

## ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЯ АМИНОКИСЛОТ В МОНОЦИТАХ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А. В. Новоселова<sup>1✉</sup>, М. Н. Юшина<sup>1</sup>, М. Р. Патышева<sup>2,3</sup>, Е. А. Простакишина<sup>2,3</sup>, О. Д. Брагина<sup>2</sup>, Е. Ю. Гарбуков<sup>2</sup>, Ю. Г. Кжышковска<sup>3,4,5,6</sup><sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр, Томск, Россия<sup>3</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия<sup>4</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия<sup>5</sup> Институт трансфузионной медицины и иммунологии, Медицинский факультет Маннгейм, Университет Гейдельберга, Гейдельберг, Германия<sup>6</sup> Германский Красный крест Служба крови Баден-Вюртемберг — Гессен, Мангейм, Германия

Моноциты — крупные циркулирующие в крови лейкоциты, которые во взрослом организме являются основными предшественниками тканевых макрофагов, а также опухоли-ассоциированных макрофагов. Различные типы моноцитов имеют разнонаправленное действие в отношении роста и метастатического распространения раковых клеток, как активируют, так и подавляют данные процессы. Опухолевая прогрессия связана с запуском целого каскада воспалительных и иммунных реакций. Данные патологические процессы ассоциированы с изменением содержания аминокислот в составе моноцитов, что может привести к нарушению их функции, в частности миграции, деления и созревания. Целью работы было профилировать аминокислоты моноцитов с последующим изучением особенностей аминокислотного состава моноцитов пациентов с раком молочной железы при помощи жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. Статистически значимые различия уровней метаболитов в моноцитах пациентов с раком молочной железы и моноцитов здоровых доноров обнаружены для глицина ( $p$ -value = 0,0127), аспарагина ( $p$ -value = 0,0197), пролина ( $p$ -value = 0,0159), метионина ( $p$ -value = 0,0357), триптофана ( $p$ -value = 0,0028), тирозина ( $p$ -value = 0,0127). В результате биоинформатического анализа метаболитических путей с участием задействованных аминокислот были определены биологические сети, которые потенциально могут вовлекаться в изменение фенотипа моноцитов под воздействием РМЖ. Разработаны математические модели, построенные на комбинации аминокислот, обладающие 100% чувствительностью и специфичностью. Выявлены особенности метаболизма клеток иммунной системы при РМЖ и предложены потенциальные диагностические биомаркеры.

**Ключевые слова:** моноциты, рак молочной железы, метаболомика, аминокислоты, масс-спектрометрия

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 29 сентября 2021 г. № 075-15-2021-1073 на тему: «Генетическое и эпигенетическое редактирование клеток опухоли и микроокружения с целью блокировки метастазирования»).

**Вклад авторов:** А. В. Новоселова — обработка материала, анализ аминокислотного профиля моноцитов, статистическая обработка данных, редактирование текста; М. Н. Юшина — обработка материала, написание и редактирование текста; М. Р. Патышева — концепция и дизайн исследования, выделение моноцитов; Е. А. Простакишина — выделение моноцитов; О. В. Брагина, Е. Ю. Гарбуков — подбор пациентов, сбор биологического материала, Ю. Г. Кжышковска — концепция и дизайн исследования.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 10 от 05 декабря 2019 г.), проведено в соответствии со стандартами этического комитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова», федеральными законами Российской Федерации (№ 152, 323 и др.) и Хельсинкской декларацией 1964 г. со всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими научные исследования на биоматериалах, полученных от людей. Все участники подписали информированное согласие об участии в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Анастасия Викторовна Новоселова  
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117198, Россия; vfrankevich@gmail.com

**Статья получена:** 08.12.2022 **Статья принята к печати:** 22.12.2022 **Опубликована онлайн:** 28.12.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.064

## PECULIARITIES OF AMINO ACID PROFILE IN MONOCYTES IN BREAST CANCER

Novoselova AV<sup>1✉</sup>, Yushina MN<sup>1</sup>, Patysheva MR<sup>2,3</sup>, Prostkishina EA<sup>2,3</sup>, Bragina OD<sup>2</sup>, Garbukov EY<sup>2</sup>, Kzhyshkowska JG<sup>3,4,5,6</sup><sup>1</sup> Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia<sup>2</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia<sup>3</sup> Tomsk National State University, Tomsk, Russia<sup>4</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia<sup>5</sup> Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Faculty of Medicine Mannheim, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany<sup>6</sup> German Red Cross Blood Service Baden-Württemberg-Hesse, Mannheim, Germany

Monocytes are large circulating white blood cells that are the main precursors of tissue macrophages as well as tumor-associated macrophages in the adult body. Different types of monocytes have multidirectional effects on the growth and metastatic spread of cancer cells, both activating and inhibiting these processes. Tumor progression is associated with the triggering of a whole cascade of inflammatory and immune reactions. These pathological processes are associated with changes in the amino acid content of monocytes, which can lead to disruption of their function, in particular their migration, division and maturation. The aim of the work was to profile the amino acids of monocytes, followed by a study of the amino acid composition of monocytes from patients with breast cancer using liquid chromatography with mass spectrometric detection. Significant differences in metabolite levels in monocytes of breast cancer patients and monocytes of healthy donors were found for glycine ( $p$ -value = 0.0127), asparagine ( $p$ -value = 0.0197), proline ( $p$ -value = 0.0159), methionine ( $p$ -value = 0.0357), tryptophan ( $p$ -value = 0.0028), tyrosine ( $p$ -value = 0.0127). In the study, we identified biological networks that could potentially be involved in altering the phenotype of monocytes affected by breast cancer (BC), using bioinformatic analysis of metabolic pathways involving the discovered amino acids. Mathematical models based on amino acid combinations with 100% sensitivity and specificity have been developed. Features of immune system cell metabolism in BC have been identified and potential diagnostic biomarkers have been proposed.

**Keywords:** monocytes, breast cancer, metabolomics, amino acids, mass spectrometry

**Funding:** The study was financially supported by the Russian Federation represented by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement dated 29 September 2021 № 075-15-2021-1073 on the topic "Genetic and epigenetic editing of tumor cells and the microenvironment in order to block metastasis").

**Author contribution:** Novoselova AV — material processing, monocyte amino acid profile analysis, statistical data processing, text editing; Yushina MN — material processing, text writing and editing; Patysheva MR — study concept and design, monocyte isolation; Prostkishina EA — monocyte isolation; Bragina OD, Garbukov EY — patient selection, collection of biological material; Kzhyshkowska JG — study concept and design.

**Compliance with ethical standards:** the study is approved by the ethics committee of the Research Institute of Oncology under Tomsk National Research Medical Center (record No.10 dated 05 December 2019), was conducted in accordance with the standards of the ethics committee of V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, federal laws of the Russian Federation (Nos. 152, 323, etc.) and the 1964 Declaration of Helsinki with all subsequent additions and amendments regulating scientific research on biomaterials obtained from humans. All participants signed an informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anastasia V. Novoselova  
Academik Oparin street, 4, Moscow, 117198, Russia; vfrankevich@gmail.com

**Received:** 08.12.2022 **Accepted:** 22.12.2022 **Published online:** 28.12.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.064

Моноциты во взрослом организме являются динамической популяцией основных клеток врожденного иммунитета, которые постоянно формируются из предшественников в костном мозге, и циркулируют в кровотоке от 3 до 6 дней. Моноциты во взрослом организме служат основными предшественниками тканевых макрофагов, основными сенсорами врожденного иммунитета для экзогенных и эндогенных патологических факторов в крови, а также ключевыми предшественниками опухолеассоциированных макрофагов [1–5]. Представляя пул эффекторных клеток врожденного иммунитета с паттернраспознающими рецепторами, они могут выступать в качестве регуляторов опухолевого роста. Различные типы моноцитов имеют разнонаправленное действие в отношении роста и метастатического распространения раковых клеток, они и активируют, и подавляют данные процессы. Опухолевая прогрессия связана с запуском целого каскада воспалительных и иммунных реакций. Данные патологические процессы ассоциированы с изменением содержания аминокислот в составе моноцитов, что может привести к нарушению их функции [6–8].

Моноциты являются предшественниками опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) и дендритных клеток, которые формируют микроокружение опухоли [9]. В очаге воспаления они выполняют функцию фагоцитоза и выработки провоспалительных цитокинов. В условиях провоспалительного микроокружения они дифференцируются в воспалительные макрофаги и воспалительные дендритные клетки, которые впоследствии мигрируют в лимфатические узлы и активируют Т-лимфоциты CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>. Активированные иммунные клетки в последующем включаются в метаболические пути, ассоциированные с прогрессией раковых клеток [10–13]. Эта общность метаболических процессов создает фундаментальную конкуренцию за питательные субстраты, необходимые как раковым, так и иммунным клеткам в микроокружении опухоли.

Развитие аналитической техники, и в первую очередь жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ЖХ-МС), привело к формированию метаболомики [14–16], которую активно используют для выявления метаболических особенностей онкологических процессов, выяснения механизмов патогенеза и поиска новых лекарственных мишеней [14, 17]. На сегодняшний день особого внимания заслуживает изучение профиля аминокислот. Изменение уровня аминокислот может иметь важное значение для формирования надлежащего иммунного ответа [13, 18–20] и приводить к нарушению миграции, деления и созревания иммунных клеток.

Аминокислоты участвуют в контроле ряда путей, регулирующих реакции иммунных клеток, включая передачу сигналов mTOR и выработку NO [19, 21]. Конкуренция за метаболиты и сигнальное взаимодействие между иммунными клетками хозяина и патогенами могут повлиять на развитие болезни, в том числе и опухолевого процесса [18].

Рак молочной железы (РМЖ) остается лидирующим по распространенности злокачественным новообразованием у женщин [22]. Это первый тип рака, для которого в экспериментах на животных была продемонстрирована роль иммунных клеток в поддержании роста опухоли [23]. Дальнейшие исследования позволили накопить информацию о взаимном влиянии раковых клеток и клеток иммунной системы [7, 9, 17, 24–29].

Изучение гетерогенности моноцитов и их роли на разных стадиях прогрессирования онкологического процесса имеет решающее значение для исследования способности раковых клеток препятствовать иммунологическому надзору и скрываться от агрессии иммунокомпетентных клеток. Работы в этом направлении позволят в будущем выявить новые биомаркеры онкологического процесса и разработать персонализированные пути иммунотерапии рака [30].

Целью работы было установление особенностей аминокислотного профиля моноцитов, выделенных из крови пациенток с РМЖ.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В группу исследования вошли 13 больных в возрасте 36–69 лет с РМЖ IIA–IIIA стадии T1-2N0-1M0. Все пациентки имели Her2<sup>+</sup> молекулярный подтип опухоли (Ki67+ не менее 30%). В контрольную группу вошли 10 здоровых добровольцев в возрасте 50–67 лет. Критерии включения в контрольную группу: отсутствие хронических заболеваний в период обострения, отсутствие онкологических заболеваний в анамнезе, отсутствие аллергических и аутоиммунных заболеваний, подписанное информированное согласие об участии в исследовании.

Объектом исследования послужила периферическая венозная кровь, взятая натощак в пробирки с КЗЭДТА. Из крови получали фракцию мононуклеарных клеток с помощью обогащения на градиенте плотности фиколла (1,077 г/см<sup>3</sup>). Из полученной фракции мононуклеарных клеток выделяли CD14<sup>+</sup>-моноциты по протоколу проведения позитивной магнитной сепарации компании Myltenyi Biotec с использованием магнитного сепаратора MidiMACS (Myltenyi Biotec; Германия). Чистота полученной фракции была определена с помощью проточной

**Таблица 1.** Состав подвижной фазы для ЖХ-МС анализа аминокислот

Время, мин	%A	%B
0	95	5
0,1	95	5
0,2	75	25
5	70	30
15	45	55
20	30	70
20,5	5	95
25	5	95
25,5	95	5
40	95	5

Таблица 2. Параметры транзитных переходов для масс-спектрометрического детектирования аминокислот

Аминокислота	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Ускоряющий потенциал ячейки соударений, В	Энергия соударений, В
Метилгистидин	226,2	42,2	122	72
Аминомасляная кислота	160,1	143,1	83	4
5-Гидроксизин	219,2	128	83	12
Аланин	146,1	39,2	83	20
Аргинин	231,18	172,1	83	12
Аспарагин	189,1	144,1	83	8
Аспарагиновая кислота	246,2	144,1	83	8
Цитруллин	232,2	215,1	83	4
Цистин	353,16	130,1	122	20
Глутаминовая кислота	260,19	186,1	83	8
Глютамин	203,1	186,1	83	4
Глицин	132,1	76,2	44	4
Гистидин	212,14	110,1	83	12
Лейцин	188,17	30,3	83	20
Лизин	203,2	186,2	83	4
Метионин	206,1	104,1	83	8
Орнитин	189,2	172,2	83	8
Фенилаланин	222,1	103,1	83	40
Пролин	172,1	116,1	83	12
Саркозин	146,1	44,3	83	12
Серин	162,12	106,1	83	8
Треонин	176,13	158,1	83	4
Транс-4-гидроксипролин	188,1	86,2	83	12
Триптофан	261,16	244,1	83	4
Тирозин	238,1	136,1	83	12
Валин	174,15	72,2	83	12

цитофлуорометрии на приборе Cytoflex (Beckman Coulter; США) и составила более 92% CD14<sup>+</sup>-клеток. Подсчет числа клеток проводили на основании данных цитофлуорометрии. Аликвоту, содержащую 4–5 млн моноцитов, отделяли и 3 раза проводили промывку центрифугированием при 311 g в течение 5 мин с холодным 0,3%-м ацетатом аммония. Полученный осадок клеток высушивали в атмосфере азота и хранили при –80 °С до экстракции в течение не более чем 6 месяцев.

#### Подготовка образцов для ЖХ-МС анализа

В исследовании использовали ацетонитрил, метанол, бутанол и хлороформ (степени очистки для жидкостной хроматографии), приобретенные у Merck (Дармштадт; Германия), а также водный раствор соляной кислоты 37% (Acros Organics; США). Деионизированную воду готовили с помощью установки Milli-Q Reference Water Purification System (Мольсем; Франция).

Приготовление образцов осуществляли согласно следующей процедуре: к образцу моноцитов добавляли 480 мкл раствора хлороформ/метанол (2:1, об./об.); образец подвергали ультразвуковому воздействию в течение 10 мин при комнатной температуре, добавляли 150 мкл воды, перемешивали в течение 5 мин; получившийся раствор центрифугировали при 13 000 g в течение 5 мин при комнатной температуре; отбирали 150 мкл верхнего водно-метанольного слоя; сушили в токе азота 30 мин при 60 °С; добавляли 200 мкл раствора соляной кислоты в бутаноле (0,1 моль/л); перемешивали

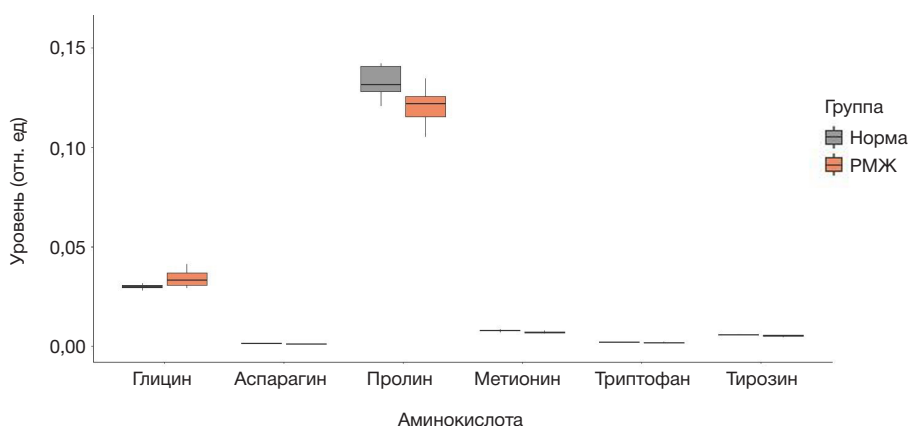
в течение 3 мин; центрифугировали при 13 000 g в течение 15 с при комнатной температуре; выдерживали при 60 °С в течение 15 мин для проведения реакции дериватизации; центрифугировали при 13 000 g в течение 15 с при комнатной температуре; сушили в токе азота 30 мин при 60 °С; перерастворяли в 300 мкл раствора ацетонитрил/вода (1/1 об./об.); перемешивали в течение 5 мин; центрифугировали при 13 000 g в течение 15 с при комнатной температуре; переносили 200 мкл полученного образца в вialу со вставкой для дальнейшего анализа.

#### ЖХ-МС-анализ и обработка данных

Анализ образцов осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе 1260 Infinity II (Agilent; США) с детектированием на масс-спектрометре 6460 Triple Quad (Agilent; США). Разделение образцов осуществляли методом жидкостной хроматографии с использованием колонки Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 2,1 × 100 мм, с диаметром сорбента 1,8 мкм (Agilent; США).

Для анализа аминокислот вводили 3 мкл образца и использовали следующие элюенты, подаваемые со скоростью потока 150 мкл/мин с поддерживаемой температурой колонки 20 °С, в качестве подвижной фазы: элюент А — 10 мМ раствор ацетата аммония в воде, элюент В — ацетонитрил. Состав подвижной фазы в ходе анализа изменялся в соответствии с табл. 1.

Транзитные переходы между ионами-предшественниками и ионами-продуктами для анализируемых аминокислот



**Рис. 1.** Бокс-диаграмма аминокислот, уровни которых в моноцитах статистически значимо различаются между группами «норма» и РМЖ. Границами бокса служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния

приведены в табл. 2. Параметры источника ионов были следующие: температура осушающего газа — 150 °С, скорость потока осушающего газа — 10 л/мин, давление газа-распылителя — 2,76 Бар, температура газа-завесы — 400 °С, скорость потока газа-завесы — 10 л/мин, напряжение на капилляре — 2000 В.

Уровни метаболитов определяли с использованием программы QuantAnalysis (Agilent; США).

### Статистический анализ данных

Все данные были проанализированы в программной среде R (<http://www.r-project.org/>, версии R 4.1.1, 4.1.2). Начальную обработку таблиц данных производили с помощью пакетов tidyverse (версия 1.3.1) и readxl (1.3.1). Для визуализации результатов использовались ggplot2 (версия 3.3.5) и ggforestplot (версия 0.1.0).

Сравнение уровней аминокислот проводили с помощью непараметрического критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Для описания количественных данных использовали медианы (Me) и квартили  $Q_1$  и  $Q_3$ . Величину порогового уровня значимости  $p$  принимали равной 0,05.

Для оценки возможности классификации пациентов по группам на основании исследуемых параметров были разработаны модели логистической регрессии. В качестве независимых переменных в моделях рассматривали уровни отдельных аминокислот. В качестве зависимой переменной выступала принадлежность образца к группе

«норма» или «РМЖ». Из всех разработанных моделей выбирали четыре с наибольшей величиной площади под ROC-кривой (AUC). Качество разработанных моделей оценивали путем построения ROC-кривой, определения площади под ROC-кривой, а также расчета чувствительности и специфичности.

Для аминокислот, уровни которых различались в моноцитах от пациентов с РМЖ, проводили анализ вовлеченности в метаболические пути с помощью ресурса MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/home.html>).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе анализа были получены полуколичественные данные о содержании 26 аминокислот в моноцитах здоровых доноров и пациентов с РМЖ. Список аминокислот включал в себя метил-гистидин, аминокислотную кислоту, 5-гидроксилизин, аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цитруллин, цистин, глутаминовую кислоту, глютамин, глицин, гистидин, лейцин, лизин, метионин, орнитин, фенилаланин, пролин, саркозин, серин, треонин, транс-4-гидроксипролин, триптофан, тирозин, валин. Профиль аминокислот получали делением площади хроматографического пика каждой аминокислоты на суммарную площадь пиков всех аминокислот соответствующего образца. Для поиска различий профилей аминокислот в моноцитах, полученных от пациентов групп «норма» и «РМЖ», было выполнено

**Таблица 3.** Метаболические пути, в которые вовлечены аминокислоты со статистически значимым различием уровней в моноцитах от пациентов группы «норма» и «РМЖ» с использованием базы данных KEGG

Название метаболического пути	Общее число участвующих метаболитов	Число метаболитов, совпавших с экспериментальными данными	$P$	$-\log(P)$	Влияние на путь
Биосинтез фенилаланина, тирозина и триптофана	4	1	0,015	1,812	0,5
Метаболизм глицина, серина и треонина	33	1	0,121	0,916	0,246
Метаболизм триптофана	41	1	0,149	0,827	0,143
Метаболизм тирозина	42	1	0,152	0,818	0,14
Метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата	32	1	0,118	0,929	0,106
Метаболизм цистеина и метионина	33	1	0,121	0,916	0,104
Метаболизм глутатиона	28	1	0,104	0,984	0,089
Метаболизм аргинина и пролина	38	1	0,139	0,858	0,078
Первичный биосинтез желчных кислот	46	1	0,166	0,781	0,008

**Таблица 4.** Метаболические пути, в которые вовлечены аминокислоты со статистически значимым отличием уровней в моноцитах от пациентов группы «норма» и «PMЖ» с использованием базы данных SMPDB

Название метаболического пути	Общее число участвующих метаболитов	Число метаболитов, совпавших с экспериментальными данными	<i>P</i>	$-\log(P)$	Влияние на путь
Метаболизм аспартата	34	1	0,158	0,802	0,25
Метаболизм фенилаланина и тирозина	25	1	0,118	0,928	0,221
Метаболизм глутатиона	19	1	0,091	1,042	0,061
Метаболизм глицина и серина	50	2	0,022	1,66	0,048
Переработка аммиака	25	2	0,006	2,249	0,033
Метаболизм метионина	39	1	0,179	0,747	0,009

сравнение данных, полученных с помощью ЖХ-МС, методом Уилкоксона–Манна–Уитни. Статистически значимые различия уровней метаболитов обнаружены для глицина ( $p$ -value = 0,0127), аспарагина ( $p$ -value = 0,0197), пролина ( $p$ -value = 0,0159), метионина ( $p$ -value = 0,0357), триптофана ( $p$ -value = 0,0028), тирозина ( $p$ -value = 0,0127) (рис. 1).

Для аминокислот, уровни которых статистически значимо различались между моноцитами групп «норма» и «PMЖ» был выполнен биоинформатический анализ метаболических путей с их участием. Анализ проводили с использованием ресурса MetaboAnalyst. В результате были определены биологические сети, которые потенциально могут быть вовлечены в изменение фенотипа моноцитов под воздействием PMЖ. В ходе анализа данных, представленных в базе KEGG и SMPDB (табл. 3, 4), были выявлены пути, упорядоченные по уровням значимости (анализ обогащения путей — ось ординат на рис. 2) и значениями влияния рассматриваемых метаболитов на путь (анализ топологии пути — ось абсцисс на рис. 2). Цвет узла соответствует уровню значимости, а радиус узла коррелирует с величиной влияния на путь. Влияние на путь рассчитывали как сумму показателей значимости соответствующих метаболитов, деленную на сумму показателей значимости всех метаболитов в каждом пути. Оценку обогащения метаболических путей выполняли с помощью анализа избыточного представления

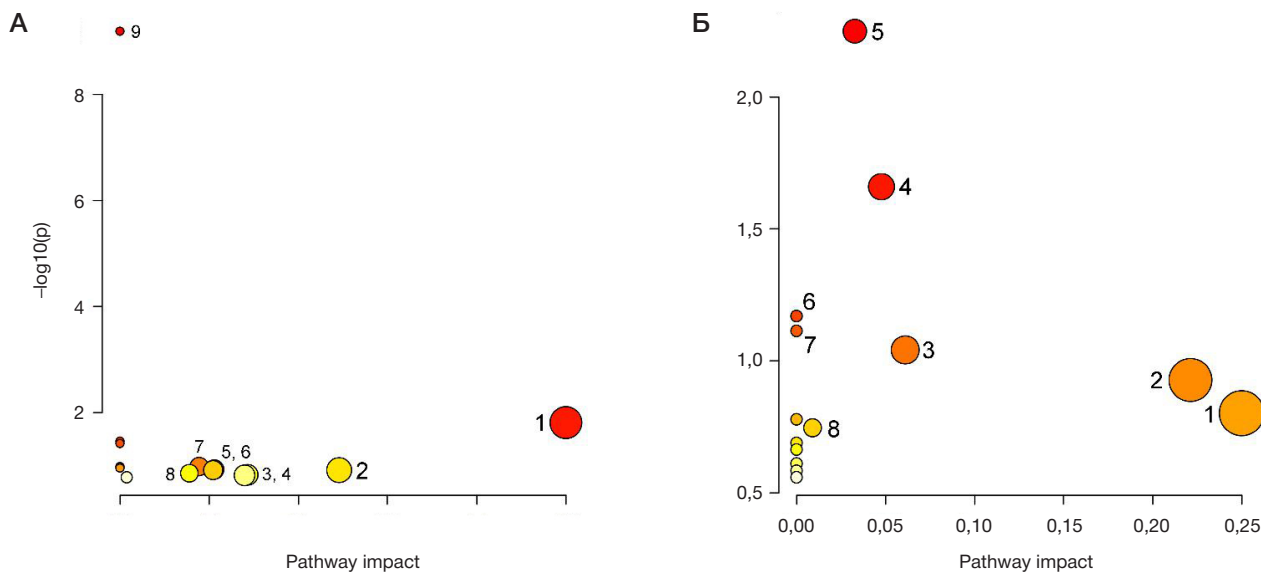
(Over representation analysis, ORA) с использованием гипергеометрического теста.

Для проверки возможности диагностики PMЖ по уровням аминокислот в моноцитах были разработаны модели логистической регрессии по каждой из значимых аминокислот (рис. 3А), а также рассмотрены модели с использованием комбинации аминокислот и выбраны четыре с наибольшим значением площади под операционной кривой (AUC) по результатам ROC-анализа (рис. 3Б). В табл. 5 приведены результаты оценки качества моделей, построенных на одной аминокислоте. Модели, построенные на комбинации аминокислот, характеризовались AUC = 1 и 100%-й чувствительностью и специфичностью (рис. 3Б).

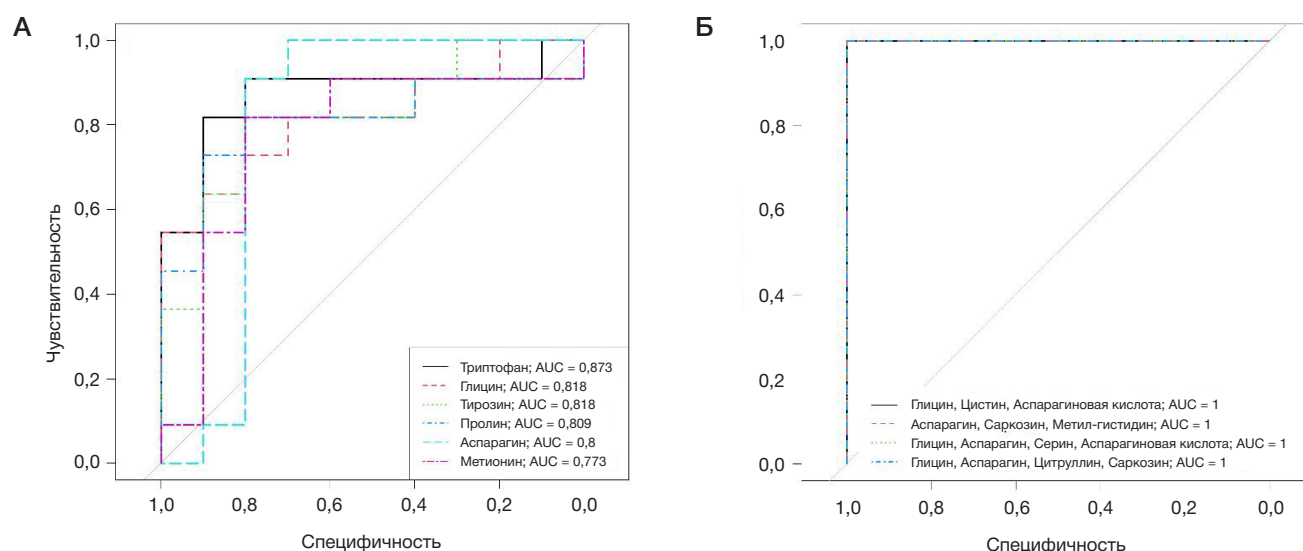
#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из 26 проанализированных аминокислот уровни шести статистически значимо различались между моноцитами, взятыми у здоровых доноров и пациентов с PMЖ. Из этих шести аминокислот особый интерес представляют глицин, триптофан и аспарагин, поскольку нарушения связанных с ними метаболических путей ассоциируют с изменениями, вызванными опухолевыми процессами [11, 13, 14, 18, 27, 31].

Доступность в течение определенного времени незаменимой аминокислоты триптофана является важным фактором, определяющим силу и качество иммунного



**Рис. 2.** Результат анализа метаболических путей, в которые вовлечены аминокислоты со статистически значимым различием уровней в моноцитах от пациентов группы «норма» и «PMЖ». **А.** Анализ с использованием базы данных KEGG: 1 — биосинтез фенилаланина, тирозина и триптофана; 2 — метаболизм глицина, серина и треонина; 3 — метаболизм триптофана; 4 — метаболизм тирозина; 5 — метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата; 6 — метаболизм цистеина и метионина; 7 — метаболизм глутатиона; 8 — метаболизм аргинина и пролина; 9 — биосинтез аминокислот-тРНК. **Б.** Анализ с использованием базы данных SMPDB: 1 — метаболизм аспартата; 2 — метаболизм фенилаланина и тирозина; 3 — метаболизм глутатиона; 4 — метаболизм глицина и серина; 5 — рециркуляция аммиака; 6 — метаболизм аланина; 7 — синтез карнитина; 8 — метаболизм метионина



**Рис. 3.** ROC-кривые моделей логистической регрессии, в которой в качестве независимой переменной выступали уровни аминокислот в моноцитах, в качестве зависимой переменной — принадлежность образца к группе «норма» или «РМЖ». На вставках указаны аминокислоты, уровни которых взяты в качестве независимой переменной, а также площадь под операционной кривой для соответствующей модели логистической регрессии. ROC-кривые построены по результатам анализа каждой из статистически значимо различающихся аминокислот (А), а также комбинации аминокислот (Б)

ответа. Пролiferация и активация Т-клеток человека были сильно подавлены в средах, не содержащих триптофан, по сравнению с обычными питательными средами [32, 33]. Раковые клетки, ОАМ и ассоциированные с раком фибробласты могут снижать уровень триптофана за счет ферментативной активности индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) [13]. ОАМ, а иногда и сами опухолевые клетки, повышают уровень IDO и создают иммуносупрессивную микросреду с помощью, по меньшей мере, двух механизмов: истощения триптофана и накопления катаболитов триптофана, таких как кинуренин, 3-гидроксиантранилат и хинолинат [34, 35]. Истощение триптофана ингибирует распространение активированных Т-клеток, а катаболиты, полученные из триптофана, действуют как лиганды рецепторов ароматических углеводов [36]. Кинуренин является супрессором Т-клеточного иммунитета. Стимулируя рецепторы ароматических углеводов, он направляет дифференцировку наивных Т-клеток в сторону регуляторных Т-клеток и подавляет дифференцировку Th17-клеток [22, 37].

Биосинтез серина, глицина и метаболитов одноуглеродных фрагментов имеют решающее значение для поддержания выживания и пролиферации раковых клеток и обладают высокой клинической значимостью. Чрезмерная активация биосинтеза серина и глицина приводит к онкогенезу, обеспечивая субстрат для одноуглеродного метаболизма. Одноуглеродный метаболизм, представляющий собой циклическую метаболическую сеть, основанную на химической реакции соединений фолиевой кислоты, обеспечивает необходимые белки, нуклеиновые кислоты, липиды и

другие биологические макромолекулы для поддержки роста опухоли [31].

Было обнаружено, что аспарагин может влиять на рост раковых клеток [38], что привело к использованию бактериального фермента L-аспарагиназы для ограничения доступности аспарагина [14, 39]. Значительные усилия прилагаются к разработке средств для истощения других аминокислот и воздействия на центральные метаболические пути, регуляция которых нарушена в раковых клетках, включая гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и липогенез. Многие из этих препаратов все еще находятся на доклинических стадиях, однако некоторые в настоящее время проходят оценку в ходе клинических испытаний [14].

## Выводы

В результате данного исследования было выявлено шесть аминокислот, уровни которых статистически значимо различаются в моноцитах пациентов с раком молочной железы от моноцитов здоровых доноров. Статистически значимые различия уровней метаболитов обнаружены для глицина ( $p$ -value = 0,0127), аспарагина ( $p$ -value = 0,0197), пролина ( $p$ -value = 0,0159), метионина ( $p$ -value = 0,0357), триптофана ( $p$ -value = 0,0028), тирозина ( $p$ -value = 0,0127). В результате биоинформатического анализа метаболических путей с участием задействованных аминокислот были определены биологические сети, которые потенциально могут быть вовлечены в изменение фенотипа моноцитов под воздействием РМЖ. Обнаруженные

**Таблица 5.** Характеристики моделей логистической регрессии, позволяющих прогнозировать РМЖ по содержанию отдельных аминокислот, уровни которых в моноцитах статистически значимо различаются между группой «норма» и «РМЖ»

Аминокислоты	AUC	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность	Положительная предсказательная ценность
Триптофан	0,87	0,53	0,91 (0,55; 1)	0,9 (0,7; 1)	0,92 (0,77; 1)
Глицин	0,82	0,74	0,73 (0,36; 1)	1 (0,6; 1)	1 (0,71; 1)
Тирозин	0,82	0,46	0,82 (0,45; 1)	0,9 (0,5; 1)	0,9 (0,67; 1)
Пролин	0,81	0,57	0,82 (0,45; 1)	0,9 (0,7; 1)	0,91 (0,73; 1)
Аспарагин	0,8	0,45	1 (0,82; 1)	0,8 (0,5; 1)	0,85 (0,69; 1)
Метионин	0,77	0,51	0,82 (0,55; 1)	0,8 (0,5; 1)	0,83 (0,67; 1)

изменения содержания аминокислот в моноцитах могут свидетельствовать о влиянии опухолевых процессов не только на микроокружение, но и опосредованно на отдаленных участников иммунной системы. На

основании найденных различий была предложена модель, обладающая 100%-й специфичностью и чувствительностью, позволяющая диагностировать РМЖ по аминокислотному профилю моноцитов.

## Литература

- Kzhyshkowska J, Gudima A, Moganti K, Gratchev A, Orekhov A. Perspectives for Monocyte/Macrophage-Based Diagnostics of Chronic Inflammation. *Transfus Med Hemotherapy*. 2016; 43 (2): 66–77.
- Nikitina E, Larionova I, Choinzonov E, Kzhyshkowska J. Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (9). DOI: 10.3390/ijms19092821.
- Patysheva M, Larionova I, Stakheyeva M, Grigoryeva E, Iamshchikov P, Tarabanovskaya N, et al. Effect of Early-Stage Human Breast Carcinoma on Monocyte Programming. *Front Oncol*. 2022; 11 (February): 1–12.
- Matuschik L, Riabov V, Schmuttermaier C, Sevastyanova T, Weiss C, Klüter H, et al. Hyperglycemia Induces Inflammatory Response of Human Macrophages to CD163-Mediated Scavenging of Hemoglobin-Haptoglobin Complexes. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (3): 1–19.
- Patysheva M, Frolova A, Larionova I, Afanas'ev S, Tarasova A, Cherdyntseva N, et al. Monocyte programming by cancer therapy. *Front Immunol*. 2022; 13 (October): 1–21.
- Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011; 475 (7355): 222–5.
- Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science* (80- ). 2015; 350 (6263): 985–90.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11 (11): 762–74.
- Engblom C, Pfirschke C, Pittet MJ. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16 (7): 447–62.
- Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: Energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5 (11): 844–52.
- Andrejeva G, Rathmell JC. Similarities and Distinctions of Cancer and Immune Metabolism in Inflammation and Tumors. *Cell Metab*. 2017; 26 (1): 49–70.
- Bauer DE, Harris MH, Plas DR, Lum JJ, Hammerman PS, Rathmell JC, et al. Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *FASEB J*. 2004; 18 (11): 1303–5.
- Leone RD, Powell JD. Metabolism of immune cells in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20 (9): 516–31.
- Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Heiden MG Vander, Locasale JW. Metabolomics in Cancer Research and Emerging Applications in Clinical Oncology. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71 (4): 333–58.
- Odom JD, Sutton VR. Metabolomics in Clinical Practice: Improving Diagnosis and Informing Management. *Clin Chem*. 2021; 67 (12): 1606–17.
- Clish CB. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Mol Case Stud*. 2015; 1 (1): a000588.
- Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15 (7): 473–84.
- Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolari T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol*. 2019; 10 (JULY): 1–16.
- Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*. 2012; 3 (3): 271–9.
- Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, van der Velden S, Neele AE, van den Berg SM, et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep*. 2016; 17 (3): 684–96.
- Qualls JE, Subramanian C, Rafi W, Smith AM, Defreitas AA, Shirey KA, et al. Sustained generation of nitric oxide and control of mycobacterial infection requires argininosuccinate synthase 1. *Cell Host Microbe*. 2012; 12 (3): 313–23.
- Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В., редакторы. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018; 250 с.
- Cassetta L, Pollard JW. Repolarizing macrophages improves breast cancer therapy. *Cell Res*. 2017; 27 (8): 963–4.
- Kuang DM, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu C, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med*. 2009; 206 (6): 1327–37.
- De Sanctis F, Adamo A, Canè S, Ugel S. Targeting tumour-reprogrammed myeloid cells: the new battleground in cancer immunotherapy. *Semin Immunopathol*. 2022; (0123456789). DOI: 10.1007/s00281-022-00965-1.
- Nguyen PHD, Wasser M, Tan CT, Lim CJ, Lai HLH, Seow JJW, et al. Trajectory of immune evasion and cancer progression in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 1–13.
- Zhu Y, Li X, Wang L, Hong X, Yang J. Metabolic reprogramming and crosstalk of cancer-related fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13 (August): 1–26.
- Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdyntseva N, Pavlov V, et al. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol*. 2020; 10 (October): 1–34.
- Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2019; 8 (7): 1–15.
- Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol*. 2019; 106 (2): 309–22.
- Pan S, Fan M, Liu Z, Li X, Wang H. Serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer (Review). *Int J Oncol*. 2021; 58 (2): 158–70.
- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*. 2005; 22 (5): 633–42.
- Munn BDH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage. 1999; 189 (9): 1363–72.
- Platten M, Wick W, Van Den Eynde BJ. Tryptophan catabolism in cancer: Beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res*. 2012; 72 (21): 5435–40.
- Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*. 2003; 81 (4): 247–65.
- Opitz CA, Litzenger UM, Sahn F, Ott M, Tritschler I, Trump S, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011; 478 (7368): 197–203.
- Stephens GL, Wang Q, Swerdlow B, Bhat G, Kolbeck R, Fung M. Kynurenine 3-monooxygenase mediates inhibition of Th17 differentiation via catabolism of endogenous aryl hydrocarbon receptor ligands. *Eur J Immunol*. 2013. 43 (7): 1727–34. DOI: 10.1002/eji.201242779.
- REN, TA M. Dual Requirement of Walker Carcinoma 256 in vitro for Asparagine and Glutamine. *Science*. 1956; 124 (3212): 124–5.
- Clavell LA, Gelber RD, Cohen HJ, Suzanne Hitchcock-Bryan RN, Cassady JR, Tarbel NJ, et al. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1986; 315: 657–63.

## References

- Kzhyskowska J, Gudima A, Moganti K, Gratchev A, Orekhov A. Perspectives for Monocyte/Macrophage-Based Diagnostics of Chronic Inflammation. *Transfus Med Hemotherapy*. 2016; 43 (2): 66–77.
- Nikitina E, Larionova I, Choinzonov E, Kzhyskowska J. Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (9). DOI: 10.3390/ijms19092821.
- Patysheva M, Larionova I, Stakheyeva M, Grigoryeva E, Iamshchikov P, Tarabanovskaya N, et al. Effect of Early-Stage Human Breast Carcinoma on Monocyte Programming. *Front Oncol*. 2022; 11 (February): 1–12.
- Matuschik L, Riabov V, Schmuttmaier C, Sevastyanova T, Weiss C, Klüter H, et al. Hyperglycemia Induces Inflammatory Response of Human Macrophages to CD163-Mediated Scavenging of Hemoglobin-Haptoglobin Complexes. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (3): 1–19.
- Patysheva M, Frolova A, Larionova I, Afanas'ev S, Tarasova A, Cherdyntseva N, et al. Monocyte programming by cancer therapy. *Front Immunol*. 2022; 13 (October): 1–21.
- Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011; 475 (7355): 222–5.
- Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science (80- )*. 2015; 350 (6263): 985–90.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11 (11): 762–74.
- Engblom C, Pfirschke C, Pittet MJ. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16 (7): 447–62.
- Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: Energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5 (11): 844–52.
- Andrejeva G, Rathmell JC. Similarities and Distinctions of Cancer and Immune Metabolism in Inflammation and Tumors. *Cell Metab*. 2017; 26 (1): 49–70.
- Bauer DE, Harris MH, Plas DR, Lum JJ, Hammerman PS, Rathmell JC, et al. Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *FASEB J*. 2004; 18 (11): 1303–5.
- Leone RD, Powell JD. Metabolism of immune cells in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20 (9): 516–31.
- Schmidt DR, Patel3 R, Kirsch DG, Lewis5 CA, Heiden MG Vander, Locasale4 JW. Metabolomics in Cancer Research and Emerging Applications in Clinical Oncology. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71 (4): 333–58.
- Odom JD, Sutton VR. Metabolomics in Clinical Practice: Improving Diagnosis and Informing Management. *Clin Chem*. 2021; 67 (12): 1606–17.
- Clish CB. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Mol Case Stud*. 2015; 1 (1): a000588.
- Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15 (7): 473–84.
- Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol*. 2019; 10 (JULY): 1–16.
- Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*. 2012; 3 (3): 271–9.
- Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, van der Velden S, Neele AE, van den Berg SM, et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep*. 2016; 17 (3): 684–96.
- Qualls JE, Subramanian C, Rafi W, Smith AM, Defreitas AA, Shirey KA, et al. Sustained generation of nitric oxide and control of mycobacterial infection requires argininosuccinate synthase 1. *Cell Host Microbe*. 2012; 12 (3): 313–23.
- Kaprin AD, Starinskij VV, Petrova GV, redaktory. *Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2017 godu (zabolevaemost' i smertnost')*. M.: MNIOI im. P. A. Gercena — filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii, 2018; 250 s. Russian.
- Cassetta L, Pollard JW. Repolarizing macrophages improves breast cancer therapy. *Cell Res*. 2017; 27 (8): 963–4.
- Kuang DM, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu C, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med*. 2009; 206 (6): 1327–37.
- De Sanctis F, Adamo A, Canè S, Ugel S. Targeting tumour-reprogrammed myeloid cells: the new battleground in cancer immunotherapy. *Semin Immunopathol*. 2022; (0123456789). DOI: 10.1007/s00281-022-00965-1.
- Nguyen PHD, Wasser M, Tan CT, Lim CJ, Lai HLH, Seow JJW, et al. Trajectory of immune evasion and cancer progression in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 1–13.
- Zhu Y, Li X, Wang L, Hong X, Yang J. Metabolic reprogramming and crosstalk of cancer-related fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13 (August): 1–26.
- Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdyntseva N, Pavlov V, et al. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol*. 2020; 10 (October): 1–34.
- Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyskowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncimmunology*. 2019; 8 (7): 1–15.
- Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol*. 2019; 106 (2): 309–22.
- Pan S, Fan M, Liu Z, Li X, Wang H. Serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer (Review). *Int J Oncol*. 2021; 58 (2): 158–70.
- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*. 2005; 22 (5): 633–42.
- Munn BDH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage. 1999; 189 (9): 1363–72.
- Platten M, Wick W, Van Den Eynde BJ. Tryptophan catabolism in cancer: Beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res*. 2012; 72 (21): 5435–40.
- Moffett JR, Nambodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*. 2003; 81 (4): 247–65.
- Opitz CA, Litztenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011; 478 (7368): 197–203.
- Stephens GL, Wang Q, Swerdlow B, Bhat G, Kolbeck R, Fung M. Kynurenine 3-monooxygenase mediates inhibition of Th17 differentiation via catabolism of endogenous aryl hydrocarbon receptor ligands. *Eur J Immunol*. 2013. 43 (7): 1727–34. DOI: 10.1002/eji.201242779.
- RE N, TA M. Dual Requirement of Walker Carcinosarcoma 256 in vitro for Asparagine and Glutamine. *Science*. 1956; 124 (3212): 124–5.
- Clavell LA, Gelber RD, Cohen HJ, Suzanne Hitchcock-Bryan RN, Cassady JR, Tarbel NJ, et al. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1986; 315: 657–63.