vitro*, у больных НМРЛ без предопухолевых изменений и с наличием изолированной БКГ, $FDR < 0,05$

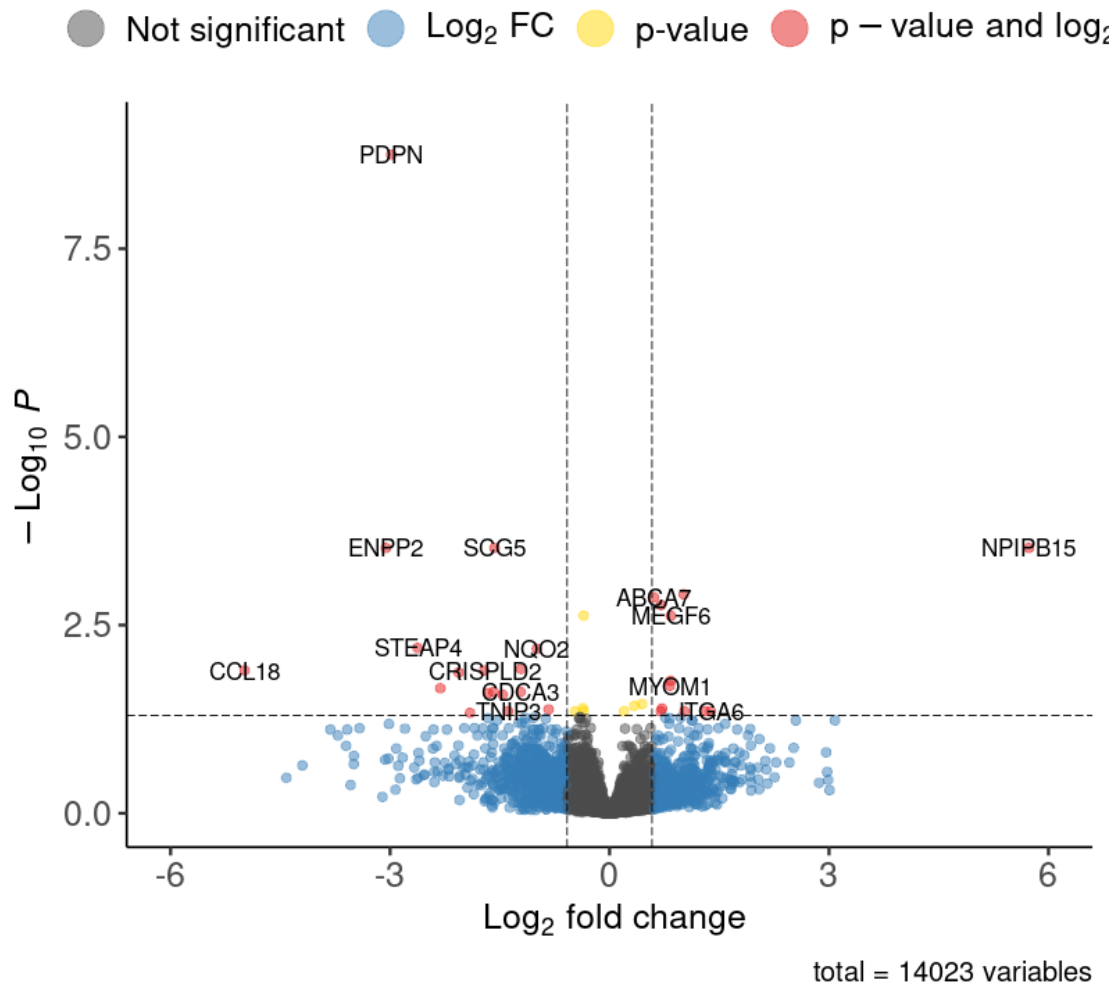


Рисунок 10 – Дифференциальная экспрессия генов, выявленная в *in vitro* индуцированных макрофагах у больных НМРЛ без предопухолевых изменений и с наличием изолированной БКГ ($\log_2\text{FC} < 0,58$; $\text{FDR} < 0,05$)

С использованием баз данных KEGG, Reactome и Hallmark была получена информация о сигнальных молекулярных каскадах. Показано, что наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии связано с подавлением путей, ассоциированных с различными этапами клеточного цикла, цитокин-цитокиновыми взаимодействиями, процессингом и презентацией антигенов, воспалительными процессами, процессами ответа на ИФН γ и ИФН α ; процессами активации сигнальных путей IL2/STAT5, IL6/JAK/STAT3, mTORC1, Toll-подобных рецепторов, Т-клеточных рецепторов. При этом у данной группы пациентов активировались сигнальные пути, связанные с mTOR, активацией рецептора NMDA за счет притока ионов кальция и передачи сигналов RAS,

передачей вкуса и обоняния, синтезом и метаболизмом фосфоинозитол фосфатов (рисунок 11).

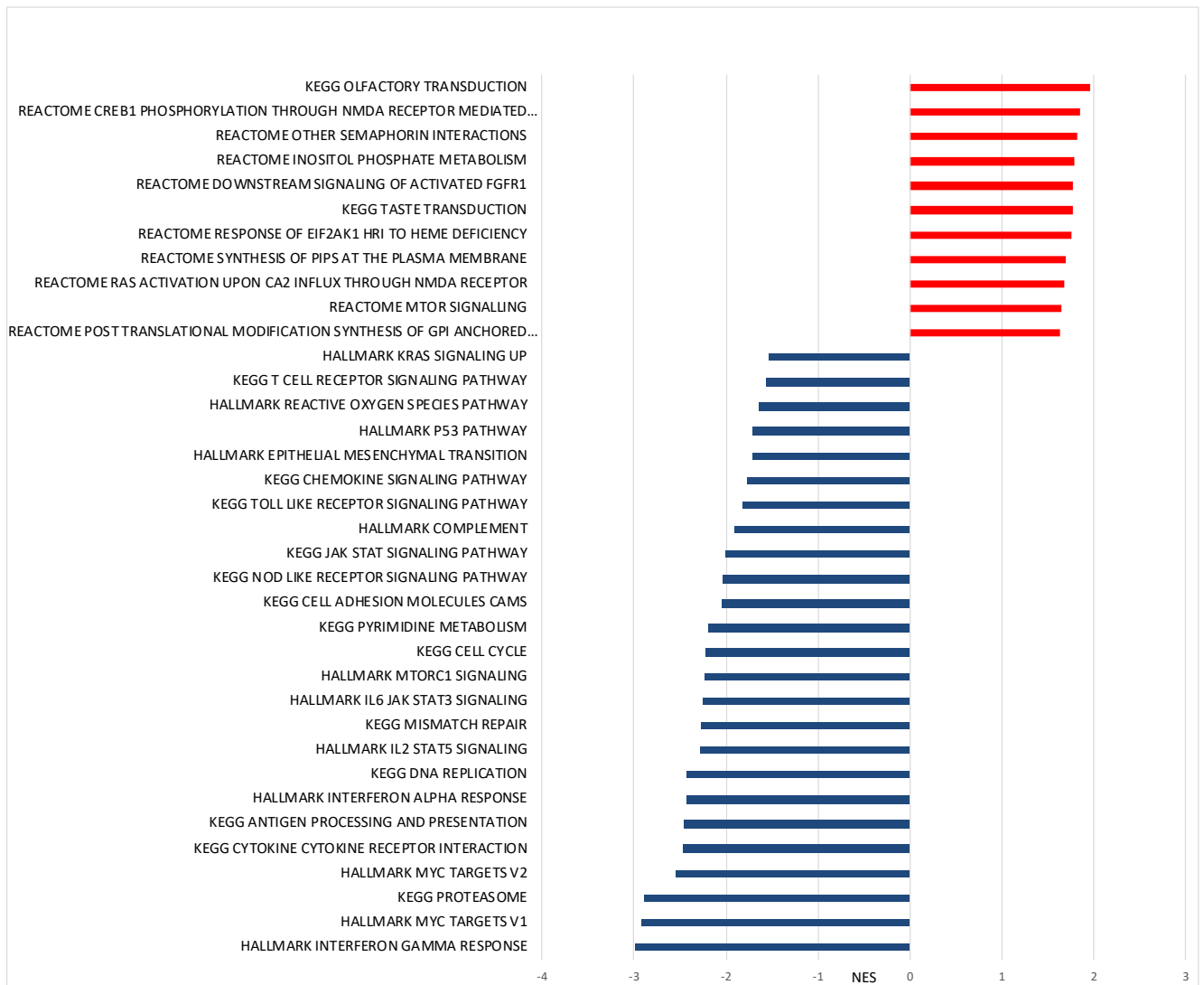


Рисунок 11 – Информация о сигнальных путях из баз данных KEGG, Reactome, Hallmark, по дифференциально экспрессирующимся генам, ранжированным по p -adjusted и параметру NES. Примечание: параметр NES со знаком плюс указывает на то, что данные пути активируются у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ, со знаком минус – что данные пути активируются у больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений

Анализ биологических процессов с использованием базы данных Gen Ontology показал, что наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии, помимо процессов, ассоциированных с клеточным циклом, связано с подавлением процессов дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток, процессинга и

презентации антигенов, подавления процессов, связанных с различными стадиями клеточного цикла (рисунок 12). При этом из биологических процессов, которые активировались при наличии изолированной БКГ, следует отметить следующие: процессы, связанные с активацией транспорта ионов кальция; движением ресничек; клеточной адгезии; синтез липопротеинов; сенсорное восприятие вкуса, химических стимулов.

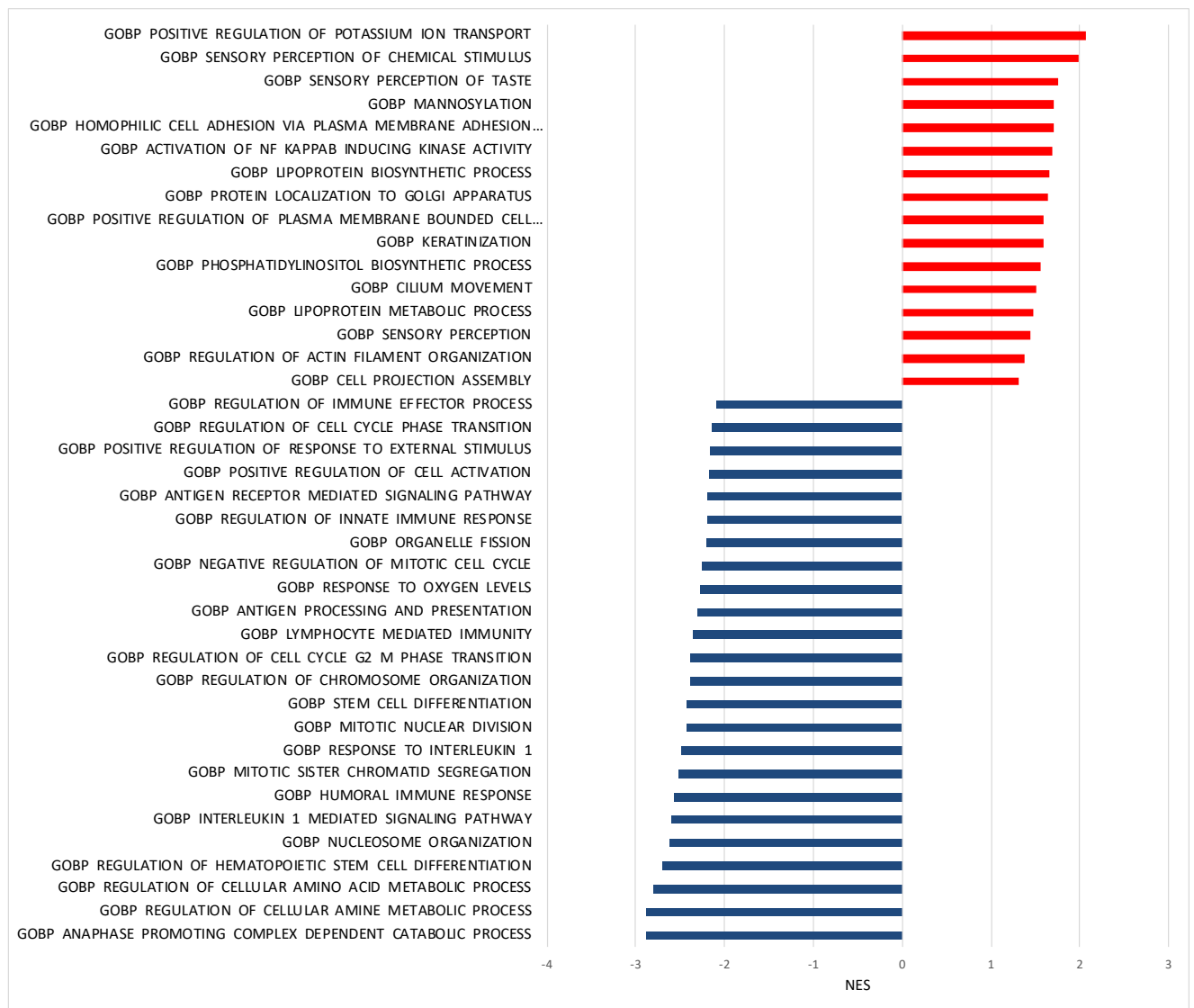


Рисунок 12 – Биологические процессы из баз данных Gen Ontology, по дифференциально экспрессирующимся генам, ранжированным по p-adjusted и параметру NES. Примечание: параметр NES со знаком плюс указывает на то, что данные пути активируются у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ, со знаком минус – активируются у больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений

3.5 Связь SNP с фенотипическими особенностями моноцитов периферической крови и индуцированных *in vitro* макрофагов у больных НМРЛ

Обнаруженная связь состояния респираторного эпителия (отсутствие предопухолевых изменений или наличие изолированной БКГ) с генетическими особенностями (однонуклеотидные полиморфизмы ряда генов) у пациентов с НМРЛ может быть опосредована функциональным профилем клеток моноцитарно-макрофагального ряда. С целью выявления вовлечения моноцитов и индуцированных из них макрофагов в реализацию генетической детерминированности предопухолевых изменений была выполнена оценка фенотипических особенностей исследуемых клеток в зависимости от генотипа генов *CNTN2*, *POLRIC*, *PTPRZ1*, *MUC19*, *DNJA4*.

Из 116 пациентов, вошедших в исследование, фенотипические признаки клеток моноцитарно-макрофагального ряда были оценены у 19 пациентов. В данной подгруппе больных из 5 выявленных в общей группе полиморфных генов (*CNTN2*, *POLRIC*, *PTPRZ1*, *MUC19*, *DNJA4*) полиморфизмы были представлены лишь в генах *POLRIC*, *MUC19*. Была исследована связь наличия гомозиготного или гетерозиготного генотипа данных генов с фенотипическими особенностями моноцитов и индуцированных из них макрофагов.

Фенотипические особенности моноцитов периферической крови оказались не связаны с различными вариантами генотипов генов *POLRIC* и *MUC19*.

Макрофаги, культивируемые без добавления индукторов поляризации, имели фенотипические различия в зависимости от генотипов гена *POLRIC*. Так, наличие гетерозиготного генотипа AG гена *POLRIC* у больных НМРЛ сопровождалось увеличением доли CD68+163+макрофагов на уровне статистической значимости по сравнению с больными НМРЛ с наличием генотипа AA гена *POLRIC*: 1[0,8;1,4] % и 0,0 [0,0;0,5] % соответственно, $p=0,02$ (рисунок 13, В). Кроме того, генотип AG гена *POLRIC* на уровне статистической тенденции оказался ассоциирован с увеличением в 1,2 раза экспрессии молекулы

CD16 и уменьшением в 1,7 раза экспрессии CD206 на поверхности макрофагов: 4218,0 [4055,0;5398,0] усл. ед. против 3384,5 [2767,0;3812,0] усл. ед., $p=0,09$ и 2938,0 [1132,0;3997,0] усл. ед. против 5210,0 [4622,0;5466,0] усл. ед., $p=0,07$ соответственно, по сравнению с показателями у больных с наличием генотипа AA гена *POLR1C* (рисунки 13, А, Б).

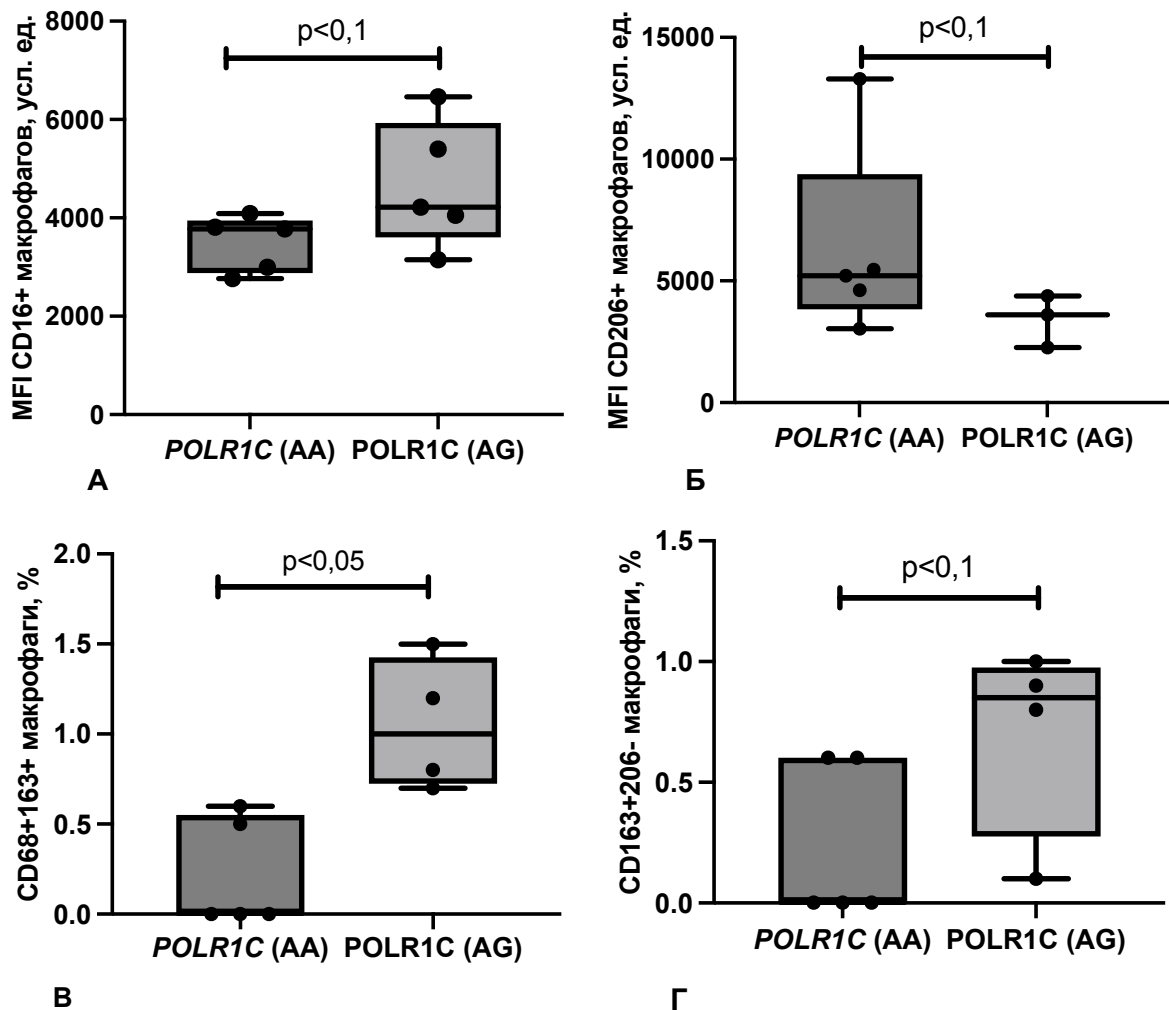


Рисунок 13 – Фенотипические особенности макрофагов, индуцированных из моноцитов периферической крови без добавления индукторов поляризации, в группах больных НМРЛ с наличием генотипа AA и генотипа AG гена *POLR1C*:

А – MFI CD16+ макрофагов; Б – MFI CD206+ макрофагов; В – доля клеток, экспрессирующих CD68 и CD163; Г – доля клеток, экспрессирующих CD163.

Примечание: % – доля клеток; MFI – медиана интенсивности флюоресценции, измеряемая в условных единицах; p – уровень значимости различий

Наличие генотипа AG гена *POLR1C* на уровне статистической тенденции было связано с увеличением доли CD163+206-макрофагов у больных НМРЛ по сравнению с больными, имеющими генотип AA гена *POLR1C*: 0,85 [0,5;0,95] % и 0,0 [0,0;0,6] %, соответственно, $p=0,06$ (рисунок 13, Г).

Макрофаги, культивируемые с добавлением индуктора M2- поляризации ИЛ-4, имели фенотипические различия в зависимости от генотипов гена *POLR1C*. Генотип AG гена *POLR1C* на уровне статистической тенденции оказался ассоциирован с увеличением в 10 раз количества CD68+ макрофагов и уменьшением экспрессии молекулы CD206 в 2,5 раза на поверхности макрофагов: 2,0 [1,3;2,9] % против 0,2 [0,0;1,7] %, $p=0,07$ и 3265,0 [2317,0;4973,0] усл. ед. против 8057,0 [6045,0;10053,0] усл. ед., $p=0,07$, соответственно, по сравнению с больными с наличием генотипа AA гена *POLR1C* (рисунок 14).

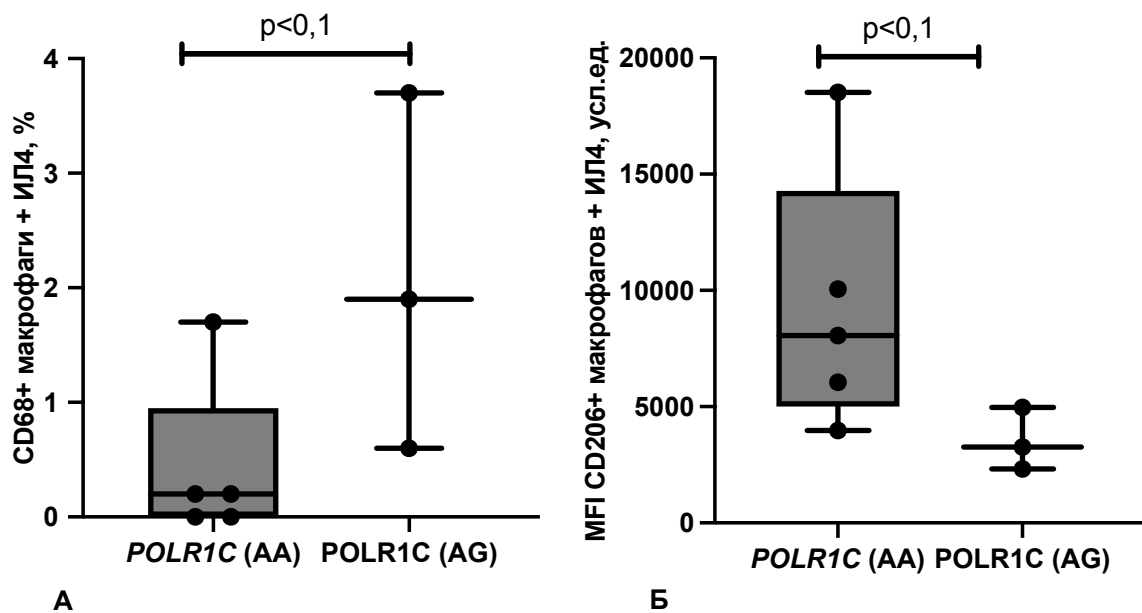


Рисунок 14 – Фенотипические особенности макрофагов, индуцированных из моноцитов периферической крови, с добавлением индуктора M2-поляризации ИЛ-4 в группах больных НМРЛ с наличием генотипа AA и генотипа AG гена *POLR1C*: А – доля клеток экспрессирующих CD68; Б – MFI CD206+ макрофагов. Примечание: % – доля клеток; MFI – медиана интенсивности флюоресценции, измеряемая в условных единицах;
p – уровень значимости различий

Генотип AG гена *POLR1C* у больных НМРЛ оказался ассоциирован с увеличением доли CD68+макрофагов при добавлении индуктора M1-поляризации ЛПС в 3,7 раза по сравнению с больными НМРЛ с наличием генотипа AA гена *POLR1C*: 2,6 [1,4;4,3] % и 0,7 [0,1;1,0] % соответственно, $p=0,04$ (рисунок 15, А).

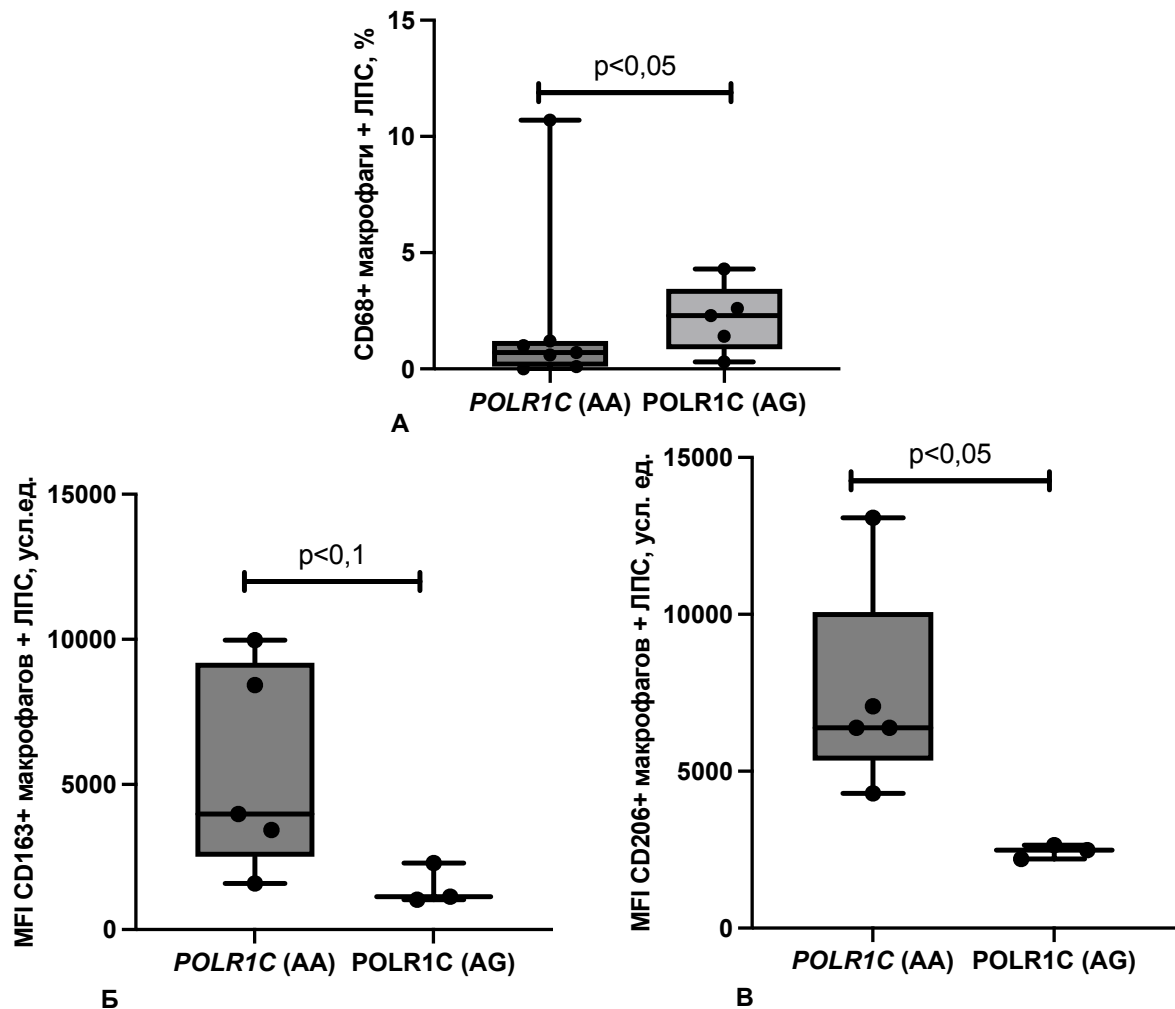


Рисунок 15 – Фенотипические особенности макрофагов, индуцированных из моноцитов периферической крови, с добавлением индуктора M1-поляризации ЛПС в группах больных НМРЛ с наличием генотипа AA и генотипа AG гена *POLR1C*: А – доля клеток, экспрессирующих CD68; Б - MFI CD163+ макрофагов; В – MFI CD206+ макрофагов. Примечание: % – доля клеток; MFI – медиана интенсивности флюоресценции, измеряемая в условных единицах; p – уровень значимости различий

Кроме того, генотип AG гена *POLR1C* связан с уменьшением в 3,5 раза экспрессии молекулы CD163 на поверхности макрофагов по сравнению с

параметрами у больных НМРЛ, имеющих генотип АА гена *POLRIC* (1122,0 [1025,0;2283,0] усл. ед. против 3979,0 [3428,0;8422,0] усл. ед., $p=0,07$, соответственно) (рисунок 15, Б). На уровне статистической значимости генотип АГ гена *POLRIC* был связан с уменьшением в 2,6 раза экспрессии молекулы CD206 на поверхности макрофагов по сравнению с показателем у больных НМРЛ, имеющих генотип АА гена *POLRIC* (2493,0 [2206,0;2647,0] усл. ед. против 6931,0 [6388,0;8422,0] усл. ед., $p=0,04$, соответственно) (рисунок 15, В).

Фенотипический профиль макрофагов, индуцированных из моноцитов *in vitro* без добавления индукторов поляризации, оказался не связан с вариантом генотипа гена *MUC19*. У больных НМРЛ, имеющих гетерозиготный генотип СТ гена *MUC19*, культивирование макрофагов с добавлением индуктора М2-поляризации ИЛ-4 сопровождалось увеличением в 2 раза экспрессии рецептора CD68 на поверхности клеток по сравнению с макрофагами у больных НМРЛ с генотипом СС гена *MUC19*, $p=0,07$ (5809,5 [4733,0;6886,0] усл. ед. против 2879,0 [1731,0;4083,0] усл. ед. соответственно) (рисунок 16).

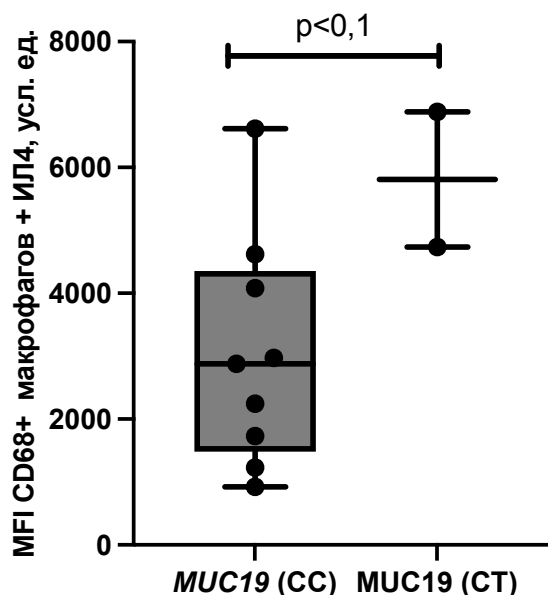


Рисунок 16 –Уровень экспрессии молекулы CD14 на поверхности макрофагов, культивируемых с добавлением индуктора М2-поляризации ИЛ-4 в группах больных НМРЛ с наличием генотипа СС и генотипа СТ гена *MUC19*.

Примечание: p – уровень значимости различий; MFI – медиана интенсивности флюоресценции, измеряемая в условных единицах

Фенотипические особенности макрофагов, культивируемых с добавлением индуктора М1-поляризации ЛПС, были связаны с генотипом гена *MUC19*: наличие гетерозиготного варианта СТ характеризовалось уменьшением в 1,6 раза экспрессии молекулы CD14 на поверхности по сравнению с параметром у больных НМРЛ, имеющих гомозиготный генотип СС гена *MUC19*, $p=0,03$ (1891,0 [1695,0;2498,0] усл. ед. против 2949,0 [2710,0;4072,0] усл. ед. соответственно) (рисунок 17).

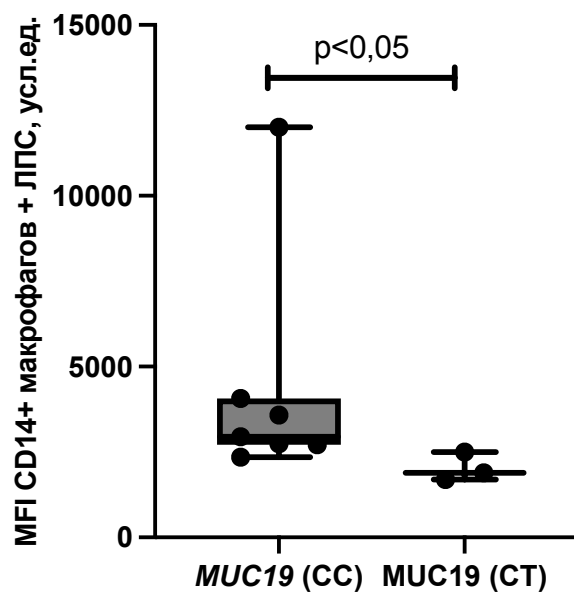


Рисунок 17 – Уровень экспрессии молекулы CD14 на поверхности макрофагов, культивируемых с добавлением индуктора М1-поляризации ЛПС в группах больных НМРЛ с наличием генотипа СС и генотипа СТ гена *MUC19*. Примечание: p – уровень значимости различий; MFI – медиана интенсивности флюоресценции, измеряемая в условных единицах

Таким образом, наличие гомозиготного генотипа АА или гетерозиготного генотипа АG гена *POLRIC*, генотипа СС и СТ гена *MUC19* связано с фенотипическими особенностями макрофагов, индуцированных из моноцитов *in vitro*.

3.6 Ассоциация фенотипических и генотипических особенностей клеток моноцитарно-макрофагальной линии с риском развития гематогенных метастазов у больных НМРЛ

Состояние респираторного эпителия обладает прогностической ценностью, о чем свидетельствуют полученные ранее данные: наличие изолированной БКГ связано с высокой частотой возникновения гематогенных метастазов у больных НМРЛ. Нами было установлено, что существует связь фенотипических и транскриптомных особенностей индуцированных макрофагов с состоянием респираторного эпителия бронхов у больных НМРЛ. Также мы показали, что существует связь фенотипических особенностей клеток моноцитарно-макрофагального ряда с конститутивными генотипическими характеристиками (SNP), что, в свою очередь, может приводить к различным вариантам протекания опухолевого процесса. На основании высказанной гипотезы мы решили изучить связь данных факторов (фенотипические и транскриптомные особенности макрофагов, состояние респираторного эпителия и наличие полиморфных вариантов генов) с развитием гематогенных метастазов.

3.6.1 Оценка показателей безметастатической выживаемости у больных НМРЛ в зависимости от наличия изолированной БКГ или отсутствия предопухолевых изменений в эпителии бронхов

Для оценки безметастатической выживаемости был применен метод Каплана-Мейера, представлены данные выживаемости для всей группы пациентов, включенных в исследование, в виде графика Каплана-Мейера и медианы выживаемости.

Медиана выживаемости для общей группы наблюдения составила - 34,9 месяцев (Рисунок 18).

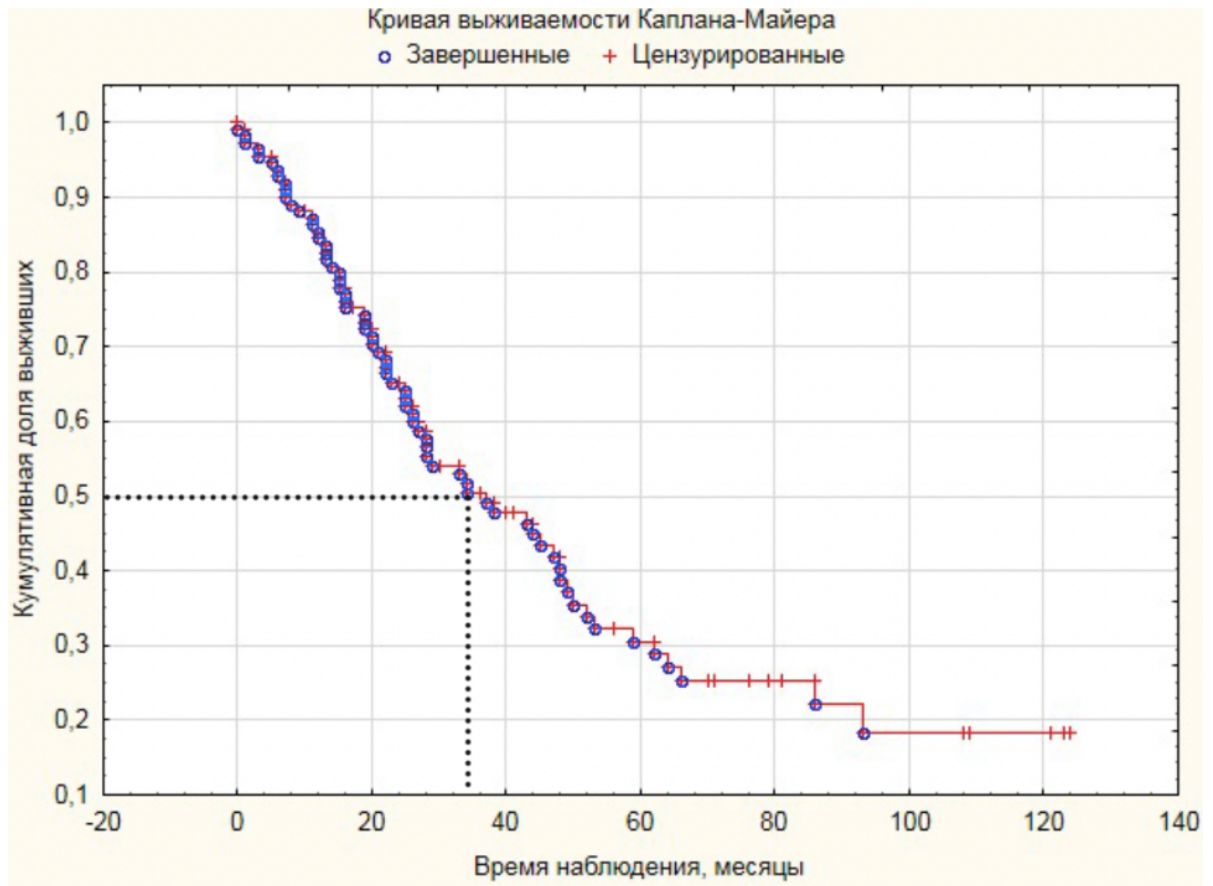


Рисунок 18 – Кривая кумулятивной выживаемости у больных НМРЛ, месяцы.

Медиана выживаемости для больных НМРЛ с наличием изолированной БКТ составила – 29,6 месяцев. Медиана выживаемости у больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений не была достигнута (Gehan's Wilcoxon Test = -1,44276; $p = 0,14909$) (Рисунок 19).

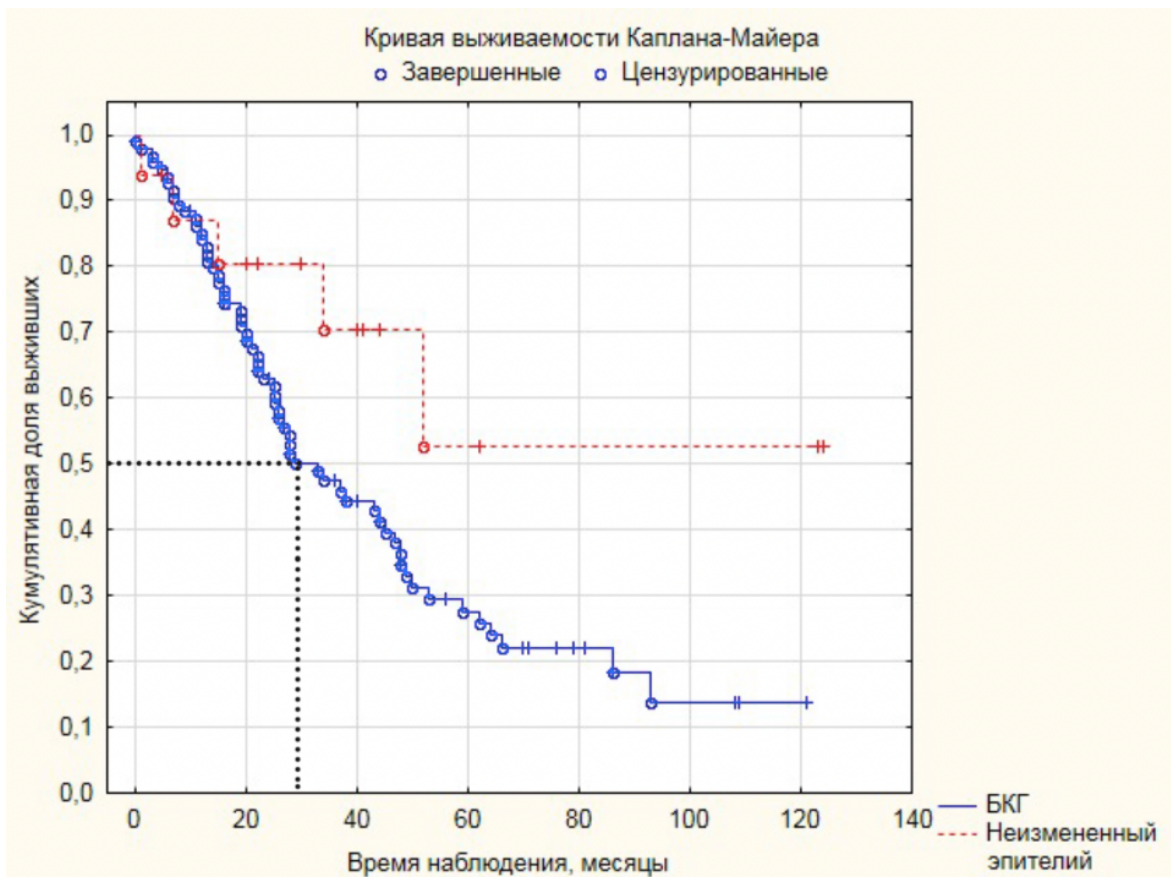


Рисунок 19 – Кривая безметастатической выживаемости у больных НМРЛ в зависимости от наличия изолированной БКГ или отсутствия предопухолевых изменений, месяцы

3.6.2 Частота встречаемости гематогенных метастазов среди пациентов с изолированной БКГ и с отсутствием предопухолевых изменений в респираторном эпителии

Ранее было установлено, что наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии мелких бронхов в отдалении от первичного опухолевого узла было ассоциировано с возникновением гематогенных метастазов [178].

В проведенном исследовании также показано, что частота встречаемости гематогенных метастазов выше у пациентов с наличием изолированной БКГ по сравнению с группой больных НМРЛ, у которых отсутствовали предопухолевые изменения в респираторном эпителии ($p < 0,02$) (таблица 8).

Таблица 8 – Частота развития гематогенных метастазов или отсутствия прогрессирования у больных НМРЛ в зависимости от состояния респираторного эпителия

	Развитие гематогенных метастазов n/%	Отсутствие прогрессирования
Отсутствие предопухолевых изменений	3/14,3	18/85,7
Изолированная БКГ	42/44,7	52/55,3

3.6.3 Частота встречаемости SNP у больных НМРЛ в зависимости от развития гематогенных метастазов

Нами была показана связь наличия SNP и состояния респираторного эпителия: SNP в генах *CNTN2*, *POLRIC*, *PTPRZ1*, *MUC19*, *DNJA4* встречались значительно чаще у больных с отсутствием респираторных изменений в мелких бронхах в отдалении от первичного опухолевого узла по сравнению с больными НМРЛ, у которых было обнаружено наличие изолированной БКГ. Поскольку наличие изолированной БКГ связано с развитием гематогенных метастазов, мы решили оценить частоту встречаемости значимых для состояния респираторного эпителия полиморфизмов у пациентов с развившимися гематогенными метастазами и у больных НМРЛ без признаков прогрессирования на момент исследования (таблица 9).

В результате было установлено, что частота встречаемости гетерозиготного генотипа гена *MUC19* у больных НМРЛ с наличием гематогенных метастазов на уровне статистической значимости ниже, чем у пациентов с отсутствием гематогенных метастазов ($p=0,038$).

Таблица 9 – Частота встречаемости генотипов генов *CNTN2*, *POLR1C*, *PTPRZ1*, *MUC19*, *DNJA4* у больных НМРЛ с развившимися гематогенными метастазами или без признаков прогрессирования

SNP	Отсутствие признаков прогрессирования		Гематогенные метастазы	
	n/%	n/%	n/%	n/%
<i>CNTN2</i> rs17416074 G>A	GG 67/95,7	GA 3/4,3	GG 45/100,0	GA 0/0,0
<i>POLR1C</i> rs2297336 A>G	AA 57/81,4	AG 13/18,6	AA 39/86,7	AG 6/13,3
<i>PTPRZ1</i> rs74821923 G>C	GG 69/98,6	GC 1/1,4	GG 45/100,0	GC 0/0,0
<i>MUC19</i> rs11176826 C>T	CC 45/64,3	CT* 25/35,7	CC 37/82,2	CT* 8/17,8
<i>DNJA4</i> rs61752771 T>C	TT 69/98,6	TC 1/1,4	TT 45/100,0	TC 0/0,0
Примечание: n – абсолютная частота встречаемости генотипа; % – частота встречаемости генотипа, выраженная в процентах, * – статистически значимые различия в частоте встречаемости генотипов между группой больных НМРЛ с отсутствием признаков прогрессирования и группой с наличием гематогенных метастазов				

Для генов *CNTN2*, *POLR1C*, *PTPRZ1*, *DNJA4* не было выявлено статистически значимых различий по частоте встречаемости генотипов в зависимости от наличия или отсутствия гематогенных метастазов ($p>0,05$).

3.6.4 Взаимосвязь гематогенного метастазирования с особенностями клеток моноцитарно-макрофагальной линии у больных НМРЛ

Для оценки связи развития гематогенных метастазов с фенотипическими особенностями моноцитов и макрофагов, индуцированных из моноцитов *in vitro*, мы использовали непараметрический критерий Манна – Уитни.

Фенотипических различий между моноцитами больных НМРЛ с наличием гематогенных метастазов и моноцитами больных НМРЛ с отсутствием гематогенных метастазов не было выявлено.

Развитие гематогенных метастазов у больных НМРЛ ассоциировано с увеличением в 2 раза доли спонтанно индуцированных CD68+163+ макрофагов при культивировании их *in vitro* на этапе диагностики заболевания по сравнению с больными без признаков прогрессирования (0,9 [0,8;1,2]% против 0,5 [0,0;0,9]%, соответственно, $p=0,08$) (рисунок 20).

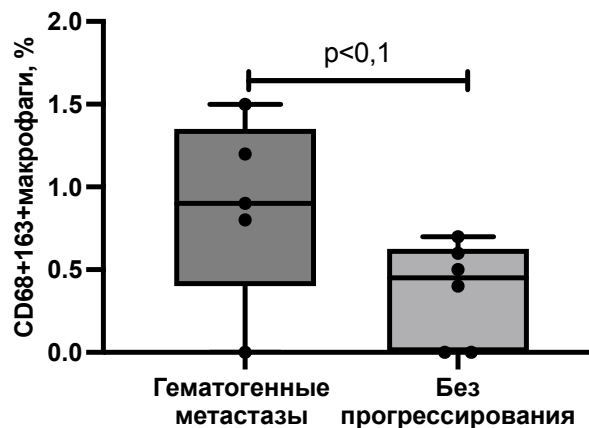


Рисунок 20 – Доля спонтанно индуцированных CD68+ CD163+ макрофагов в группах больных НМРЛ с развившимися впоследствии гематогенными метастазами и без признаков прогрессирования.

Примечание: p – уровень значимости различий

Макрофаги у больных НМРЛ, культивируемые с добавлением индуктора M2-поляризации ИЛ-4, не имели фенотипических различий в зависимости от развития впоследствии гематогенных метастазов или отсутствия признаков прогрессирования.

Больные НМРЛ, у которых впоследствии были выявлены гематогенные метастазы, характеризовались большим количеством CD68+ макрофагов при добавлении индуктора М1-поляризации ЛПС по сравнению с пациентами, у которых прогрессирование не отмечено (1,7 [1,4;2,6]% против 1,0 [0,1;1,2]% соответственно, $p=0,09$) (рисунок 21, А). Кроме того, развитие впоследствии гематогенных метастазов у больных НМРЛ на уровне статистической тенденции оказалось ассоциированным с меньшей экспрессией молекул CD14 и CD206 на поверхности макрофагов с добавлением индуктора М1-поляризации ЛПС, отмеченной на этапе диагностики заболевания: 2498,0 [2353,0;2903,0] усл. ед. против 3828,5 [2710,0;4480,0] усл. ед., $p=0,09$ и 2647,0 [2493,0;3120,0] усл. ед. против 6388,0 [4296,0;7075,0] усл. ед., $p=0,06$, соответственно, по сравнению с больными НМРЛ, у которых отсутствовали признаки прогрессирования (рисунки 21, Б, В).

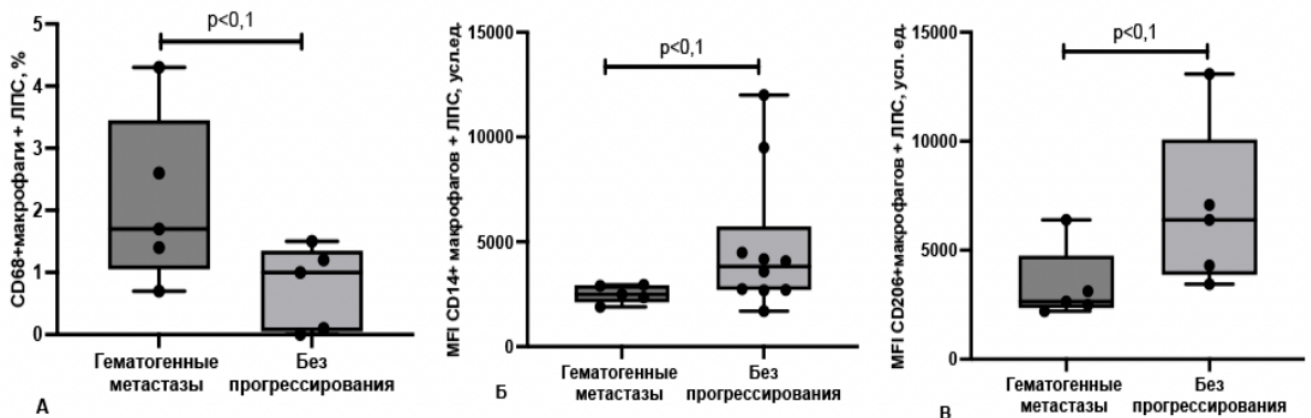


Рисунок 21 – Фенотипические особенности макрофагов, индуцированных из моноцитов периферической крови, с добавлением индуктора М1-поляризации ЛПС в группах больных НМРЛ с развившимися впоследствии гематогенными метастазами и отсутствием прогрессирования: А – доля клеток, экспрессирующих CD68; Б – уровень экспрессии молекулы CD14 на макрофагах; В – уровень экспрессии молекулы CD206 на макрофагах. Примечание: % – доля клеток; MFI – медиана интенсивности флюоресценции, измеряемая в условных единицах; p – уровень значимости различий

Таким образом, фенотипические особенности клеток моноцитарно-макрофагального ряда на этапе постановки диагноза связаны с последующим клиническим течением НМРЛ – развитием гематогенных метастазов или отсутствием прогрессирования.

3.6.5 Фенотипические особенности моноцитов периферической крови и индуцированных макрофагов у больных НМРЛ с развившимися гематогенными метастазами в зависимости от наличия или отсутствия базальноклеточной гиперплазии

Было проведено сравнение показателей моноцитов, спонтанно индуцированных макрофагов, а также макрофагов, индуцированных ИЛ-4 и ЛПС у пациентов с развившимся прогрессированием в зависимости от наличия или отсутствия изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов. В результате проведенного анализа статистически значимых различий между фенотипическими особенностями моноцитов и макрофагов у больных НМРЛ с развившимся прогрессированием в зависимости от наличия или отсутствия изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов до начала противоопухолевой терапии обнаружено не было.

У пациентов с НМРЛ, характеризующихся благоприятным течением заболевания (отсутствие признаков прогрессирования в течение периода наблюдения), отмечена связь состояния респираторного эпителия с количеством дважды негативных CD14-16-макрофагов при культивировании клеток в присутствии индуктора M2-поляризации ИЛ-4. Показано, что у пациентов при наличии изолированной БКГ данный показатель был на 16,7% ниже соответствующего параметра в группе с отсутствием предопухолевых изменений (88,0 [69,6;90,7] % против 96,6 [81,1;97,5] % соответственно) (рисунок 22, А). При добавлении индуктора M1-поляризации ЛПС наблюдалась схожая картина: снижение количества CD14-16-макрофагов на 17,8% у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ по сравнению с больными НМРЛ, у которых отсутствовали

предопухолевые изменения (77,9 [60,5;86,4] % против 94,8 [83,7;99,1] % соответственно) (рисунок 22, Б). Полученные различия наблюдались лишь на уровне статистической тенденции ($p < 0,1$).

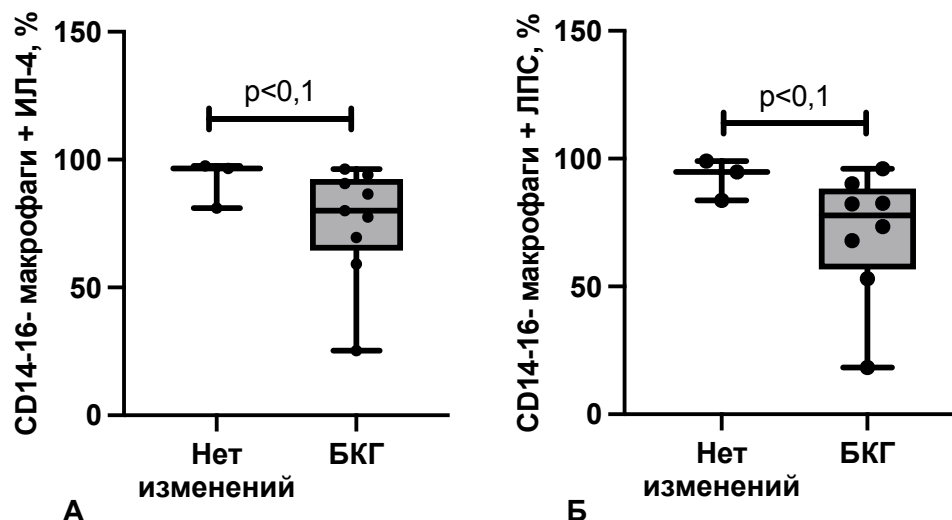


Рисунок 22 – Фенотипические особенности макрофагов, индуцированных из моноцитов периферической крови, в группах больных НМРЛ без гематогенных метастазов в зависимости от наличия или отсутствия БКГ: А – доля CD14-16- клеток при добавлении ИЛ-4; Б – доля CD14-16- клеток при добавлении ЛПС. Примечание: % – доля клеток; p – уровень значимости различий

Таким образом, в условиях, способствующих развитию гематогенных метастазов, наличие или отсутствие изолированной БКГ не связано с фенотипическими особенностями моноцитов и макрофагов, в то время как при благоприятном клиническом течении изолированная БКГ ассоциирована с меньшей долей макрофагов, потерявших признаки популяционной моноцитарной принадлежности при добавлении индукторов поляризации.

Далее нами было проведено сравнение фенотипических особенностей моноцитов и индуцированных макрофагов у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в зависимости от того, развивались ли гематогенные метастазы в будущем или нет.

Установлено, что у больных с изолированной БКГ развившиеся гематогенные метастазы на уровне статистической тенденции ассоциированы с более низким количеством CD68+ моноцитов в циркуляции по сравнению с пациентами, у которых прогрессирование не было отмечено (0,4 [0,4;0,4] % против 3,6 [1,85;32,4] % соответственно) (рисунок 23).

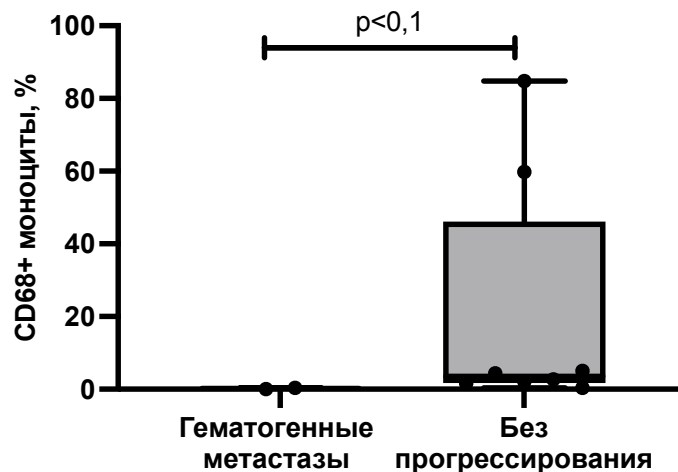


Рисунок 23 – Доля CD68+моноцитов у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в зависимости от развившихся впоследствии гематогенных метастазов или отсутствия прогрессирования. Примечание: % – доля клеток; p – уровень значимости различий

Сравнение фенотипических особенностей моноцитов и индуцированных макрофагов у больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений в зависимости от того, развивались ли гематогенные метастазы в будущем или нет, позволило установить следующее: гематогенные метастазы у больных с отсутствием предопухолевых изменений связано с меньшей экспрессией рецептора к ЛПС CD14 при культивировании с индуктором M1-поляризации ЛПС по сравнению с больными, у которых прогрессирование не было отмечено (2353,0 [1891,0;2498,0] у.е. против 4168,0 [3585,0;4480,0] у.е. соответственно) (рисунок 24).

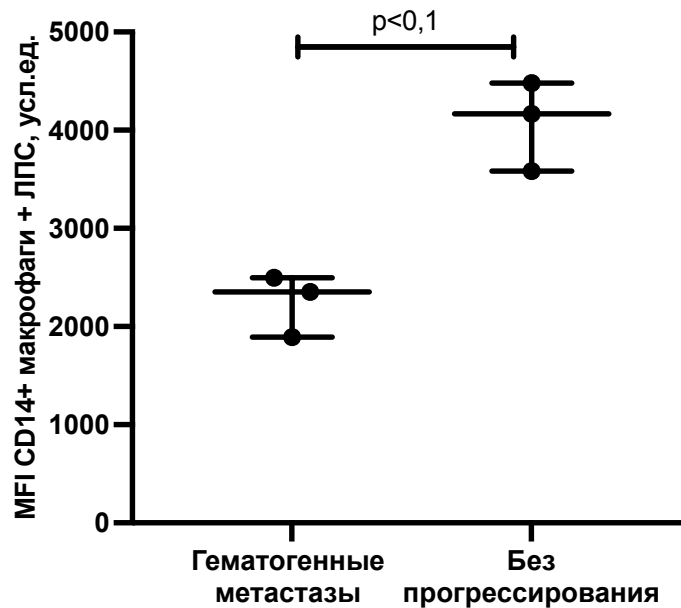


Рисунок 24 – Экспрессия молекулы CD14 на поверхности макрофагов, культивируемых с добавлением индуктора M1-поляризации (ЛПС) у больных НМРЛ с отсутствием респираторных изменений в зависимости от развившихся впоследствии гематогенных метастазов или отсутствия прогрессирования. Примечание: MFI – медиана интенсивности флюоресценции, измеряемая в условных единицах; p – уровень значимости различий

Таким образом, развитие гематогенных метастазов у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ и с эпителием без предопухолевых изменений связано с различными популяциями моноцитов и индуцированных макрофагов. Развившиеся впоследствии гематогенные метастазы у пациентов с наличием изолированной БКГ ассоциированы с низким количеством CD68⁺ моноцитов, а у больных с отсутствием предопухолевых изменений в респираторном эпителии связаны с нарушением ответа на индуктор M1-поляризации ЛПС.

3.6.6 Математическая модель предсказания риска развития гематогенных метастазов у больных НМРЛ с учетом особенностей клеток моноцитарно-макрофагального ряда

Для построения модели предсказания риска развития гематогенных метастазов у больных НМРЛ был применен метод дискриминантного анализа. При

построении модели были использованы данные о субпопуляционной структуре моноцитов, спонтанно индуцированных макрофагов, макрофагов с добавлением индукторов M2 поляризации, однонуклеотидных полиморфизмах, а также клиничко-морфологические параметры пациентов и особенности их лечения. Модель позволила статистически значимо разделить больных НМРЛ с наличием гематогенных метастазов и отсутствием признаков гематогенного метастазирования.

В модель вошли следующие показатели: размер опухолевого узла (Т); уровень экспрессии молекулы CD206 (MFI) на поверхности макрофагов; уровень экспрессии молекулы CD14 (MFI) на поверхности макрофагов; уровень экспрессии молекулы CD68 (MFI) на поверхности макрофагов, с добавлением ИЛ-4; наличие гетерозиготного генотипа AG гена *POLRIC*, наличие гомозиготного генотипа CC гена *MUC19*.

Классификационные дискриминантные функции имеют следующий вид:

$$Y1=16,064X1 - 0,009X2 + 0,015X3 + 0,007X4 + 47,735X5 - 46,780X6 - 53,448;$$

$$Y2= 8,834X1 - 0,003X2 + 0,007X3 + 0,004X4 + 25,738X5 - 21,525X6 - 19,600,$$

где Y1 – функция, характеризующая больных НМРЛ с развившимися впоследствии гематогенными метастазами; Y2 – функция, характеризующая больных НМРЛ с отсутствием гематогенных метастазов;

X1 – размер опухолевого узла (Т);

X2 – уровень экспрессии молекулы CD206 (MFI) на поверхности макрофагов;

X3 – уровень экспрессии молекулы CD14 (MFI) на поверхности макрофагов;

X4 – уровень экспрессии молекулы CD68 (MFI) на поверхности макрофагов с добавлением ИЛ-4;

X5 – наличие гетерозиготного генотипа AG гена *POLRIC*;

X6 – наличие гомозиготного генотипа CC гена *MUC19*.

Параметры модели $F(11,7) = 39,082$, λ Уилкса = 0,01602, $p < 0,00001$. Аналитическая чувствительность и специфичность предсказательной модели составила 100%.

Правило отнесения больных НМРЛ к высокому или низкому риску развития гематогенных метастазов:

1. Рассчитываются значения функций Y_1 и Y_2 с использованием значений вышеперечисленных показателей у исследуемого пациента;
2. Если значение функции $Y_1 > Y_2$, то пациента относят к группе с высоким риском развития гематогенных метастазов;
3. Если значение функции $Y_1 < Y_2$, то пациента относят к группе с низким риском развития гематогенных метастазов.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время активно исследуется вопрос о взаимосвязи предопухолевых изменений в респираторном эпителии мелких бронхов с риском прогрессирования НМРЛ.

Благодаря проведению полноэкзомного секвенирования мы смогли идентифицировать герминальные генетические варианты, связанные с состоянием респираторного эпителия. Нами были обнаружены полиморфные варианты генов, которые имели отличия по частоте встречаемости в группах сравнения между больными НМРЛ с наличием изолированной БКГ и больными, у которых отсутствовали изменения в респираторном эпителии. Однонуклеотидные полиморфизмы были обнаружены в следующих генах: *CNTN2* (rs17416074 G>A), *POLR1C* (rs2297336 A>G), *PTPRZ1* (rs74821923 G>C), *MUC19* (rs11176826 C>T), *DNJA4* (rs61752771 T>C) (см. рисунок 2). Представляется интересным тот факт, что частоты встречаемости гетерозиготных генотипов генов *CNTN2* (GA), *POLR1C* (AG), *PTPRZ1* (GC), *MUC19* (CT), *DNJA4* (TC), а также гомозиготного генотипа гена *MUC19* (TT) статистически значимо ниже у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии по сравнению с больными, у которых отсутствовали предопухолевые изменения. Частоты встречаемости аллелей генов *CNTN2* (аллель A), *POLR1C* (аллель G), *PTPRZ1* (аллель C), *MUC19* (аллель T), *DNJA4* (аллель C) также были статистически значимо ниже в группе больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии по сравнению с группой больных, у которых предопухолевые изменения отсутствовали.

По данным литературы, контактин-2 (*CNTN2*) относится к суперсемейству иммуноглобулинов (IgSF) – молекул клеточной адгезии, основной ролью которого является миелинизация аксонов, а также он участвует в глиальном онкогенезе [111, 198]. Информации о роли этого гена при злокачественных новообразованиях эпителия бронхов, его участии в воспалительных процессах и дифференцировке клеток моноцитарно-макрофагальной линии не найдено. Белок, кодируемый геном

POLR1, является субъединицей комплексов РНК-полимеразы I и РНК-полимеразы III. Мутация в данном гене вызывает синдром Тричера – Коллинза, редкой врожденной черепно-лицевой аномалии [232]. Ген *PTPRZ1* кодирует белок, являющийся членом семейства рецепторных протеинтирозинфосфатаз, и выступает в качестве рецептора на клеточной поверхности для молекулы плейотрофина (PTN), который способствует миграции и пролиферации глиобластомы [64]. Есть данные о том, что *PTPRZ1* высоко экспрессируется в клеточных линиях мелкоклеточного рака легкого и приводит к активации сигнального пути PTN/PTPRZ1, вызывая фосфорилирование тирозина кальмодулина [187]. Также была установлена связь данного гена с клетками моноцитарно-макрофагальной линии: в исследовании Ши и соавторов (2017) было показано, что опухолеассоциированные макрофаги способны вырабатывать плейотрофин, который способствует росту клеток глиобластомы через взаимодействие с рецептором PTPRZ1 и паракринную передачу сигналов PTN-PTPRZ1. Экспрессия PTN коррелировала с инфильтрацией CD11b + /CD163 + опухолеассоциированных макрофагов и неблагоприятным прогнозом у пациентов с глиобластомой [245].

Муцины представляют собой богато гликозилированные макромолекулы с высокой молекулярной массой, которые являются основными компонентами секретиции слизи [75] и играют ключевую роль в дыхательных путях человека. В легких человека имеется не менее 15 муцинов [37]. Среди муцинов дыхательных путей есть четыре гелеобразующих муцина: MUC2, MUC5AC, MUC5B и MUC19, описанные к настоящему времени [153]. Имеются сведения о том, что мутация гена *MUC19* у больных НМРЛ была связана с более длительной выживаемостью без прогрессирования заболевания и лучшим ответом на терапию ингибиторами контрольных точек PD-1, а также сопровождалась повышенной инфильтрацией опухолевого микроокружения CD8 + Т-клетками [13]. Эти данные согласуются с результатами нашего исследования. Мы установили, что у больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений как предиктором более низкого риска развития гематогенных метастазов частота встречаемости гетерозиготного

генотипа гена *MUC19* (СТ), гомозиготного генотипа гена *MUC19* (ТТ) и аллеля Т данного гена статистически значимо выше, чем у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии. Можно предположить, что существуют механизмы, с помощью которых однонуклеотидная замена в гене *MUC19* оказывает протективный эффект, препятствуя развитию гематогенных метастазов.

Белок DNAJA4 является членом семейства белков теплового шока DnaJ (Hsp40), играет решающую роль в эритропоэзе и регулируется посредством метилирования ДНК [68]. По данным базы Gene Ontology, DNAJA4 является негативным регулятором миграции эндотелиальных клеток, негативным регулятором сборки телец включения, регулятором рефолдинга белка. По литературным данным, в эксперименте *in vivo* на модели меланомы, метастазирующей в легкое, было показано, что DNAJA4 способствует экспрессии аполипопротеина Е (АроЕ). АроЕ, секретируемый клетками меланомы, подавляет инвазию и метастатическое эндотелиальное рекрутирование, задействуя рецепторы LRP1 и LRP8 клеток меланомы. Однако в клетках меланомы были идентифицированы miR-1908, miR-199a-5p и miR-199a-3p, которые выступают в качестве негативного регулятора DNAJA4 и тем самым снижают уровень экспрессии АроЕ, способствуют инвазии и метастатическому рекрутированию эндотелиальных клеток [49]. Сведений об участии DNAJA4 в метастазировании клеток НМРЛ нет. Но, возможно, при НМРЛ DNAJA4 может активировать те же механизмы, что и при меланоме, тем самым выполняя протективную функцию и препятствуя развитию метастазирования у больных НМРЛ с отсутствием респираторных изменений в слизистой бронхов. Данное заключение требует проведения дальнейших исследований о роли гена *DNAJA4* при НМРЛ.

Клетки моноцитарно-макрофагальной линии вносят огромный вклад в развитие злокачественных новообразований [26]. Попадая из кровотока в ткани, моноциты периферической крови способны дифференцироваться в макрофаги, дендритные клетки, миелоидные клетки-супрессоры и пополнять клеточный пул опухолевого микроокружения [150]. В ответ на сигналы микроокружения эти

клетки способны подвергаться фенотипической и функциональной поляризации [208].

В настоящем исследовании высказано предположение, что связь между реактивными изменениями в слизистой бронхов и прогрессированием НМРЛ может быть обусловлена функциональным статусом клеток моноцитарно-макрофагальной линии, являющихся важными участниками процессов воспаления, которое определяет как риск предопухолевых изменений в эпителии, так и прогрессию злокачественного новообразования.

На сегодняшний день в литературе имеется не так много информации о роли моноцитов и макрофагов в развитии предопухолевых поражений. Представлены сведения о роли макрофагов в развитии предопухолевых поражений молочной железы. Так, было показано, что макрофаги с высоким опухолеобразующим потенциалом рекрутируются в участки с наличием гиперплазии протоков молочной железы, где они дифференцируются в сторону фенотипа, способствующего развитию опухоли [138]. Данных о фенотипических особенностях клеток моноцитарно-макрофагальной линии при злокачественных новообразованиях значительно больше, но многие результаты работ противоречивы. Сами авторы объясняют это высокой гетерогенностью данной группы клеток, условиями микроокружения и другими факторами.

В выполненной работе было показано, что моноциты периферической крови в группах больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений в респираторном эпителии и больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в респираторном не имели фенотипических отличий (см. таблицу 7). По литературным данным, фенотипический профиль классических моноцитов у больных НМРЛ не имеет существенных различий в экспрессии маркеров M1 (HLA-DR), маркеров M2 (CD163 и CD36) и уровнях цитокинов Th1 и Th2 по сравнению с контрольной группой здоровых людей [19]. Сведений о сходстве или различиях фенотипического профиля моноцитов неклассической и промежуточной субпопуляции у больных НМРЛ найдено не было. Но при раке молочной железы

было показано, что повышается процент промежуточной CD14 ++ CD16 + популяции моноцитов, независимо от молекулярного подтипа [109].

Макрофаги, индуцированные из моноцитов *in vitro*, у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ не имели статистически значимых фенотипических отличий от индуцированных макрофагов больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений. Но на уровне статистической тенденции было показано, что наличие изолированной БКГ сопровождается снижением пула CD68+макрофагов и увеличением экспрессии CD163 на их поверхности (см. рисунок 3). Молекула CD68 является маркером дифференцированных макрофагов, а также экспрессируется моноцитами и дендритными клетками. По данным литературы, макрофаги, индуцированные из моноцитов *in vitro*, в большей степени экспрессируют CD68 на своей поверхности по сравнению с нестимулированными моноцитами [78]. Молекула CD163 является членом семейства рецепторов-мусорщиков и специфична для клеток моноцитарно-макрофагальной линии, а также является маркером M2-поляризации [32, 85]. Исходя из полученных результатов, мы можем заключить, что макрофаги больных НМРЛ с изолированной БКГ в большей степени проявляют признаки M2-поляризации. Это согласуется с известными на сегодняшний день сведениями о том, что предопухолевые морфологические изменения могут являться отражением особенностей иммунновоспалительных процессов в бронхах и соответствующих им взаимодействий между стромой и эпителием [44].

Способность индуцированных макрофагов к ответу на поляризующие стимулы является важным фактором в понимании вопроса о возможностях направленной дифференцировки моноцитов периферической крови у больных НМРЛ с различным состоянием респираторного эпителия и генетически детерминированными особенностями протекания воспалительных процессов.

Добавление индуктора M1-поляризации ЛПС к макрофагам больных НМРЛ с изолированной БКГ приводило к снижению 2,5 раза количества CD68+клеток, увеличению доли макрофагов, экспрессирующих CD163 и CD206 в 3,5 и 2,5 раза соответственно в сравнении с параметрами, выявленными у пациентов с

отсутствием предопухолевых изменений (см. рисунки 5, 6). Снижение CD68+ клеток может свидетельствовать об уменьшении количества моноцитов, вступивших в дифференцировку в зрелые макрофаги. Увеличение экспрессии маркеров M2-поляризации CD163 и CD206 в ответ на ЛПС является искажением ответа на поляризующий фактор и может косвенно свидетельствовать о том, что у пациентов с изолированной БКГ культивируемые макрофаги теряют способность к направленной дифференцировке и M1-поляризации. По данным литературы, увеличение экспрессии CD163 и CD206 наблюдается в ответ на добавление ИЛ-4 в условиях *in vitro* [134, 251].

При добавлении индуктора M2-поляризации ИЛ-4 наблюдалось снижение доли макрофагов, экспрессирующих молекулу CD68 в 4 раза (см. рисунок 5, А) и снижение флюоресценции CD14+ клеток на уровне статистической тенденции по сравнению с одноименными показателями у пациентов с отсутствием предопухолевых изменений. Молекула CD14 описана как антиген дифференцировки моноцитов/макрофагов и характеризуется как корецептор TLR4 для ответа на ЛПС [28]. Снижение уровня флюорисценции CD14 может косвенно свидетельствовать о потере способности исследуемых клеток к M1-поляризации, так как увеличение экспрессии данной молекулы наблюдается при индукции макрофагов под действием ЛПС и она имеет решающее значение для активации M1 макрофагов [113].

Экспрессия молекул на поверхности клеток тесно связана с их транскриптомным профилем. В литературе встречаются данные об исследовании транскриптомного профиля моноцитов и макрофагов при различных локализациях злокачественных новообразований, которые показывают высокую гетерогенность данного типа клеток [65, 100, 147]. На данный момент в научном сообществе не проводились исследования по изучению транскриптомного профиля макрофагов у больных НМРЛ в зависимости от состояния респираторного эпителия бронхов. В нашем исследовании мы провели полнотранскриптомное секвенирование макрофагов, индуцированных из моноцитов *in vitro*, от больных НМРЛ в зависимости от наличия или отсутствия изолированной БКГ. Транскриптомный

профиль индуцированных макрофагов больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ имел характерные отличия от профиля макрофагов больных с отсутствием респираторных изменений (см. рисунки 9 и 10).

При углубленном изучении отдельных генов было обнаружено, что в индуцированных макрофагах больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ ингибируются гены, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом (подопланин *PDPN*, металлоредуктаза *STEAP4*, богатый цистеином секреторный белок *CRISPLD2*), с увеличением пролиферации и метастазированием (хемокин *CCL18*, костный морфогенетический белок 2 *BMP2*, нейротрофический рецептор тирозинкиназы *NTRK2*, рецептор-мусорщик *CD163*, ген связанный с клеточным циклом *CDCA3*, ген связанный с клеточным циклом *CDCA2*, протеогликан серглицин *SRGN*) [9, 20, 27, 30, 33, 76, 173, 205], а также гены, связанные с ответом фагоцитарных клеток на патоген (рецептор формилпептида *FPR1*), с предотвращением агрегации секреторных белков (секретогранин *SCG5*), активацией процессов миогенеза (гликозидаза *MYORG*), с клеточным ответом на ЛПС (белок, взаимодействующий с *TNFAIP3* *TNIP3*), образованием активных форм кислорода (хионоредуктаза *NQO2*) (Рисунок 9) [46, 53, 54, 97, 131, 149, 157, 219].

В то же время гиперэкспрессированными оказались гены, связанные с метастазированием, эпителиально-мезенхимальным переходом (кислая фосфатаза *ACP5*, EGF-пободный домен *MEGF6*), пролиферацией клеток и ингибированием процессов апоптоза (плексин А3 *PLXNA3*, интегрин *ITGA6*) [128, 145, 216, 253]; гены, связанные с метаболизмом холестерина, процессингом и клиренсов амилоида (белок транспортер *ABCA7*), членами точек разрыва нейробластомы (*NBPF9* и *NBPF15*), с основной структурой единицы саркомера (миомезин *MYOM1*), функциональным компонентом цилиарных ворот (Fas-связывающий фрагмент *FBF1*) мембранным гликопротеином (галактозилтрансфераза *B3GALT2*), онкогеном *SNORD15B*, комплексом ядерных пор (*NPIP15*) (см. рисунок 9) [63, 123, 160, 182, 213].

При анализе сигнальных путей с использованием баз данных KEGG, Reactome и Hallmark было выявлено, что наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии у больных НМРЛ ассоциировано с угнетением в индуцированных макрофагах молекулярных путей, связанных с различными этапами клеточного цикла, цитокин-цитокиновыми взаимодействиями, процессингом и презентацией антигенов, воспалительными процессами, процессами ответа на ИНФg и ИНФа; процессами активации сигнальных путей IL2/STAT5, IL6/JAK/STAT3, mTORC1, Toll-подобных рецепторов, Т-клеточных рецепторов и активацией сигнальных путей, связанных с mTOR, активацией рецептора NMDA за счет притока ионов кальция и передачи сигналов RAS, передачей вкуса и обоняния, синтезом и метаболизмом фосфоинозитол фосфатов (см. рисунок 11).

Следует отметить, что в макрофагах, индуцированных из моноцитов больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ, была повышена экспрессия гена *ITGA6*. Интегрины представляют собой трансмембранные гетеродимерные рецепторы клеточной поверхности, состоящие из α - и β -субъединиц. У млекопитающих имеется 18 α -субъединиц и 8 β -субъединиц, которые на сегодняшний день образуют 24 гетеродимера $\alpha\beta$ -интегрина [101]. Важно отметить, что каждая пара гетеродимеров проявляет как функциональную, так и тканевую специфичность [220]. *ITGA6*, а также *ITG β 4* и *ITG β 1* в большом количестве присутствуют в экзосомах, тропных к легким [244]. Мы можем предположить, что макрофаги больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ способны за счет выработки экзосом и доставки интегринов облегчать процессы метастазирования. Но данное утверждение требует более углубленного изучения особенностей клеток моноцитарно-макрофагальной линии у больных НМРЛ с различным состоянием респираторного эпителия.

В ранее проведенных работах было показано, что для больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений отмечен низкий риск возникновения гематогенных метастазов, а наличие изолированной БКГ сопровождалось более частым развитием гематогенных метастазов [178]. Однако полученные нами

данные свидетельствуют о том, что в макрофагах, индуцированных из моноцитов периферической крови *in vitro* от больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений в слизистой бронхов, отмечена гиперэкспрессия генов, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом, метастазированием и пролиферацией клеток. Анализ исследуемых генов с использованием базы данных WikiPathway показал значимую активацию сигнального пути, связанного с ИЛ-18. ИЛ-18 является провоспалительным цитокином и продуцируется М1 макрофагами [14], способствует усилению фагоцитоза и цитотоксичности макрофагов в исследованиях *in vitro* [72]. Но, несмотря на это, есть данные, показывающие, что ИЛ-18 может действовать как синергист ИЛ-10 и усиливать продукцию остеопонтина и тромбина. В свою очередь, расщепленная форма тромбина через интегрины $\alpha 4/\alpha 9$ способствует М2-поляризации макрофагов и приводит к увеличению поверхностной экспрессии CD163 [120]. Эти сведения противоречивы, но исходя из полученных нами данных и анализе отдельных генов, мы можем заключить, что для макрофагов, индуцированных *in vitro* из моноцитов периферической крови больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений, так же, как и для пациентов с наличием изолированной БКГ, характерна активация механизмов, связанных с опухолевой прогрессией, однако эти механизмы различны.

Наряду с фенотипической пластичностью клеток моноцитарно-макрофагального ряда, вероятно, существует генетически детерминированный функциональный профиль моноцитов и макрофагов, определяющий возможную вариативность их свойств и поведение в конкретных условиях. Иными словами, макрофаги с различными конститутивными особенностями (SNP) должны иметь различный фенотипический профиль, что может критически повлиять на их роль в паренхиматозно-стромальных взаимоотношениях и привести к различному исходу заболевания. Для исследования того, как моноциты периферической крови изменяют свой фенотипический профиль при созревании в макрофаги, мы использовали модельный подход направленной дифференцировки клеток данного

пула в условиях *in vitro*, с последующим добавлением индукторов M1 и M2 поляризации ЛПС и ИЛ-4 соответственно.

Исходя из предположения о том, что функциональный профиль моноцитов и макрофагов может быть генетически детерминирован и определять возможную вариативность их свойств в отношении предопухолевых изменений респираторного эпителия бронхов, мы провели оценку фенотипических особенностей исследуемых клеток в зависимости от генотипа генов *CNTN2*, *POLR1C*, *PTPRZ1*, *MUC19*, *DNJA4* (см. рисунок 2).

Фенотипический профиль моноцитов больных НМРЛ оказался не связан с генотипом генов интереса в отличие от профиля индуцированных макрофагов. Наличие гетерозиготного генотипа AG гена *POLR1C* у больных НМРЛ ассоциировано с увеличением доли CD68+163+макрофагов на уровне статистической значимости и CD163+206-макрофагов на уровне статистической тенденции, с увеличением экспрессии молекулы CD16 и уменьшением экспрессии рецептора CD206 на поверхности макрофагов на уровне статистической тенденции по сравнению с больными, имеющими генотип AA гена *POLR1C* (см. рисунок 13). Поскольку молекулы CD163 и CD206 в настоящее время признаются маркерами M2-поляризации клеток моноцитарно-макрофагального ряда, то, следовательно, гетерозиготный генотип AG гена *POLR1C* ассоциирован с M2-поляризацией.

Наличие гетерозиготного генотипа AG гена *POLR1C* оказалось также связанным с ответом индуцированных макрофагов на стимулы поляризации. Интересно, что в ответ как на индуктор M1-поляризации ЛПС, так и на индуктор M2-поляризации ИЛ-4 макрофаги, полученные у пациентов с гетерозиготным генотипом AG гена *POLR1C*, ответили однотипным увеличением количества CD68+ макрофагов и уменьшением экспрессии молекулы CD206 – маркера M2-поляризации по сравнению с параметрами у больных НМРЛ, имеющих генотип AA (см. рисунки 14, 15). Эти данные могут свидетельствовать о снижении способности клеток моноцитарно-макрофагального ряда к M2-поляризации при наличии гетерозиготного генотипа AG гена *POLR1C*. Поскольку M2-поляризация опухолеассоциированных макрофагов в настоящее время рассматривается как

один из ведущих механизмов опухолевой прогрессии, то отмеченное снижение способности к М2-поляризации у носителей гетерозиготного генотипа АG гена *POLRIC*, вероятно, может обеспечить преимущество в безметастатической выживаемости [22].

Гетерозиготный генотип СТ гена *MUC19* у больных НМРЛ также оказался связан с особенностями ответа индуцированных макрофагов на стимулы поляризации. Так, у данной группы пациентов отмечено увеличение экспрессии рецептора CD68 на поверхности клеток при добавлении индуктора М2-поляризации ИЛ-4, а инкубация с индуктором М1-поляризации ЛПС характеризовалась уменьшением экспрессии молекулы CD14 по сравнению с макрофагами у больных НМРЛ с гомозиготным генотипом СС гена *MUC19* (см. рисунки 16, 17). В данном случае наличие гетерозиготного генотипа СТ гена *MUC19*, вероятно, является негативным фактором в аспекте прогноза безметастатического течения, поскольку снижение уровня экспрессии CD14 в ответ на ЛПС может указывать на нарушение ответа на бактериальные стимулы и дальнейшей индукции иммунного ответа, в том числе и противоопухолевого.

Анализ частоты развития гематогенных метастазов у больных НМРЛ в зависимости от наличия изолированной БКГ или отсутствия изменений в респираторном эпителии бронхов показал, что гематогенные метастазы встречается чаще у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ ($p < 0,02$, $\chi^2 = 5,44$). Кривые выживаемости у больных НМРЛ без прогрессирования в зависимости от наличия изолированной БКГ или отсутствия изменений в респираторном эпителии бронхов не были статистически значимо различимы ($p = 0,14909$). Однако на рисунке 21 видно, что имеются расхождения кривых выживаемости после 18 месяцев, что может свидетельствовать о тенденции к более частому гематогенному метастазированию у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов. Эти данные согласуются с результатами исследования, проведенного ранее [178].

Гематогенные метастазы у больных НМРЛ оказались связаны с наличием полиморфизма гена *MUC19*. Так, генотип СТ гена *MUC19* встречался реже у

пациентов с развившимися впоследствии гематогенными метастазами (см. таблицу 8). В действительности, наличие полиморфизма гена *MUC19* может оказывать протективный эффект, препятствуя развитию гематогенных метастазов у больных без предопухолевых изменений. Это согласуется с данными, что мутация гена *MUC19* связана с более благоприятным прогнозом течения НМРЛ [13].

Фенотипические особенности индуцированных из моноцитов *in vitro* макрофагов и их ответ на поляризующие стимулы были связаны с развитием гематогенного метастазирования. До начала лечения у больных НМРЛ с развившимися впоследствии гематогенными метастазами в сравнении с пациентами без прогрессирования заболевания отмечено увеличение доли CD68+163+ макрофагов, индуцированных без стимулов поляризации, а также увеличение доли CD68+макрофагов при сокультивировании клеток с M1-индуктором ЛПС на уровне статистической тенденции (см. рисунки 20 и 21). Данный факт говорит о большей способности моноцитов к дифференцировке в зрелые макрофаги как в спонтанных условиях, так и при воздействии M1-стимулов у больных НМРЛ с развившимися впоследствии гематогенными метастазами по сравнению с пациентами без прогрессирования. Интересно, что у M1-индуцированных макрофагов оказалась снижена экспрессия как рецептора к ЛПС CD14, так и M2-маркера CD206 (см. рисунок 21). Вероятно, несмотря на большую способность макрофагов к дифференцировке в зрелые формы, у клеток данной популяции, полученных от больных НМРЛ с развившимися впоследствии гематогенными метастазами, нарушены механизмы поляризации в M1-сторону по сравнению с клетками, полученными от пациентов без прогрессирования.

Интересно, что увеличение CD68+субпопуляции макрофагов при культивировании с ЛПС было ранее отмечено для носителей гетерозиготного генотипа AG гена *POLR1C* (см. рисунок 15), что, вероятно, указывает на значимость генетических механизмов в реализации клетками моноцитарно-макрофагального ряда своей функциональной активности, ассоциированной, в свою очередь, с клиническим течением и исходом НМРЛ.

Как было сказано выше, по литературным данным, наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии у больных НМРЛ является фактором риска

развития гематогенных метастазов [178]. Однако в нашем исследовании у пациентов с развившимися впоследствии гематогенными метастазами не было выявлено каких-либо значимых различий в фенотипических свойствах моноцитов и индуцированных из них *in vitro* макрофагов, в том числе при инкубации с индукторами M1- или M2-поляризации в зависимости от наличия или отсутствия изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов. При этом фенотипические особенности клеток моноцитарно-макрофагального ряда у больных НМРЛ с благоприятным течением заболевания (отсутствие признаков прогрессирования в течение периода наблюдения) оказались связаны с состоянием респираторного эпителия. Отмеченный ранее феномен увеличения дифференцированности индуцированных *in vitro* макрофагов, характерный для пациентов с метастазированием (увеличение доли CD68+субпопуляций макрофагов), выявлен и для пациентов с изолированной БКГ при благоприятном течении заболевания, но в несколько иной форме: у данной группы больных в сравнении с показателями у пациентов с отсутствием предопухолевых изменений, наоборот, отмечено уменьшение количества недифференцированных клеток, не имеющих моноцитарных маркеров субпопуляционной принадлежности (CD14 и CD16, см. рисунок 22). Таким образом, механизмы, направленные на дифференцировку макрофагов, связаны как с изолированной БКГ, так и с развитием гематогенных метастазов, но реализуются с вовлечением различных молекулярных путей.

Разделив пациентов с НМРЛ, имеющих изолированную БКГ в эпителии бронхов в зависимости от исхода заболевания, мы обнаружили, что развитие впоследствии гематогенных метастазов ассоциировано с более низким количеством CD68+моноцитов в циркуляции в сравнении с соответствующим показателем у больных с отсутствием прогрессирования (см. рисунок 23). Интересно, что ни один из исследованных нами факторов не был ассоциирован с подобным феноменом. Уменьшение в циркуляции пула моноцитов с признаками дифференцировки в макрофаги скорее говорит о повышенной скорости миграции данных клеток в ткань, вероятно, прежде всего, в опухоль, чем о нарушении механизмов дифференцировки, поскольку ранее мы отметили, что для

метастазирования характерно увеличение признаков дифференцировки клеток моноцитарно-макрофагального ряда.

Развитие гематогенных метастазов у больных НМРЛ с отсутствием предопухолевых изменений связано с меньшей экспрессией рецептора к ЛПС при добавлении в среду индуктора М1-поляризации – ЛПС (см. рисунок 24). Снижение уровня экспрессии CD14 при добавлении ЛПС отмечено также у пациентов с генотипом СТ гена *MUC19* (см. рисунок 17). Этот генотип чаще встречается при эпителии без изменений и, видимо, является фактором риска: нарушает ответ на ЛПС CD14+макрофагов и их способность к М1-поляризации, что способствует развитию гематогенных метастазов у данной клинической группы.

Таким образом, генотип больных НМРЛ связан с вариабельностью свойств клеток моноцитарно-макрофагального ряда, которые в свою очередь могут влиять как на развитие предопухолевых изменений, так и на метастазирование, что определяет прогностическую ценность наличия изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов для риска развития гематогенных метастазов (рисунок 25).



Рисунок 25 – Связь генетически детерминированных свойств клеток моноцитарно-макрофагального ряда с прогнозом НМРЛ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в проведенном исследовании было показано, что наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии у больных НМРЛ ассоциировано с особенностями генотипа. Транскриптомный профиль макрофагов, индуцированных из моноцитов, характеризовался отличиями в уровне экспрессируемых генов и в активации сигнальных путей в зависимости от состояния респираторного эпителия. Фенотипический профиль клеток моноцитарно-макрофагального ряда у больных НМРЛ ассоциирован как с состоянием респираторного эпителия бронхов (наличие изолированной БКГ или отсутствие предопухолевых изменений), так и с риском развития отдаленных гематогенных метастазов. Более того, фенотип макрофагов, индуцированных *in vitro* из моноцитов периферической крови, и их ответ на поляризующие стимулы были связаны с носительством генотипа AG гена *POLRIC* и генотипа CC гена *MUC19*. У больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии и гомозиготным генотипом CC гена *MUC19* значительно чаще возникали гематогенные метастазы.

ВЫВОДЫ

1. У больных НМРЛ с изолированной БКГ в респираторном эпителии бронхов реже встречаются гетерозиготные генотипы по следующим полиморфным вариантам rs17416074 G>A (*CNTN2*), rs2297336 A>G (*POLR1C*), rs74821923 G>C (*PTPRZI*), rs11176826 C>T (*MUC19*), rs61752771 T>C (*DNJA4*), а также гомозиготный генотип ТТ по полиморфному варианту rs11176826 C>T (*MUC19*) в сравнении с пациентами без предопухолевых изменений ($p<0,05$).

2. Фенотипические особенности моноцитов периферической крови и макрофагов, индуцированных из моноцитов *in vitro*, у больных НМРЛ с наличием изолированной БКГ в респираторном эпителии не имеют статистически значимых различий с соответствующими показателями у пациентов без предопухолевых изменений в бронхах.

3. Наличие изолированной БКГ в респираторном эпителии у больных НМРЛ связано с изменением ответа клеток моноцитарно-макрофагального ряда на стимулы M1- и M2-поляризации: отмечено снижение количества CD68+ популяций как при инкубации с M1-индуктором ЛПС, так и с M2-индуктором ИЛ-4 (в 4,20 раза и 2,47 раза соответственно, $p<0,05$) и увеличение экспрессии молекул CD163 и CD206 – маркеров M2-поляризации ($p<0,05$) при инкубации с M1-индуктором ЛПС в сравнении с соответствующими показателями у пациентов с отсутствием предопухолевых изменений в эпителии.

4. В индуцированных макрофагах у больных НМРЛ с изолированной БКГ в респираторном эпителии обнаружена гиперэкспрессия генов *ABCA7*, *PLXNA3*, *ACP5*, *NBPF9*, *NBPF15*, *MYOM1*, *FBF1*, *MEGF6*, *B3GALT2*, *SNORD15B*, *ITGA6*, *NPIP15* и гипоекспрессия генов *CCL18*, *ENPP2*, *PDPN*, *STEAP4*, *FPR1*, *BMP2*, *CRISPLD2*, *NTRK2*, *CD163*, *SCG5*, *MYORG*, *TNIP3*, *CDCA3*, *CDCA2*, *INTS13*, *NQO2*, *SRGN* в сравнении с соответствующими показателями у пациентов без предопухолевых изменений ($\log_2FC>0,58$ и $FDR<0,05$).

5. Для макрофагов, индуцированных из моноцитов периферической крови у пациентов с НМРЛ – носителей гетерозиготного генотипа AG гена *POLR1C*,

характерно увеличение количества CD68+популяций как в условиях спонтанного культивирования ($p<0,05$), так и при добавлении M1-индуктора поляризации ($p<0,05$); снижение уровня экспрессии M2-маркера CD206 на поверхности макрофагов при добавлении M1-индуктора (ЛПС) ($p<0,05$) в сравнении с соответствующими параметрами у носителей гомозиготного генотипа AA гена *POLR1C*. Гетерозиготный генотип СТ гена *MUC19* у больных НМРЛ ассоциирован со снижением ко-рецептора к ЛПС CD14 при добавлении M1-индуктора ЛПС ($p<0,05$) в сравнении с показателями у представителей гомозиготного генотипа СС гена *MUC19*.

6. Гематогенное метастазирование чаще развивалось у пациентов с наличием изолированной БКГ (44,7% против 14,3% в группе с эпителием без предопухолевых изменений, $p=0,02$) и гомозиготным генотипом СС гена *MUC19* (82,2% против 17,8% в группе с гетерозиготным генотипом СТ, $p=0,038$).

7. Генотипические особенности, размер опухолевого узла и показатели фенотипического профиля клеток моноцитарно-макрофагального ряда у пациентов с НМРЛ обладают прогностической ценностью для риска развития гематогенных метастазов. Параметры модели $F(6,12) = 10,892$, λ Уилкса = 0,15513, $p<0,0003$. Аналитическая чувствительность и специфичность предсказательной модели составила 100%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовано определение генотипа *CC* гена *MUC19* (rs11176826) у больных немелкоклеточным раком легкого для оценки риска развития гематогенных метастазов: генотип *CC* гена *MUC19* встречается чаще у пациентов с гематогенными метастазами.

2. Для прогнозирования развития гематогенных метастазов у больных НМРЛ рекомендовано применение математической модели, включающей в себя показатели фенотипического профиля клеток моноцитарно-макрофагального ряда, а также клинические и генотипические особенности пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов, В. С. Полиморфизм генов, экогенетические болезни и генетический паспорт / В. С. Баранов // Экологическая генетика. – 2011. – Т. 9, № 3. – С. 3–14.
2. Взаимосвязь неопластических изменений с базальноклеточной гиперплазией бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого / О. В. Панкова, В. М. Перельмутер, Н. В. Литвяков [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – № 5. – С. 57–60.
3. Моноциты при злокачественных новообразованиях: перспективы и точки приложения для диагностики и терапии / М. Р. Патышева, М. Н. Стахеева, И. В. Ларионова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 60–75.
4. Панкова, О. В. Взаимосвязь плоскоклеточной метаплазии с характером течения диспластического процесса в респираторном эпителии / О. В. Панкова, В. М. Перельмутер, О. В. Черемисина // Клиническая Лабораторная Диагностика. – 2008. – № 4. – С. 44–46.
5. A critical role for macrophages in promotion of urethane-induced lung carcinogenesis / R. Zaynagetdinov, T. P. Sherrill, V. V. Polosukhin [et al.] // J. Immunol. – 2011. – Vol. 187, N 11. – P. 5703–5711.
6. A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma / M. T. Landi, N. Chatterjee, K. Yu [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2009. – Vol. 85, N 5. – P. 679–691.
7. A guiding map for inflammation / M. G. Netea, F. Balkwill, M. Chonchol [et al.] // Nat. Immunol. – 2017. – Vol. 18, N 8. – P. 826–831.
8. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells / C. Schulz, E. Gomez Perdiguero, L. Chorro [et al.] // Science. – 2012. – Vol. 336, N 6077. – P. 86–90.
9. A tropomyosin receptor kinase family protein, NTRK2 is a potential predictive biomarker for lung adenocarcinoma / X. Wang, Z. Xu, X. Chen [et al.] // PeerJ. – 2019. – Vol. 7. – P. e7125.

10. Alencar, V. T. L. de. Inherited lung cancer: a review / V. T. L. de Alencar, M. N. Formiga, V. C. C. de Lima // *Ecancermedicalsecience*. – 2020. – Vol. 14. – P. 1008.
11. Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0 / G. H. Putri, S. Anders, P. T. Pyl [et al.] // *Bioinformatics*. – 2022. – Vol. 38, N 10. – P. 2943–2945.
12. Association of CD44 Gene Polymorphism with Survival of NSCLC and Risk of Bone Metastasis / Y. Liu, H. Qing, X. Su [et al.] // *Me. Sci Monit*. – 2015. – Vol. 21. – P. 2694–2700.
13. Association of MUC19 Mutation With Clinical Benefits of Anti-PD-1 Inhibitors in Non-small Cell Lung Cancer / L. Zhou, L. Huang, Q. Xu [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 596542.
14. Atri, C. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases / C. Atri, F. Z. Guerfali, D. Laouini // *Int. J. Mol. Sci*. – 2018. – Vol. 19, N 6. – P. 1801.
15. BALT development and augmentation of hyperoxic lung injury in mice deficient in NQO1 and NQO2 / A. Das, L. Kole, L. Wang [et al.] // *Free Radic. Biol. Med*. – 2006. – Vol. 40, N 10. – P. 1843–1856.
16. Banerjee, A. K. Preinvasive lesions of the bronchus / A. K. Banerjee // *J. Thorac. Oncol*. – 2009. – Vol. 4, N 4. – P. 545–551.
17. BBB-penetrating codelivery liposomes treat brain metastasis of non-small cell lung cancer with EGFR(T790M) mutation / W. Yin, Y. Zhao, X. Kang [et al.] // *Theranostics*. – 2020. – Vol. 10, N 14. – P. 6122–6135.
18. Biological interaction of cigarette smoking on the association between genetic polymorphisms involved in inflammation and the risk of lung cancer: A case-control study in Japan / Y. Yamamoto, C. Kiyohara, S. Suetsugu-Ogata [et al.] // *Oncol. Lett*. – 2017. – Vol. 13, N 5. – P. 3873–3881.
19. Blood classical monocytes phenotype is not altered in primary non-small cell lung cancer / S. A. Almatroodi, C. F. McDonald, A. L. Collins [et al.] // *World Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 5, N 5. – P. 1078–1087.
20. BMP-2 induces human mononuclear cell chemotaxis and adhesion and modulates monocyte-to-macrophage differentiation / E. Pardali, L.-M. Makowski,

M. Leffers [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2018. – Vol. 22, N 11. – P. 5429–5438.

21. Bories, G. F. P. Macrophage metabolism in atherosclerosis / G. F. P. Bories, N. Leitinger // *FEBS Lett.* – 2017. – Vol. 591, N 19. – P. 3042–3060.

22. Boutilier, A. J. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment / A. J. Boutilier, S. F. Elswa // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, N 13. – P. 6995.

23. Butcher, M. J. Phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta / M. J. Butcher, E. V. Galkina // *Front. Physiol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 44.

24. c-Abl-Mediated Tyrosine Phosphorylation of PARP1 Is Crucial for Expression of Proinflammatory Genes / A. A. Bohio, A. Sattout, R. Wang [et al.] // *J. Immunol.* – 2019. – Vol. 203, N 6. – P. 1521–1531.

25. Canton, J. Scavenger receptors in homeostasis and immunity / J. Canton, D. Neculai, S. Grinstein // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13, N 9. – P. 621–634.

26. Cassetta, L. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer / L. Cassetta, J. W. Pollard // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2018. – Vol. 17, N 12. – P. 887–904.

27. CC-chemokine ligand 18 induces epithelial to mesenchymal transition in lung cancer A549 cells and elevates the invasive potential / T. Ploenes, B. Scholtes, A. Krohn [et al.] // *PloS One*. – 2013. – Vol. 8, N 1. – P. e53068.

28. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition / T. A. da Silva, A. L. V. Zorzetto-Fernandes, N. T. Cecílio [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 7083.

29. CD47 polymorphism for predicting nivolumab benefit in patients with advanced non-small-cell lung cancer / T. Ogimoto, H. Ozasa, H. Yoshida [et al.] // *Oncology Letters*. – 2023. – Vol. 26, N 2. – P. 364.

30. CD163 and CCR7 as markers for macrophage polarization in lung cancer microenvironment / I. Kwiecień, M. Polubiec-Kownacka, D. Dziedzic [et al.] // *Central-European Journal of Immunology*. – 2019. – Vol. 44, N 4. – P. 395–402.

31. CD163 as a novel target gene of STAT3 is a potential therapeutic target for gastric cancer / Z. Cheng, D. Zhang, B. Gong [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, N 50. – P. 87244–87262.

32. CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical hodgkin lymphoma / J. A. Harris, S. Jain, Q. Ren [et al.] // *Diagnostic Pathology*. – 2012. – Vol. 7, N 1. – P. 12.

33. CDCA2 promotes lung adenocarcinoma cell proliferation and predicts poor survival in lung adenocarcinoma patients / R. Shi, C. Zhang, Y. Wu [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, N 12. – P. 19768–19779.

34. Change in treatment modality and trends in survival among stage I non-small cell lung cancer patients: a population-based study / G.-G. Akhtar-Danesh, C. Finley, H. Y. Seow [et al.] // *Journal of Thoracic Disease*. – 2020. – Vol. 12, N 9. – P. 4670–4679.

35. Changes in the bronchial epithelium in relation to smoking and cancer of the lung; a report of progress / O. Auerbach, J. B. Forman, J. B. Gere [et al.] // *N. Engl. J. Med*. – 1957. – Vol. 256, N 3. – P. 97–104.

36. Chapman, A. D. The association between atypical adenomatous hyperplasia and primary lung cancer / A. D. Chapman, K. M. Kerr // *Br. J. Cancer*. – 2000. – Vol. 83, N 5. – P. 632–636.

37. Chapter Four – Cellular and Molecular Biology of Airway Mucins / E. P. Lillehoj, K. Kato, W. Lu, K. C. Kim. – Text : electronic // *International Review of Cell and Molecular Biology* / ed. K. W. Jeon. – Academic Press, 2013. – Vol. 303. – P. 139–202. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124076976000040> (date accessed: 22.01.2023).

38. Characterization of M1/M2 Tumour-Associated Macrophages (TAMs) and Th1/Th2 Cytokine Profiles in Patients with NSCLC / S. A. Almatroodi, C. F. McDonald, I. A. Darby, D. S. Pouniotis // *Cancer Microenviron*. – 2016. – Vol. 9, N 1. – P. 1–11.

39. Characterizing Intercellular Communication of Pan-Cancer Reveals SPP1+ Tumor-Associated Macrophage Expanded in Hypoxia and Promoting Cancer

Malignancy Through Single-Cell RNA-Seq Data / J. Wei, Z. Chen, M. Hu [et al.] // *Front. Cell. Dev. Biol.* – 2021. – Vol. 9. – P. 749210.

40. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells / B. Molon, S. Ugel, F. Del Pozzo [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2011. – Vol. 208, N 10. – P. 1949–1962.

41. Chemokine receptor CXCR4 expression and lung cancer prognosis: a meta-analysis / J. X. Liang, W. Gao, Y. Liang, X. M. Zhou // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 8, N 4. – P. 5163–5174.

42. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice / Y. Sawanobori, S. Ueha, M. Kurachi [et al.] // *Blood.* – 2008. – Vol. 111, N 12. – P. 5457–5466.

43. Chemotherapy elicits pro-metastatic extracellular vesicles in breast cancer models / I. Keklikoglou, C. Cianciaruso, E. Güç [et al.] // *Nat. Cell. Biol.* – 2019. – Vol. 21, N 2. – P. 190–202.

44. Chronic bronchitis sub-phenotype within COPD: inflammation in sputum and biopsies / J. B. Snoeck-Stroband, T. S. Lapperre, M. M. E. Gosman [et al.] // *The European Respiratory Journal.* – 2008. – Vol. 31, N 1. – P. 70–77.

45. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors / D. L. Adams, S. S. Martin, R. K. Alpaugh [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 2014. – Vol. 111, N 9. – P. 3514–3519.

46. Clinical and functional significance of STEAP4-splice variant in CD14⁺ monocytes in patients with rheumatoid arthritis / H. Ebe, I. Matsumoto, H. Kawaguchi [et al.] // *Clinical & Experimental Immunology.* – 2018. – Vol. 191, N 3. – P. 338–348.

47. Clinical significance of NQO1 C609T polymorphisms after postoperative radiation therapy in completely resected non-small cell lung cancer / S. Y. Song, S. Y. Jeong, H. J. Park [et al.] // *Lung Cancer.* – 2010. – Vol. 68, N 2. – P. 278–282.

48. Colin, S. Macrophage phenotypes in atherosclerosis / S. Colin, G. Chinetti-Gbaguidi, B. Staels // *Immunol. Rev.* – 2014. – Vol. 262, N 1. – P. 153–166.

49. Convergent multi-miRNA Targeting of ApoE Drives LRP1/LRP8-Dependent Melanoma Metastasis and Angiogenesis / N. Pencheva, H. Tran, C. Buss [et al.] // *Cell.* – 2012. – Vol. 151, N 5. – P. 1068–1082.

50. Correlation between CXCR4/CXCR7/CXCL12 chemokine axis expression and prognosis in lymph-node-positive lung cancer patients / M. Katsura, F. Shoji, T. Okamoto [et al.] // *Cancer Sci.* – 2018. – Vol. 109, N 1. – P. 154–165.
51. Correlation between resistin gene polymorphism and clinical aspects of lung cancer / W. W. Hu, C. H. Tang, Y. Sun [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2017. – Vol. 96, N 52. – P. e9485.
52. CPSF3 is a promising prognostic biomarker and predicts recurrence of non-small cell lung cancer / Y. Ning, W. Liu, X. Guan [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2019. – Vol. 18, N 3. – P. 2835–2844.
53. CRISPLD2 (LGL1) inhibits proinflammatory mediators in human fetal, adult, and COPD lung fibroblasts and epithelial cells / H. Zhang, A. T. Kho, Q. Wu [et al.] // *Physiological Reports.* – 2016. – Vol. 4, N 17. – P. e12942.
54. Curcumol Overcomes TRAIL Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting NRH: Quinone Oxidoreductase 2 (NQO2) / J. Zhang, Y. Zhou, N. Li [et al.] // *Advanced Science.* – 2020. – Vol. 7, N 22. – P. 2002306.
55. Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer / C. Müller-Tidow, R. Metzger, K. Kügler [et al.] // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61, N 2. – P. 647–653.
56. Dacic, S. Pulmonary preneoplasia / S. Dacic // *Arch Pathol Lab Med.* – 2008. – Vol. 132, N 7. – P. 1073–1078.
57. De Paoli, F. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis / F. De Paoli, B. Staels, G. Chinetti-Gbaguidi // *Circ. J.* – 2014. – Vol. 78, N 8. – P. 1775–1781.
58. Deciphering the impact of common genetic variation on lung cancer risk: a genome-wide association study / P. Broderick, Y. Wang, J. Vijayakrishnan [et al.] // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, N 16. – P. 6633–6641.
59. Demichelis, F. Genetic predisposition to prostate cancer: Update and future perspectives / F. Demichelis, J. L. Stanford // *Urol. Oncol.* – 2015. – Vol. 33, N 2. – P. 75–84.

60. Dendritic cell vaccination in combination with docetaxel for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: A randomized phase II study / P. Kongsted, T. H. Borch, E. Ellebaek [et al.] // *Cytotherapy*. – 2017. – Vol. 19, N 4. – P. 500–513.
61. DHRS9 Is a Stable Marker of Human Regulatory Macrophages / P. Riquelme, G. Amodio, C. Macedo [et al.] // *Transplantation*. – 2017. – Vol. 101, N 11. – P. 2731–2738.
62. Diaz-Montero, C. M. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: therapeutic, predictive, and prognostic implications / C. M. Diaz-Montero, J. Finke, A. J. Montero // *Semin. Oncol.* – 2014. – Vol. 41, N 2. – P. 174–184.
63. Dib, S. Role of ABCA7 in Human Health and in Alzheimer's Disease / S. Dib, J. Pahnke, F. Gosselet // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, N 9. – P. 4603.
64. Differential Induction of Glioblastoma Migration and Growth by Two Forms of Pleiotrophin* / K. V. Lu, K. A. Jong, G. Y. Kim [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, N 29. – P. 26953–26964.
65. Dissecting the single-cell transcriptome network of macrophage and identifies a signature to predict prognosis in lung adenocarcinoma / Z. Hu, X. Jin, W. Hong [et al.] // *Cellular Oncology (Dordrecht)*. – 2023. – 20 Apr. – P. 1–18.
66. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer / J. Jackute, M. Zemaitis, D. Pranys [et al.] // *BMC Immunol.* – 2018. – Vol. 19, N 1. – P. 3.
67. Diverse Functions of Macrophages in Different Tumor Microenvironments / M. Yang, D. McKay, J. W. Pollard, C. E. Lewis // *Cancer Res.* – 2018. – Vol. 78, N 19. – P. 5492–5503.
68. DNA methylation status of DNAJA4 is essential for human erythropoiesis / H. Zhang, F. Xue, H. Zhao [et al.] // *Epigenomics*. – 2022. – Vol. 14, N 20. – P. 1249–1267.
69. Duma, N. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment / N. Duma, R. Santana-Davila, J. R. Molina // *Mayo Clin. Proc.* – 2019. – Vol. 94, N 8. – P. 1623–1640.

70. Effects of PARP-1 deficiency on airway inflammatory cell recruitment in response to LPS or TNF: differential effects on CXCR2 ligands and Duffy Antigen Receptor for Chemokines / M. Zerfaoui, A. S. Naura, Y. Errami [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2009. – Vol. 86, N 6. – P. 1385–1392.

71. Emodin Inhibits Breast Cancer Growth by Blocking the Tumor-Promoting Feedforward Loop between Cancer Cells and Macrophages / S. Iwanowycz, J. Wang, J. Hodge [et al.] // *Mol. Cancer. Ther.* – 2016. – Vol. 15, N 8. – P. 1931–1942.

72. Enhancement of phagocytosis and cytotoxicity in macrophages by tumor-derived IL-18 stimulation / X. Henan, N. Toyota, X. Yanjiang [et al.] // *BMB reports.* – 2014. – Vol. 47, N 5. – P. 286–291.

73. Epelman, S. Origin and functions of tissue macrophages / S. Epelman, K. J. Lavine, G. J. Randolph // *Immunity.* – 2014. – Vol. 41, N 1. – P. 21–35.

74. Espinoza, L. A. Prolonged poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity regulates JP-8-induced sustained cytokine expression in alveolar macrophages / L. A. Espinoza, M. E. Smulson, Z. Chen // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 42, N 9. – P. 1430–1440.

75. Evans, C. M. Airway mucus: the good, the bad, the sticky / C. M. Evans, J. S. Koo // *Pharmacology & Therapeutics.* – 2009. – Vol. 121, N 3. – P. 332–348.

76. Expression of CDCA3 Is a Prognostic Biomarker and Potential Therapeutic Target in Non-Small Cell Lung Cancer / M. N. Adams, J. T. Burgess, Y. He [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer.* – 2017. – Vol. 12, N 7. – P. 1071–1084.

77. Expression of M2-polarized macrophages is associated with poor prognosis for advanced epithelial ovarian cancer / C. Lan, X. Huang, S. Lin [et al.] // *Technol. Cancer. Res. Treat.* – 2013. – Vol. 12, N 3. – P. 259–267.

78. Expression of O-glycosylated oncofetal fibronectin in alternatively activated human macrophages / M. A. R. da Costa Santos, J. S. dos Reis, C. A. do Nascimento Santos [et al.] // *Immunologic Research.* – 2023. – Vol. 71, N 1. – P. 92–104.

79. Expression of xenobiotic-metabolizing CYPs in human pulmonary tissue / H. Raunio, J. Hakkola, J. Hukkanen [et al.] // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 1999. – Vol. 51, N 4-5. – P. 412–417.

80. EZH1 Is Associated with TCP-Induced Bone Regeneration through Macrophage Polarization / X. Jia, H. Xu, R. J. Miron [et al.] // *Stem Cells Int.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 6310560.

81. Factor XIIIa-expressing inflammatory monocytes promote lung squamous cancer through fibrin cross-linking / A. Porrello, P. L. Leslie, E. B. Harrison [et al.] // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 1988.

82. Follow-up of bronchial precancerous lesions and carcinoma in situ using fluorescence endoscopy / S. Bota, J. Auliac, C. Paris [et al.] // *American journal of respiratory and critical care medicine.* – 2001. – Vol. 164, N 9. – P. 1688–1693.

83. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages / Q. Wang, H. Ni, L. Lan [et al.] // *Cell. Res.* – 2010. – Vol. 20, N 6. – P. 701–712.

84. Gabrilovich, D. I. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours / D. I. Gabrilovich, S. Ostrand-Rosenberg, V. Bronte // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12, N 4. – P. 253–268.

85. Gefitinib inhibits M2-like polarization of tumor-associated macrophages in Lewis lung cancer by targeting the STAT6 signaling pathway / M. Tariq, J. Zhang, G. Liang [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica.* – 2017. – Vol. 38, N 11. – P. 1501–1511.

86. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells can distinguish patients with non-small cell lung cancer from patients with nonmalignant lung disease / M. K. Showe, A. Vachani, A. V. Kossenkova [et al.] // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, N 24. – P. 9202–9210.

87. Genetic predisposition to lung cancer: comprehensive literature integration, meta-analysis, and multiple evidence assessment of candidate-gene association studies / J. Wang, Q. Liu, S. Yuan [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 8371.

88. Genetic variations in epigenetic genes are predictors of recurrence in stage I or II non-small cell lung cancer patients / K. W. Wagner, Y. Ye, J. Lin [et al.] // *Clin. Cancer. Res.* – 2012. – Vol. 18, N 2. – P. 585–592.

89. Gleissner, C. A. Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis / C. A. Gleissner // *Front. Physiol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1.

90. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram [et al.] // *CA Cancer. J. Clin.* – 2018. – Vol. 68, N 6. – P. 394–424.
91. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // *CA Cancer. J. Clin.* – 2021. – Vol. 71, N 3. – P. 209–249.
92. Great potential of a panel of multiple hMTH1, SPD, ITGA11 and COL11A1 markers for diagnosis of patients with non-small cell lung cancer / I. W. Chong, M. Y. Chang, H. C. Chang [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2006. – Vol. 16, N 5. – P. 981–988.
93. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol. 144, N 5. – P. 646–674.
94. Hartley, S. W. QoRTs: a comprehensive toolset for quality control and data processing of RNA-Seq experiments / S. W. Hartley, J. C. Mullikin // *BMC bioinformatics.* – 2015. – Vol. 16, N 1. – P. 224.
95. Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer / S. Iwakiri, N. Mino, T. Takahashi [et al.] // *Cancer.* – 2009. – Vol. 115, N 11. – P. 2580–2593.
96. Hoeksema, M. A. Molecular pathways regulating macrophage polarization: implications for atherosclerosis / M. A. Hoeksema, J. L. Stöger, M. P. de Winther // *Curr. Atheroscler. Rep.* – 2012. – Vol. 14, N 3. – P. 254–263.
97. Huang, K.-W. Elevated TNIP3 mRNA Expression in TNF- α -Secreting Cells from Patients with Major Depressive Disorder / K.-W. Huang, M.-K. Wu, Y.-Y. Hung // *Neuroimmunomodulation.* – 2019. – Vol. 26, N 3. – P. 153–158.
98. Human resistin promotes neutrophil proinflammatory activation and neutrophil extracellular trap formation and increases severity of acute lung injury / S. Jiang, D. W. Park, J. M. Tadie [et al.] // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192, N 10. – P. 4795–4803.
99. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway / N. Silswal, A. K. Singh, B. Aruna [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 334, N 4. – P. 1092–1101.

100. Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets / L. Cassetta, S. Fragkogianni, A. H. Sims [et al.] // *Cancer Cell*. – 2019. – Vol. 35, N 4. – P. 588–602.e10.

101. Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines / R. O. Hynes // *Cell*. – 2002. – Vol. 110, N 6. – P. 673–687.

102. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2 / A. Kadl, A. K. Meher, P. R. Sharma [et al.] // *Circ. Res.* – 2010. – Vol. 107, N 6. – P. 737–746.

103. Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated / M. Torroella-Kouri, R. Silvera, D. Rodriguez [et al.] // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, N 11. – P. 4800–4809.

104. Identification of metastasis-associated receptor tyrosine kinases in non-small cell lung cancer / C. Müller-Tidow, S. Diederichs, E. Bulk [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, N 5. – P. 1778–1782.

105. IFN- γ -induced iNOS expression in mouse regulatory macrophages prolongs allograft survival in fully immunocompetent recipients / P. Riquelme, S. Tomiuk, A. Kammler [et al.] // *Mol. Ther.* – 2013. – Vol. 21, N 2. – P. 409–422.

106. IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration / N. Makita, Y. Hizukuri, K. Yamashiro [et al.] // *Int. Immunol.* – 2015. – Vol. 27, N 3. – P. 131–141.

107. IL-17-differentiated macrophages secrete pro-inflammatory cytokines in response to oxidized low-density lipoprotein / M. de la Paz Sánchez-Martínez, F. Blanco-Favela, M. D. Mora-Ruiz [et al.] // *Lipids in Health and Disease*. – 2017. – Vol. 16, N 1. – P. 196.

108. Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance / E. S. Nakasone, H. A. Askautrud, T. Kees [et al.] // *Cancer Cell*. – 2012. – Vol. 21, N 4. – P. 488–503.

109. 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 / G. A. Foulds, J. Vadakekolathu, T. M. A. Abdel-Fatah [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2028.

110. Immunosuppressive CD14+HLA-DR^{low}/- monocytes in prostate cancer / S. Vuk-Pavlović, P. A. Bulur, Y. Lin [et al.] // *Prostate*. – 2010. – Vol. 70, N 4. – P. 443–455.

111. Implication of Contactins in Demyelinating Pathologies / I. Kalafatakis, M. Savvaki, T. Velona, D. Karagogeos // *Life*. – 2021. – Vol. 11, N 1. – P. 51.

112. Increased resistin suggests poor prognosis and promotes development of lung adenocarcinoma / C. C. Zhao, J. Chen, R. F. Niu [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2018. – Vol. 40, N 6. – P. 3392–3404.

113. Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach / F. Zamani, F. Zare Shahneh, L. Aghebati-Maleki, B. Baradaran // *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. – 2013. – Vol. 3, N 2. – P. 329–332.

114. Infiltration of diametrically polarized macrophages predicts overall survival of patients with gastric cancer after surgical resection / H. Zhang, X. Wang, Z. Shen [et al.] // *Gastric Cancer*. – 2015. – Vol. 18, N 4. – P. 740–750.

115. Inflammatory cytokines suppress NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 and induce oxidative stress in cholangiocarcinoma cells / A. Prawan, B. Buranrat, U. Kukongviriyapan [et al.] // *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 135, N 4. – P. 515–522.

116. Inflammatory Gene Polymorphisms in Lung Cancer Susceptibility / K. D. Eaton, P. E. Romine, G. E. Goodman [et al.] // *J. Thorac. Oncol.* – 2018. – Vol. 13, N 5. – P. 649–659.

117. Inflammatory phenotype of classical (CD14⁺⁺CD16⁻) monocytes in patients with advanced non-small cell lung cancer / F. M. McCarthy, C. Ghirelli, R. Zollinger [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2013. – Vol. 31, N 15_{suppl}. – P. 11071–11071.

118. Inherited variation at chromosome 12p13.33, including RAD52, influences the risk of squamous cell lung carcinoma / J. Shi, N. Chatterjee, M. Rotunno [et al.] // *Cancer Discov.* – 2012. – Vol. 2, N 2. – P. 131–139.

119. Interactions between neutrophils and non-small cell lung cancer cells: enhancement of tumor proliferation and inflammatory mediator synthesis / K. Hattar, K. Franz, M. Ludwig [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2014. – Vol. 63, N 12. – P. 1297–1306.
120. Interleukin-18 Amplifies Macrophage Polarization and Morphological Alteration, Leading to Excessive Angiogenesis / T. Kober, S. Hamasaki, A. Kitaura [et al.] // *Frontiers in Immunology.* – 2018. – Vol. 9. – P. 334.
121. Iron gene expression profile in atherogenic Mox macrophages / L. Marques, A. Negre-Salvayre, L. Costa, F. Canonne-Hergaux // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2016. – Vol. 1862, N 6. – P. 1137–1146.
122. Kerr, K. M. The Classification of Pre-invasive Lesions / K. M. Kerr // *Molecular Pathology of Lung Cancer* / eds. P. T. Cagle [et al.]. – New York, NY : Springer New York, 2012. – P. 35–52.
123. Knockout of MYOM1 in human cardiomyocytes leads to myocardial atrophy via impairing calcium homeostasis / C. Hang, Y. Song, Y. Li [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* – 2021. – Vol. 25, N 3. – P. 1661–1676.
124. Kratz, J. R. Prognostic and Predictive Biomarker Signatures / J. R. Kratz, D. M. Jablons // *Lung Cancer.* – 2014. – P. 564–571.
125. Leek, J. T. Svaseq: removing batch effects and other unwanted noise from sequencing data / J. T. Leek // *Nucleic Acids Research.* – 2014. – Vol. 42, N 21. – P. e161.
126. Locati, M. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity / M. Locati, G. Curtale, A. Mantovani // *Annu Rev. Pathol.* – 2020. – Vol. 15. – P. 123–147.
127. Love, M. I. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 / M. I. Love, W. Huber, S. Anders // *Genome Biology.* – 2014. – Vol. 15, N 12. – P. 550.
128. M2-like macrophage-derived exosomes facilitate metastasis in non-small-cell lung cancer by delivering integrin $\alpha V\beta 3$ / L. Huang, F. Wang, X. Wang [et al.] // *MedComm.* – 2023. – Vol. 4, N 1. – P. e191.

129. M3 Macrophages Stop Division of Tumor Cells In Vitro and Extend Survival of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma / S. Kalish, S. Lyamina, E. Manukhina [et al.] // *Med. Sci. Monit. Basic. Res.* – 2017. – Vol. 23. – P. 8–19.
130. MACC1 overexpression predicts a poor prognosis for non-small cell lung cancer / Z. Wang, Z. Li, C. Wu [et al.] // *Med. Oncol.* – 2014. – Vol. 31, N 1. – P. 790.
131. Machine learning-featured Secretogranin V is a circulating diagnostic biomarker for pancreatic adenocarcinomas associated with adipopenia / Y. Jo, M.-K. Yeo, T. Dao [et al.] // *Frontiers in Oncology.* – 2022. – Vol. 12. – P. 942774.
132. Macrophage M1/M2 polarization / C. Yunna, H. Mengru, W. Lei, C. Weidong // *Eur. J. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 877. – P. 173090.
133. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease / A. Shapouri-Moghaddam, S. Mohammadian, H. Vazini [et al.] // *J Cell Physiol.* – 2018. – Vol. 233, N 9. – P. 6425–6440.
134. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages / M. Orecchioni, Y. Ghosheh, A. B. Pramod, K. Ley // *Frontiers in Immunology.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1084.
135. Macrophage-derived human resistin is induced in multiple helminth infections and promotes inflammatory monocytes and increased parasite burden / J. C. Jang, G. Chen, S. H. Wang [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2015. – Vol. 11, N 1. – P. e1004579.
136. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications / R. Ostuni, F. Kratochvill, P. J. Murray, G. Natoli // *Trends. Immunol.* – 2015. – Vol. 36, N 4. – P. 229–239.
137. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors / N.-B. Hao, M.-H. Lü, Y.-H. Fan [et al.] // *Clinical & Developmental Immunology.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 948098.
138. Macrophages promote the progression of premalignant mammary lesions to invasive cancer / E. C. Carron, S. Homra, J. Rosenberg [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, N 31. – P. 50731–50746.

139. Macrophage-targeted therapy: CD64-based immunotoxins for treatment of chronic inflammatory diseases / D. Hristodorov, R. Mladenov, M. Huhn [et al.] // *Toxins* (Basel). – 2012. – Vol. 4, N 9. – P. 676–694.
140. Maeng, H. Cancer vaccines: translation from mice to human clinical trials / H. Maeng, M. Terabe, J. A. Berzofsky // *Curr Opin Immunol.* – 2018. – Vol. 51. – P. 111–122.
141. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer / P. Ji, S. Diederichs, W. Wang [et al.] // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22, N 39. – P. 8031–8041.
142. Malyshev, I. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage “Switch” Phenotype / I. Malyshev, Y. Malyshev // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 341308.
143. Mechanisms driving macrophage diversity and specialization in distinct tumor microenvironments and parallelisms with other tissues / E. Van Overmeire, D. Laoui, J. Keirsse [et al.] // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 127.
144. Medbury, H. J. Clinical significance of macrophage phenotypes in cardiovascular disease / H. J. Medbury, H. Williams, J. P. Fletcher // *Clin. Transl. Med.* – 2014. – Vol. 3, N 1. – P. 63.
145. MEGF6 Promotes the Epithelial-to-Mesenchymal Transition via the TGFβ/SMAD Signaling Pathway in Colorectal Cancer Metastasis / H. Hu, M. Wang, H. Wang [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology.* – 2018. – Vol. 46, N 5. – P. 1895–1906.
146. miR-142-5p and miR-130a-3p are regulated by IL-4 and IL-13 and control profibrogenic macrophage program / S. Su, Q. Zhao, C. He [et al.] // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol. 6. – P. 8523.
147. Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature / I. Bièche, F. Lerebours, S. Tozlu [et al.] // *Clin. Cancer. Res.* – 2004. – Vol. 10, N 20. – P. 6789–6795.

148. Molecular subtyping reveals immune alterations associated with progression of bronchial premalignant lesions / J. E. Beane, S. A. Mazzilli, J. D. Campbell [et al.] // Nat. Commun. – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 1856.

149. Monocyte Activation by Necrotic Cells Is Promoted by Mitochondrial Proteins and Formyl Peptide Receptors / E. D. Crouser, G. Shao, M. W. Julian [et al.] // Critical care medicine. – 2009. – Vol. 37, N 6. – P. 2000–2009.

150. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration / A. Das, M. Sinha, S. Datta [et al.] // The American Journal of Pathology. – 2015. – Vol. 185, N 10. – P. 2596–2606.

151. Monocytes in the Tumor Microenvironment / S. Ugel, S. Canè, F. De Sanctis, V. Bronte // Annual Review of Pathology. – 2021. – Vol. 16. – P. 93–122.

152. Mosser, D. M. Exploring the full spectrum of macrophage activation / D. M. Mosser, J. P. Edwards // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – Vol. 8, N 12. – P. 958–969.

153. Mucins in the mucosal barrier to infection / S. K. Linden, P. Sutton, N. G. Karlsson [et al.] // Mucosal Immunology. – 2008. – Vol. 1, N 3. – P. 183–197.

154. Multifactorial risk factors for mortality after chemotherapy and radiotherapy for non-small cell lung cancer / G. Defraene, F. Dankers, G. Price [et al.] // Radiother. Oncol. – 2020. – Vol. 152. – P. 117–125.

155. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report / P. Ewels, M. Magnusson, S. Lundin, M. Käller // Bioinformatics (Oxford, England). – 2016. – Vol. 32, N 19. – P. 3047–3048.

156. Murray, P. J. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets / P. J. Murray, T. A. Wynn // Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol. 11, N 11. – P. 723–737.

157. Mutation Analysis of MYORG in a Chinese Cohort With Primary Familial Brain Calcification / Y.-H. Zeng, B.-W. Lin, H.-Z. Su [et al.] // Frontiers in Genetics. – 2021. – Vol. 12. – P. 732389.

158. Myeloid-derived suppressor cells impair the quality of dendritic cell vaccines / I. Poschke, Y. Mao, L. Adamson [et al.] // Cancer. Immunol. Immunother. – 2012. – Vol. 61, N 6. – P. 827–838.

159. Natural history of bronchial preinvasive lesions / T. Ishizumi, A. McWilliams, C. MacAulay [et al.] // *Cancer. Metastasis. Rev.* – 2010. – Vol. 29, N 1. – P. 5–14.
160. NBPF9 Gene May Be Involved in Congenital Hypopituitarism: A Whole-Genome Study of a Boy with Pituitary Stalk Interruption Syndrome and His Family / C.-Z. Wang, L.-L. Guo, Q.-H. Guo, Y.-M. Mu // *International Journal of Endocrinology.* – 2020. – Vol. 2020. – P. 5401738.
161. Neoadjuvant chemotherapy combined with intraoperative radiotherapy is effective to prevent recurrence in high-risk non-small cell lung cancer (NSCLC) patients / O. V. Pankova, E. O. Rodionov, S. V. Miller [et al.] // *Transl. Lung. Cancer. Res.* – 2020. – Vol. 9, N 4. – P. 988–999.
162. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function / F. Ginhoux, J. L. Schultze, P. J. Murray [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2016. – Vol. 17, N 1. – P. 34–40.
163. Non-small-cell lung cancer / C. Gridelli, A. Rossi, D. P. Carbone [et al.] // *Nat. Rev. Dis. Primers.* – 2015. – Vol. 1. – P. 15009.
164. Oishi, Y. Macrophages in inflammation, repair and regeneration / Y. Oishi, I. Manabe // *Int. Immunol.* – 2018. – Vol. 30, N 11. – P. 511–528.
165. Olingy, C. E. Monocyte heterogeneity and functions in cancer / C. E. Olingy, H. Q. Dinh, C. C. Hedrick // *J. Leukoc. Biol.* – 2019. – Vol. 106, N 2. – P. 309–322.
166. Origin and Functions of Tumor-Associated Myeloid Cells (TAMCs) / A. Sica, C. Porta, S. Morlacchi [et al.] // *Cancer Microenviron.* – 2012. – Vol. 5, N 2. – P. 133–149.
167. Osteopontin genetic variants are associated with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients and bone metastasis / Y. Chen, H. Liu, W. Wu [et al.] // *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* – 2013. – Vol. 32, N 1. – P. 45.
168. P53 immunohistochemistry can identify bronchial dysplastic lesions proceeding to lung cancer: a prospective study / A. Ponticiello, E. Barra, U. Giani [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2000. – Vol. 15, N 3. – P. 547–552.
169. Pan-Cancer Analysis of PARP1 Alterations as Biomarkers in the Prediction of Immunotherapeutic Effects and the Association of Its Expression Levels and

Immunotherapy Signatures / X. Zhang, Y. Wang, G. A [et al.] // Front. Immunol. – 2021. – Vol. 12. – P. 721030.

170. Pasche, B. Non-small cell lung cancer and precision medicine: a model for the incorporation of genomic features into clinical trial design / B. Pasche, S. C. Grant // Jama. – 2014. – Vol. 311, N 19. – P. 1975–1976.

171. Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy / R. Hughes, B. Z. Qian, C. Rowan [et al.] // Cancer Res. – 2015. – Vol. 75, N 17. – P. 3479–3491.

172. Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment / D. Lambrechts, E. Wauters, B. Boeckx [et al.] // Nat. Med. – 2018. – Vol. 24, N 8. – P. 1277–1289.

173. Podoplanin-Expressing Macrophages Promote Lymphangiogenesis and Lymphoinvasion in Breast Cancer / P. Bieniasz-Krzywiec, R. Martín-Pérez, M. Ehling [et al.] // Cell. Metabolism. – 2019. – Vol. 30, N 5. – P. 917–936.e10.

174. Pollard, J. W. Trophic macrophages in development and disease / J. W. Pollard // Nat. Rev. Immunol. – 2009. – Vol. 9, N 4. – P. 259–270.

175. PolyADP-Ribosylation of NFATc3 and NF- κ B Transcription Factors Modulate Macrophage Inflammatory Gene Expression in LPS-Induced Acute Lung Injury / Y. Nie, T. S. Nirujogi, R. Ranjan [et al.] // J. Innate. Immun. – 2021. – Vol. 13, N 2. – P. 83–93.

176. Polymorphisms of the interleukin-1 beta gene are associated with increased risk of non-small cell lung cancer / S. Zienolddiny, D. Ryberg, V. Maggini [et al.] // International Journal of Cancer. – 2004. – Vol. 109, N 3. – P. 353–356.

177. Preinvasive disease of the airway / R. M. Thakrar, A. Pennycuick, E. Borg, S. M. Janes // Cancer Treat Rev. – 2017. – Vol. 58. – P. 77–90.

178. Premalignant changes in the bronchial epithelium are prognostic factors of distant metastasis in non-small cell lung cancer patients / O. V. Pankova, L. A. Tashireva, E. O. Rodionov [et al.]. – Text : electronic // Frontiers in Oncology. – 2021. – Vol. 11. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8631511/> (date accessed: 12.10.2023).

179. Premalignant lesions of squamous cell carcinoma of the lung: The molecular make-up and factors affecting their progression / E. V. Denisov, A. A. Schegoleva, P. A. Gervas [et al.] // *Lung Cancer*. – 2019. – Vol. 135. – P. 21–28.

180. Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability / C. Erbel, A. Wolf, F. Lasitschka [et al.] // *International Journal of Cardiology*. – 2015. – Vol. 186. – P. 219–225.

181. Prognosis of Different Types of Non-Small Cell Lung Cancer Progression: Current State and Perspectives / A. A. Schegoleva, A. A. Khozyainova, A. A. Fedorov [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem*. – 2021. – Vol. 55, N S2. – P. 29–48.

182. Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer / R. Navab, D. Strumpf, B. Bandarchi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Vol. 108, N 17. – P. 7160–7165.

183. Prognostic value of diametrically polarized tumor-associated macrophages in renal cell carcinoma / L. Xu, Y. Zhu, L. Chen [et al.] // *Ann Surg Oncol*. – 2014. – Vol. 21, N 9. – P. 3142–3150.

184. Progression of airway dysplasia and C-reactive protein in smokers at high risk of lung cancer / D. D. Sin, S. F. Man, A. McWilliams, S. Lam // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 2006. – Vol. 173, N 5. – P. 535–539.

185. Promoter polymorphisms of TOP2A and ERCC1 genes as predictive factors for chemotherapy in non-small cell lung cancer patients / A. Grenda, J. Błach, M. Szczyrek [et al.] // *Cancer Med*. – 2020. – Vol. 9, N 2. – P. 605–614.

186. Protein arginine methyltransferase 5 promotes lung cancer metastasis via the epigenetic regulation of miR-99 family/FGFR3 signaling / P. Jing, N. Zhao, M. Ye [et al.] // *Cancer Lett*. – 2018. – Vol. 427. – P. 38–48.

187. PTPRZ1 regulates calmodulin phosphorylation and tumor progression in small-cell lung carcinoma / H. Makinoshima, G. Ishii, M. Kojima [et al.] // *BMC Cancer*. – 2012. – Vol. 12, N 1. – P. 537.

188. Raica, M. Angiogenesis in pre-malignant conditions / M. Raica, A. M. Cimpean, D. Ribatti // *Eur. J. Cancer*. – 2009. – Vol. 45, N 11. – P. 1924–1934.

189. Rare variants of large effect in BRCA2 and CHEK2 affect risk of lung cancer / Y. Wang, J. D. McKay, T. Rafnar [et al.] // *Nat. Genet.* – 2014. – Vol. 46, N 7. – P. 736–741.

190. Reciprocal modulation of mesenchymal stem cells and tumor cells promotes lung cancer metastasis / G. Fregni, M. Quinodoz, E. Möller [et al.] // *EBioMedicine.* – 2018. – Vol. 29. – P. 128–145.

191. Recurrence of squamous cell lung carcinoma is associated with the co-presence of reactive lesions in tumor-adjacent bronchial epithelium / O. V. Pankova, E. V. Denisov, A. A. Ponomaryova [et al.] // *Tumour Biol.* – 2016. – Vol. 37, N 3. – P. 3599–3607.

192. Relationship between tumor size and survival in non-small-cell lung cancer (NSCLC): an analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) registry / J. Zhang, K. A. Gold, H. Y. Lin [et al.] // *J. Thorac. Oncol.* – 2015. – Vol. 10, N 4. – P. 682–690.

193. Reprogramming the tumor microenvironment to enhance adoptive cellular therapy / P. A. Beavis, C. Y. Slaney, M. H. Kershaw [et al.] // *Semin Immunol.* – 2016. – Vol. 28, N 1. – P. 64–72.

194. Reprogramming Tumor-Associated Macrophages To Reverse EGFR(T790M) Resistance by Dual-Targeting Codelivery of Gefitinib/Vorinostat / H. Peng, B. Chen, W. Huang [et al.] // *Nano Lett.* – 2017. – Vol. 17, N 12. – P. 7684–7690.

195. Resistin: An inflammatory cytokine with multi-faceted roles in cancer / S. K. Sudan, S. K. Deshmukh, T. Poosarla [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* – 2020. – Vol. 1874, N 2. – P. 188419.

196. Resistin facilitates metastasis of lung adenocarcinoma through the TLR4/Src/EGFR/PI3K/NF- κ B pathway / W. J. Gong, J. Y. Liu, J. Y. Yin [et al.] // *Cancer Sci.* – 2018. – Vol. 109, N 8. – P. 2391–2400.

197. Richards, D. M. Monocytes and macrophages in cancer: development and functions / D. M. Richards, J. Hettinger, M. Feuerer // *Cancer Microenviron.* – 2013. – Vol. 6, N 2. – P. 179–191.

198. RNAi for contactin 2 inhibits proliferation of U87-glioma stem cells by downregulating AICD, EGFR, and HES1 / Y. Guo, P. Zhang, H. Zhang [et al.] // *OncoTargets and therapy*. – 2017. – Vol. 10. – P. 791–801.
199. Role of TGFB1 polymorphism in the development of metastatic brain tumors in non-small cell lung cancer patients / H. B. Wang, W. G. Song, H. Q. Liu [et al.] // *Genet. Mol. Res.* – 2015. – Vol. 14, N 2. – P. 3545–3550.
200. Röszer, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms / T. Röszer // *Mediators Inflamm.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 816460.
201. Ruffell, B. Macrophages and therapeutic resistance in cancer / B. Ruffell, L. M. Coussens // *Cancer Cell*. – 2015. – Vol. 27, N 4. – P. 462–472.
202. Scavenger Receptor A1 Prevents Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer via Suppression of Macrophage Serum Amyloid A1 / Y. Zhang, Y. Wei, B. Jiang [et al.] // *Cancer Research*. – 2017. – Vol. 77, N 7. – P. 1586–1598.
203. Segura, E. Inflammatory dendritic cells in mice and humans / E. Segura, S. Amigorena // *Trends. Immunol.* – 2013. – Vol. 34, N 9. – P. 440–445.
204. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018) / M. Majem, O. Juan, A. Insa [et al.] // *Clin. Transl. Oncol.* – 2019. – Vol. 21, N 1. – P. 3–17.
205. Serglycin in tumor microenvironment promotes non-small cell lung cancer aggressiveness in a CD44-dependent manner / J.-Y. Guo, H.-S. Hsu, S.-W. Tyan [et al.] // *Oncogene*. – 2017. – Vol. 36, N 17. – P. 2457–2471.
206. Shuhui, L. Role of mammalian chitinases in asthma / L. Shuhui, Y. K. Mok, W. S. Wong // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2009. – Vol. 149, N 4. – P. 369–377.
207. Shukuya, T. Germline mutations in lung cancer / T. Shukuya, K. Takahashi // *Respir Investig.* – 2019. – Vol. 57, N 3. – P. 201–206.
208. Sica, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas / A. Sica, A. Mantovani // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122, N 3. – P. 787–795.
209. Single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of LPP is a risk factor for lung cancer: a case-control study / S. Yan, R. Sun, S. Wu [et al.] // *BMC Cancer*. – 2019. – Vol. 19, N 1. – P. 35.

210. Sjoelund, V. Phosphoproteome profiling of the macrophage response to different toll-like receptor ligands identifies differences in global phosphorylation dynamics / V. Sjoelund, M. Smelkinson, A. Nita-Lazar // *J. Proteome Res.* – 2014. – Vol. 13, N 11. – P. 5185–5197.

211. SPOCK1 is a novel transforming growth factor- β target gene that regulates lung cancer cell epithelial-mesenchymal transition / L. Miao, Y. Wang, H. Xia [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol. 440, N 4. – P. 792–797.

212. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner / A. Dobin, C. A. Davis, F. Schlesinger [et al.] // *Bioinformatics (Oxford, England)*. – 2013. – Vol. 29, N 1. – P. 15–21.

213. TALPID3 and ANKRD26 selectively orchestrate FBF1 localization and cilia gating / H. Yan, C. Chen, H. Chen [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 2196.

214. Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma / X. Li, W. Yao, Y. Yuan [et al.] // *Gut*. – 2017. – Vol. 66, N 1. – P. 157–167.

215. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses / J. B. Mitchem, D. J. Brennan, B. L. Knolhoff [et al.] // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73, N 3. – P. 1128–1141.

216. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5/ACP5 Interacts with p53 to Control the Expression of SMAD3 in Lung Adenocarcinoma / Y. Hu, J. Yu, Q. Wang [et al.] // *Molecular Therapy Oncolytics*. – 2020. – Vol. 16. – P. 272–288.

217. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015 / A. G. Nicholson, M. S. Tsao, M. B. Beasley [et al.] // *J. Thorac. Oncol.* – 2022. – Vol. 17, N 3. – P. 362–387.

218. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling / C. J. Ferrante, G. Pinhal-Enfield, G. Elson [et al.] // *Inflammation*. – 2013. – Vol. 36, N 4. – P. 921–931.

219. The Autotaxin-Lysophosphatidic Acid Axis Promotes Lung Carcinogenesis / C. Magkrioti, N. Oikonomou, E. Kaffe [et al.] // *Cancer Research*. – 2018. – Vol. 78, N 13. – P. 3634–3644.

220. The Biological Functions and Clinical Applications of Integrins in Cancers / C.-Y. Su, J.-Q. Li, L.-L. Zhang [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 579068.

221. The contribution of hereditary cancer-related germline mutations to lung cancer susceptibility / M. Liu, X. Liu, P. Suo [et al.] // *Transl Lung Cancer Res*. – 2020. – Vol. 9, N 3. – P. 646–658.

222. The effect of different treatment modalities on survival in elderly patients with locally advanced non-small cell lung cancer / A. Sakin, S. Sahin, M. M. Atci [et al.] // *Pulmonology*. – 2021. – Vol. 27, N 1. – P. 26–34.

223. The epigenetic memory of monocytes and macrophages as a novel drug target in atherosclerosis / S. Bekkering, L. A. Joosten, J. W. van der Meer [et al.] // *Clin Ther*. – 2015. – Vol. 37, N 4. – P. 914–923.

224. The Importance of the Immune System and Molecular Cell Signaling Pathways in the Pathogenesis and Progression of Lung Cancer / J. Smok-Kalwat, P. Mertowska, S. Mertowski [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, N 2. – P. 1506.

225. The Microenvironment of Lung Cancer and Therapeutic Implications / V. Mittal, T. El Rayes, N. Narula [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol*. – 2016. – Vol. 890. – P. 75–110.

226. The natural course of preneoplastic lesions in bronchial epithelium / R. H. Breuer, A. Pasic, E. F. Smit [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2005. – Vol. 11, N 2, Pt 1. – P. 537–543.

227. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients / C. Medrek, F. Pontén, K. Jirström, K. Leandersson // *BMC Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – P. 306.

228. The Relationship Between rs3212986C>A Polymorphism and Tumor Stage in Lung Cancer Patients / A. A. Anoushirvani, R. Aghabozorgi, A. Ahmadi [et al.] // *Cureus*. – 2019. – Vol. 11, N 4. – P. e4423.

229. The role of bronchoscopy in the diagnosis of early lung cancer: a review / M. Andolfi, R. Potenza, R. Capozzi [et al.] // J. Thorac. Dis. – 2016. – Vol. 8, N 11. – P. 3329–3337.
230. The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer / D. S. O’Callaghan, D. O’Donnell, F. O’Connell, K. J. O’Byrne // J. Thorac. Oncol. – 2010. – Vol. 5, N 12. – P. 2024–2036.
231. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis / C. Murdoch, M. Muthana, S. B. Coffelt, C. E. Lewis // Nat. Rev. Cancer. – 2008. – Vol. 8, N 8. – P. 618–631.
232. The Roles of RNA Polymerase I and III Subunits Polr1c and Polr1d in Craniofacial Development and in Zebrafish Models of Treacher Collins Syndrome / K. E. Noack Watt, A. Achilleos, C. L. Neben [et al.] // PLoS Genetics. – 2016. – Vol. 12, N 7. – P. e1006187.
233. The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer / G. J. Guthrie, K. A. Charles, C. S. Roxburgh [et al.] // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2013. – Vol. 88, N 1. – P. 218–230.
234. TIGIT(+) iTregs elicited by human regulatory macrophages control T cell immunity / P. Riquelme, J. Haarer, A. Kammler [et al.] // Nat. Commun. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 2858.
235. Transcriptional modulation of a human monocytic cell line exposed to PM(10) from an urban area / E. Bastonini, L. Verdone, S. Morrone [et al.] // Environ Res. – 2011. – Vol. 111, N 6. – P. 765–774.
236. Transcriptional profiling identifies novel regulators of macrophage polarization / K. Y. Gerrick, E. R. Gerrick, A. Gupta [et al.] // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, N 12. – P. e0208602.
237. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation / J. Xue, S. V. Schmidt, J. Sander [et al.] // Immunity. – 2014. – Vol. 40, N 2. – P. 274–288.
238. Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro / P. Italiani, E. M. Mazza, D. Lucchesi [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, N 2. – P. e87680.

239. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces the expression of proinflammatory cytokines in macrophages and re-educates tumor-associated macrophages to an antitumor phenotype / J. Gao, D. Wang, D. Liu [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2015. – Vol. 26, N 18. – P. 3178–3189.

240. Tumor-associated macrophages correlate with phenomenon of epithelial-mesenchymal transition and contribute to poor prognosis in triple-negative breast cancer patients / W.-J. Zhang, X.-H. Wang, S.-T. Gao [et al.] // *The Journal of Surgical Research.* – 2018. – Vol. 222. – P. 93–101.

241. Tumor-associated macrophages in lung cancer: Friend or foe? / F. Xu, Y. Wei, Z. Tang [et al.] // *Molecular Medicine Reports.* – 2020. – Vol. 22. Tumor-associated macrophages in lung cancer. – N 5. – P. 4107–4115.

242. Tumor-associated macrophages modulate resistance to oxaliplatin via inducing autophagy in hepatocellular carcinoma / X. T. Fu, K. Song, J. Zhou [et al.] // *Cancer Cell. Int.* – 2019. – Vol. 19. – P. 71.

243. Tumor-Derived CCL2 Mediates Resistance to Radiotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / A. Kalbasi, C. Komar, G. M. Tooker [et al.] // *Clin. Cancer. Res.* – 2017. – Vol. 23, N 1. – P. 137–148.

244. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis / A. Hoshino, B. Costa-Silva, T.-L. Shen [et al.] // *Nature.* – 2015. – Vol. 527, N 7578. – P. 329–335.

245. Tumour-associated macrophages secrete pleiotrophin to promote PTPRZ1 signalling in glioblastoma stem cells for tumour growth / Y. Shi, Y.-F. Ping, W. Zhou [et al.] // *Nature Communications.* – 2017. – Vol. 8. – P. 15080.

246. Upregulation of PD-L1 by SPP1 mediates macrophage polarization and facilitates immune escape in lung adenocarcinoma / Y. Zhang, W. Du, Z. Chen, C. Xiang // *Exp. Cell. Res.* – 2017. – Vol. 359, N 2. – P. 449–457.

247. Wei, Z. CTLA-4 +49 A/G Polymorphism and the Risk of Lung Cancer: a Meta-analysis / Z. Wei, S. Zhang, J. Hu // *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* – 2021. – Vol. 24, N 3. – P. 173–181.

248. Wistuba, I. Lung cancer preneoplasia / I. Wistuba, A. F. Gazdar // *Annu. Rev. Pathol.* – 2006. – Vol. 1. – P. 331–348.

249. Wu, W. Lung injury caused by paraquat poisoning results in increased interleukin-6 and decreased microRNA-146a levels / W. Wu, Y. Li // *Exp. Ther. Med.* – 2018. – Vol. 16, N 1. – P. 406–412.

250. Wynn, T. A. Macrophage biology in development, homeostasis and disease / T. A. Wynn, A. Chawla, J. W. Pollard // *Nature*. – 2013. – Vol. 496, N 7446. – P. 445–455.

251. Yao, Y. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy / Y. Yao, X.-H. Xu, L. Jin // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 792.

252. Zhang, B. Metastasis-associated protein 2 (MTA2) promotes the metastasis of non-small-cell lung cancer through the inhibition of the cell adhesion molecule Ep-CAM and E-cadherin / B. Zhang, H. Zhang, G. Shen // *Jpn J Clin Oncol.* – 2015. – Vol. 45, N 8. – P. 755–766.

253. Zhang, X. Characterization of Class-3 Semaphorin Receptors, Neuropilins and Plexins, as Therapeutic Targets in a Pan-Cancer Study / X. Zhang, S. Shao, L. Li // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12, N 7. – P. 1816.

254. Zizzo, G. IL-17 stimulates differentiation of human anti-inflammatory macrophages and phagocytosis of apoptotic neutrophils in response to IL-10 and glucocorticoids / G. Zizzo, P. L. Cohen // *J Immunol.* – 2013. – Vol. 190, N 10. – P. 5237–5246.