

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства
здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

На правах рукописи

Филина Александра Борисовна

**РОЛЬ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В
ПРОЦЕССЕ ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЯ**

14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

академик РАН,
профессор, д.б.н.
Зверев Виталий
Васильевич

член – корр. РАН, д.м.н,
директор ФГБНУ НИИВС
им.И.И.Мечникова
Свитич Оксана
Анатольевна

Москва - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. РОЛЬ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ И TLRs В ОНКОЛОГИИ.....	10
1.1. Негативная роль TLRs в онкогенезе.....	12
1.2. TLRs – противоопухолевое действие.....	16
1.3. Роль TLRs в остром миелоидном лейкозе	19
1.4. Роль хемокинов в развитии онкологического процесса.....	22
1.5. Хемокины в ангиогенезе.....	25
1.6. Хемокины в метастазировании.....	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	38
2.1. Характеристика клеточных линий и клинических групп.....	38
2.2. Материалы	40
2.3. Методы.....	40
2.3.1. Ведение клеточных культур	40
2.3.2. Выделение МНК от пациентов	40
2.3.3. Определение жизнеспособности клеток	41
2.3.4. Исследование хемотаксиса клеток	41
2.3.5. Выделение РНК	41
2.3.6. Реакция обратной транскрипции.....	42
2.3.7. Проведение ПЦР-РВ	42
2.3.8. Статистический анализ данных	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	46
3.1. Хемотаксис клеток опухолевых линий Reh и K562 к DNA_lig....	46
3.2. Хемотаксис клеток опухолевых линий Reh и K562 к CXCL12....	50
3.3. Экспрессия гена CXCL12 в клетках K562.....	54
3.4. Хемотаксис моноклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров и от пациентов с острым миелоидным лейкозом до и после химиотерапии.....	56
3.5. Экспрессия генов CXCL12, CCR4, EGFR, TLR9 в	

моноклеарных клетках, выделенных от здоровых доноров и пациентов с острым миелоидным лейкозом до и после химиотерапии.....	64
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	77
ВЫВОДЫ.....	80
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	81
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	82

ВВЕДЕНИЕ

Открытие таких факторов врожденного иммунитета как хемокины, а также Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors - TLRs) стало важнейшей вехой в истории иммунологии и смежных специальностей [4]. С середины XX века постепенно нарастало количество исследований, посвященных вышеописанным факторам. Хемотаксис, основными участниками которого являются хемокины и их рецепторы, представляет из себя физиологический процесс, участвующий в направленном движении клеток. TLRs, которые относятся к так называемым распознающим рецепторам врожденного иммунитета (PPRs, pattern recognition receptors), также играют важнейшую роль в реакциях врожденного иммунитета и экспрессируются практически всеми клетками человеческого организма, в большей степени иммунными клетками. TLRs распознает определенные консервативные последовательности PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) и DAMPS (damage-associated molecular patterns) и является первой линией защиты в ответ на проникновение чужеродных патогенов [6].

Несмотря на большое количество научных исследований, посвященных роли данных структур в развитии иммунного ответа, только последние два десятилетия стали появляться данные о влиянии TLRs и хемокинов на развитие таких заболеваний, как аутоиммунные, онкологические и др.

Исследования последних лет выявили, что влияние TLRs может быть как опухоль – активирующим, так и опухоль – ингибирующим. Активация TLR4 и TLR2 приводит к активному прогрессированию опухоли, в то время как активация TLR3,5,7,9 в большинстве случаев - к снижению прогрессирования опухоли, однако есть данные, что в определенных видах опухолей активация данных рецепторов ведет к прогрессии. Таким образом, роль TLRs в опухолеобразовании до конца не исследована и требует более тщательного изучения.

Также при активации TLRs запускается ряд сигнальных путей, приводящих к продукции хемокинов, участвующих в хемотаксисе клеток, в том числе и

опухолевых. На сегодняшний день, по данным литературы известно, что хемотаксис активно участвует в иммунной инвазии, ангиогенезе и диссеминации опухолевых клеток. В иммунной инвазии работают такие хемокины, как CCL2, CCL5, CCL2, CCL4, CCL17, CCL22 и CXCL12; в ангиогенезе - CXCL1, CXCL2, CXCL8; в метастазировании – CXCL12, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8. Однако до конца не понятны отрицательные и положительные функции хемотаксиса и его компонентов в опухолеобразовании.

Несмотря на большой интерес к данной проблеме, существует достаточно большое количество исследований, направленных лишь на один из вышеперечисленных факторов, в то время как взаимовлияние их друг на друга не были изучены. Также в проведенных работах не учитывается возможность аутоактивации опухолевых клеток за счет выработки хемокинов или повышенной экспрессии TLRs самими клетками.

Таким образом, для понимания миграции опухолевых клеток недостаточно исследований по влиянию одного фактора врожденного иммунитета на хемотаксис опухолевых клеток, в связи с чем необходимо изучить возможность TLR-опосредованного хемотаксиса, CXCL12 – опосредованный хемотаксис, CXCL12 – опосредованную экспрессию TLRs и гетерологичных хемокиновых рецепторов, что может менять ответ на один и тот же хемокин в различных условиях.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния CXCL12 и лиганда TLR9 на хемотаксис опухолевых клеток, а также на экспрессию генов CXCL12, CCR4, EGFR и TLR9.

Задачи исследования

1. Исследовать спонтанный и индуцированный хемотаксис клеток опухолевых линий (K562, Reh).
2. Изучить спонтанный и индуцированный хемотаксис МНК здоровых доноров.

3. Исследовать хемотаксис МНК, выделенных от пациентов с острым миелоидным лейкозом (М4) до химиотерапии и после химиотерапии, через три недели после окончания первого курса, по направлению к CXCL12 и DNA_lig.
4. Изучить экспрессию генов CXCL12, CCR4, EGFR и TLR9 в интактных и мигрировавших клетках.

Положения, выносимые на защиту

1. Создана модель, которая позволяет оценить спонтанный и индуцированный хемотаксис опухолевых клеток. Получены данные об ингибирующем действии лиганда TLR9 и стимулирующем действии CXCL12 на хемотаксис опухолевых клеток линий K562 и Reh.
2. Определена разнонаправленная динамика спонтанного и индуцированного хемотаксиса мононуклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров и от пациентов с острым миелобластным лейкозом до и после проводимой терапии.
3. Выявленный экспрессионный профиль хемокинов и рецепторов врожденного иммунитета показал значительное ингибирующее действие CXCL12 на экспрессию гена EGFR в клетках ОМЛ. Кроме того, продемонстрированы сниженный уровень хемотаксиса МНК пациентов с ОМЛ до химиотерапии по направлению к CXCL12 в связи с высокой экспрессией CXCL12, а также перекрестная активация экспрессии гена рецептора CCR4 у пациентов с ОМЛ до и после химиотерапии.

Научная новизна

Впервые показано, что миграция к хемокину CXCL12 зависит от уровня экспрессии CXCL12 в опухолевой клетке.

Выявлено, что влияние химиотерапии снижает уровень экспрессии CXCL12 опухолевыми клетками.

Впервые показано, что воздействие CXCL12 способствует экспрессии гетерологичного рецептора CCR4.

Впервые определено, что влияние CXCL12 на моноклеарные клетки, выделенные от пациентов с острым миелоидным лейкозом снижают экспрессию EGFR.

Впервые исследована миграция клеток клеточных линий K562, Reh, моноклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров, пациентов с ОМЛ до и после химиотерапии по направлению к DNA_lig.

Теоретическая и практическая значимость

Разработаны системы на основе ПЦР в режиме реального времени для количественного определения экспрессии генов CCR4, CXCL12.

Отработана схема исследования хемотаксиса опухолевых клеточных линий K562, Reh, моноклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров и пациентов с острым миелоидным лейкозом с использованием камеры Бойдена. А также подобраны оптимальные концентрации CXCL12 и DNA_lig для изучения хемотаксиса клеточных линий, моноклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров и пациентов с острым миелоидным лейкозом.

Представленная модель может быть использована для оценки хемотаксиса различных опухолевых клеток, полученные данные могут быть использованы для прогнозирования течения опухолевого процесса.

Апробация результатов

Апробация диссертации состоялась 30 апреля 2019 года на совместной научной конференции кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИВС им.И.И.Мечникова.

Внедрение результатов работы в практику

Полученные данные внедрены в курс обучения по направлению «Иммунология» на кафедре Микробиологии, вирусологии и иммунологии

Сеченовского Университета и на кафедре иммунологии МБФ РНИМУ им.Н.И. Пирогова.

Личное участие автора в получении результатов

Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе Филиной А.Б., получены ею самостоятельно на базе кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова и лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова в сотрудничестве с отделением клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского. Автором лично в полном объеме были выполнены все этапы диссертационного исследования: планирование, организация, подбор пациентов, лабораторная работа (выделение моноклеарных клеток, культивирование опухолевых клеток, исследование хемотаксиса, изучение экспрессии факторов врожденного иммунитета), статистическая обработка данных.

Автор выражает искреннюю признательность и благодарность руководителю клиники клинической гематологии и иммунотерапии профессору, доктору медицинских наук Голенкову Анатолию Константиновичу и заведующей отделением клинической гематологии и иммунотерапии Клинушкиной Елене Федоровне ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского за ценные советы и консультирование в области онкогематологии.

Соответствие паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют шифрам и формуле специальности: 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология. Результаты соответствуют по следующим областями исследований этой специальности: фундаментальные исследования, посвященные изучению строения, функционирования иммунной системы.

Публикации результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 4 работы в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, из них одна - в журнале индексируемом в базе Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста, иллюстрирована 4 таблицами и 20 рисунками, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращения, списка литературы.

Библиографический указатель включает 227 отечественных и зарубежных источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Роль хронического воспаления и TLRs в онкологии

Первое задокументированное предположение о связи между воспалением и онкологическим процессом принадлежит немецкому патологу Рудольфу Вирхову. Данная гипотеза, основанная на обнаружении ученым воспалительных инфильтратов в солидных злокачественных новообразованиях, получила значительную поддержку в последние десятилетия, что привело к признанию ассоциации хронического воспаления и онкологического процесса [66; 69; 91] .

На настоящий момент известно, что только около 10% всех видов онкологических заболеваний вызваны генеративными мутациями, остальные - приобретенными соматическими мутациями и влиянием факторов окружающей среды [82]. Во многих случаях развитие онкологии связано с хронической инфекцией, употребляемой пищи, вдыхаемыми поллютантами, употреблением табака или аутоиммунным воспалением. Объединяющим принципом, лежащим в основе этих процессов, является хроническое воспаление, которое является длительной формой защитного ответа на продолжительное изменение гомеостаза тканей [133].

На настоящий момент известно, что около 18% случаев онкологических заболеваний у человека связаны с инфекцией, а хроническое воспаление, вызываемое инфекцией, является важным фактором канцерогенеза [39;152]. Кроме того, повреждение тканей и травмы могут вызвать местное хроническое воспаление, которое также может являться причиной развития онкологического процесса [121].

Несмотря на то, что воспаление контролируется многочисленными иммунологическими процессами, некоторые системы врожденного иммунитета являются ключевыми регуляторами. Среди них известны так называемые «образ – распознающие рецепторы» – PRRs (pattern recognition receptors), которые распознают PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Известно, что PAMPs являются молекулами чужеродного происхождения. Также существуют молекулы

эндогенного происхождения – DAMPs (damage-associated molecular patterns), которые образуются при распаде структур и клеток организма [6]. Toll-подобные рецепторы (TLRs, toll-like receptors) являются наиболее изученными PRRs, распознающими PAMPs и DAMPs. PAMP-индуцированная активация TLRs запускает выработку провоспалительных цитокинов и интерферонов. Однако, если уничтожение патогенных микроорганизмов невозможно, они могут вызывать хроническое воспаление [63]. Важный вклад воспаления в канцерогенез лучше всего иллюстрируется высокой частотой колоректального рака при воспалительных заболеваниях кишечника, рака желудка у пациентов, инфицированных *H. pylori* [198]. Недавние исследования также показали, что TLRs-индуцированное воспаление может выступать в качестве промотора канцерогенеза в толстой кишке, печени, желудке и поджелудочной железе [43;56;148;149;200]. Также из данных литературы известно, что сигналы, запускаемые DAMPs могут стимулировать канцерогенез в зависимости от типа TLRs [103]. С другой стороны, воспалительные реакции могут не только обеспечивать образование опухоли, но также способствовать противоопухолевым иммунным реакциям [177;202]. Одним интересным аспектом, связывающим бактериальные PAMPs и противоопухолевые реакции, являются наблюдения, сделанные Бушем, Брунсом и Коли, о том, что бактериальные инфекции, связанные с *Streptococcus pyogenes* и *Serratia marcescens* («токсин Коли»), могут привести к регрессу опухоли, а иногда и излечению [25; 37;187]. Хотя механизмы представленных процессов остаются неясными, недавние достижения в биологии TLRs и клинические исследования с агонистами TLRs позволяют предположить, что активация TLRs действительно может иметь противоопухолевый эффект, позволяющий перенаправить иммунную толерантность в противоопухолевый иммунный ответ [58;65;74;201].

Сигналы с TLRs могут оказывать противо- или проопухолевое действие в зависимости от вида TLR, типа онкологии и иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль. В зависимости от выбранной модели опухоли, используемой в эксперименте, у одного и того же TLR выявлены различные функции. Стимуляция TLRs может оказывать противоопухолевые эффекты,

воздействуя на иммунные клетки или непосредственно на опухолевые клетки, тем самым активируя противоопухолевый иммунный ответ и / или приводя к апоптозу опухолевых клеток. Это явление было описано для разных TLRs в онкологии. С другой стороны, стимуляция TLRs может иметь проопухолевые эффекты. Большинство исследований, изучающих влияние TLRs на онкогенез, указывают на то, что вышеназванные противоопухолевые и опухольстимулирующие эффекты обусловлены непосредственной экспрессией TLRs опухолевыми клетками. Для большинства исследований, изучающих вышеназванные эффекты, этот эффект в основном обусловлен экспрессией TLRs самими опухолевыми клетками. Однако несколько исследований также показали проопухолевый эффект, связанный с гиперэкспрессией TLRs иммунными клетками [42].

1.1 Негативная роль TLRs в онкогенезе

TLRs являются ключевыми регуляторами воспалительной передачи сигналов, опосредованной MyD88-зависимыми и MyD88-независимыми путями. Одним из важных опухоль – стимулирующих сигнальных путей, индуцированных передачей сигналов с TLRs, является фактор транскрипции NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). NF-κB регулирует транскрипцию более чем 100 провоспалительных генов [62]. Передача сигналов с TLRs способствует выработке цитокинов, которые являются также опухольстимулирующими через NF-κB-зависимые пути, например таких как IL-1β, TNFα и IL-6 [12;16;66]. Эти цитокины по многочисленным данным могут способствовать прогрессии рака кишечника, печени, желудка и кожи.

Активация NF-κB также приводит к широкому спектру реакций, таких как предотвращение апоптоза, пролиферация и антиоксидантная защита [91;126]. Окислительный стресс, который обычно возникает в условиях хронического воспаления, может не только способствовать активации воспалительных сигнальных путей, участвующих развитию опухоли [143], но также изменять молекулярные структуры и приводить к образованию DAMPs [214].

Наиболее глубокий вклад TLR в канцерогенез наблюдается в органах, которые либо непосредственно подвергаются воздействию бактериальных

лигандов TLRs, таких как желудочно-кишечный тракт и кожа, либо косвенно подвергаются воздействию большого количества лигандов TLRs, таких как печень. Таким образом, опухоль - стимулирующая провоспалительная активация TLRs, по-видимому, запускается бактериальными PAMPs. Соответственно, у безмикробных животных наблюдается снижение канцерогенеза в печени и желудочно-кишечном тракте [42;119;165]. Однако в других органах, например поджелудочная железа, DAMPs может быть основным стимулом для TLR-зависимого канцерогенеза.

TLRs и адаптерные молекулы, являющиеся в значительной степени активаторами онкогенеза

TLR4

Опухоль – стимулирующие эффекты TLR4 лучше всего исследованы в толстом кишечнике, печени, поджелудочной железе и коже. В толстом кишечнике, где существует постоянное взаимодействие между кишечной микробиотой и эпителиальными клетками, делеция TLR4 сильно снижает воспаление и опухолевую нагрузку при колит-ассоциированной неоплазии с использованием модели AOM/DSS (azoxymethane (AOM)/dextran sulfate sodium (DSS); азоксиметан и сульфата натрия декстрана) [56]. Кроме того, у трансгенных мышей, конститутивно сверхэкспрессирующих TLR4 в кишечнике, с высокой частотой образуются колит-ассоциированные неоплазии [56]. Эти исследования согласуются с другими исследованиями, в которых либо делеция адапторной молекулы TLR4 MyD88, либо истощение кишечной микробиоты, которая поставляет активирующие TLR4 PAMPs, такие как LPS, снижают развитие рака толстой кишки [111;164]. У мышей с дефицитом TLR4 и MyD88 наблюдалось сильное снижение числа опухолей, вызванное двухэтапным химическим канцерогенезом [32;132]. Канцерогенез в коже зависит от TLR4, экспрессируемого миелоидными и эпителиальными клетками, и эндогенного лиганда TLR4 HMGB1 (high-mobility group protein B1). MyD88-зависимая активация канцерогенеза кожи зависит не только от TLRs, но и от передачи сигналов IL-1R [32]. Тот факт, что TLR4 играет защитную роль в

невоспалительной модели канцерогенеза кожи, предполагает, что влияние TLR4 на рак кожи зависит от условий активации [223]. В поджелудочной железе делеция TLR4 уменьшает рост опухоли, в то время как постоянное влияние LPS ускоряет прогрессирование рака [149]. В отличие от опухоли – стимулирующих воздействий при активации TLR4, описанных выше, активация TLR4 в легких и молочной железе ингибирует развитие рака: у мышей, экспрессирующих нефункциональный TLR4, наблюдается повышенная опухолевая нагрузка в модели рака легкого, вызванного 3-метилхолантеном [17]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять вклад TLR4 в развитие онкологических процессов в зависимости от органа. Можно предположить, что PAMPs, активирующие TLR4, действуют преимущественно как потенциальные опухолевые активаторы, тогда как DAMPs действуют как потенциальные опухолевые супрессоры.

TLR2

TLR2 может стимулировать или подавлять рост опухоли в зависимости от условий. Выраженный опухоль-стимулирующий эффект наблюдается при раке желудка. TLR2 имеет высокую экспрессию в образцах рака желудка человека и мыши [200]. В генетической мышинной модели рака желудка делеция TLR2 приводит к резкому снижению опухолевой нагрузки [200]. TLR2-опосредованная стимуляция рака желудка не зависит от клеток, происходящих из красного костного мозга, и опосредуется путями передачи сигналов пролиферации и выживания, включая PI3K / Akt, ERK1 / 2 и NF-κB в эпителиальном окружении опухоли [200]. При раке легкого активация TLR2 ведет к опухоль-стимулирующим эффектам и способствует метастазированию. Клетки рака легких секретируют компонент внеклеточного матрикса версикан, что приводит к версикан – опосредованной стимуляции TLR2 и продукции IL-6 и TNF в макрофагах и способствует метастазированию [94]. В печени TLR2 не влияет на гепатокарциногенез в условиях хронического повреждения [43]. Однако в генотоксической модели рака печени у мышей, нокаутированных по TLR2, наблюдается более высокая частота опухолей печени и более низкая

выживаемость [113]. Подобно роли TLR2 в онкогенезе клеток печени, роль TLR2 при колоректальном раке остается противоречивой. В одном исследовании не было различий между мышами дикого типа и TLR2-дефицитными мышами с колоректальным раком, вызванным AOM-DSS [172]. Напротив, в другом исследовании сообщалось об увеличении развития опухоли и более высоких уровнях IL-6, IL-17A и фосфо-STAT3 при колоректальном раке у мышей с дефицитом TLR2 при использовании аналогичной модели AOM-DSS [122]. TLR2 также может быть медиатором конечных продуктов окисления липидов, стимулирующих ангиогенез, таких как CEP (ω -(2-carboxyethyl) pyrrole). Эти продукты не только образуются во время воспаления и процессе заживления ран, но и накапливаются в васкуляризированных опухолях, таких как меланома, и индуцируют VEGF – независимый ангиогенный ответ, который зависит от активации TLR2 [214]. Роль TLR2 в канцерогенезе человека не совсем понятна. При раке желудка активация пути STAT3 и повышенная экспрессия TLR2 связаны с низкой выживаемостью [200]. Хотя полиморфизмы TLR2 были связаны с риском рака желудка и шейки матки [151;155], широкомасштабные подтверждающие исследования отсутствуют.

Молекулы адаптера и регуляторы сигнализации TLR

Фактор миелоидной дифференцировки 88 (MyD88) обеспечивает передачу сигналов большинства членов семейства TLR, а также рецепторов для IL-1 и IL-18. Мутация *L265P* в домене TIR мутаций MyD88 вызывала конститутивную активацию путей NF- κ B и JAK-STAT и увеличивала выживаемость злокачественных клеток, способствуя тем самым патогенезу диффузной крупной В-клеточной лимфомы и макроглобулинемии Вальденстрема [118;145;197]. И наоборот, делеция *MyD88* уменьшает канцерогенез во многих условиях, включая генетические и химические модели рака толстой кишки [144], химически индуцированный гепатокарциногенез [192] и химические модели кожной папилломы и фибросаркомы [124]. Делеция в гене *MyD88* приводит к агрессивному фиброинфламму, усилению Th2-ответов и глубоко ускоренный онкогенез в генетической модели рака поджелудочной железы [149]. В последней

модели канцерогенез обусловлен MyD88-независимым путем TRIF, что позволяет предположить, что делеция MyD88 может стимулировать опухоли за счет избыточной активации пути TRIF [149]

1.2 TLRs – противоопухолевое действие

TLR3

TLR3 преимущественно выполняет функцию подавления опухоли, в значительной степени опосредованную TLR3-зависимой стимуляцией противоопухолевого иммунитета. В связи с этим дефицит TLR3 приводит к развитию острого лимфобластного Т-клеточного лейкоза после инфицирования эндогенным ретровирусом [222]. На сингенных и ксенотрансплантатных моделях рака предстательной железы у мышей с дефицитом TLR3 выявляется повышенная скорость роста опухоли [35]. Наоборот, лечение агонистом TLR3 поли I:C ингибирует рост опухоли в генетической модели рака предстательной железы, сверхэкспрессирующей трансген TRAMP [35]. Системное введение поли I:C снижает скорость метастазирования меланомы [54]. При гепатоцеллюлярной карциноме существует положительная корреляция между экспрессией TLR3 и выживаемостью пациентов. Кроме того, лечение поли I:C увеличивало активацию NK-клеток и уменьшало рост опухолей печени в модели сингенного трансплантата [36]. Последовательно во всех моделях эффекты TLR3 опосредованы выработкой интерферона I типа и последующей активацией NK-клеток или DCs, а также NK- или DC-опосредованной гибелью опухолевых клеток. В отличие от вышеупомянутых исследований, также было высказано предположение, что TLR3 может способствовать развитию опухоли посредством воздействия на пролиферацию клеток и выживаемость [70;106].

TLR5

Большинство исследований, изучающих вклад TLR5 в развитие онкологических процессов, показали значительные противоопухолевые эффекты, согласующиеся с экспрессией и функцией TLR5 на DCs и их важную роль в

противоопухолевых иммунных реакциях. Эти эффекты лучше всего иллюстрируются в исследовании, где опухолевые клеточные линии, экспрессирующие агонист TLR5 - флагеллин, слиты с опухолевым антигеном, индуцированным DC-опосредованным противоопухолевым иммунным ответом [59]. В толстой кишке нокаут по генам *TLR5* или *MyD88* резко ускоряет рост и ингибирует некроз в ксенотрансплантатной модели [167]. Имплантация TLR5-негативных опухолевых клеток молочной железы приводит к ускоренному росту опухоли, в то время как агонист TLR5 флагеллин замедляет рост опухоли за счет увеличения гибели клеток и уменьшения пролиферации опухолевых клеток [28]. Однако использование иммунодефицитных мышей с отсутствием DCs, является важным ограничением вышеуказанных исследований. Следовательно, опухолевая супрессирующая функция TLR5 требует дополнительных исследований на мышах с полностью функциональной иммунной системой.

TLR7 / TLR8

TLR7 и TLR8 являются структурно родственными рецепторами для одноцепочечной РНК, TLR7 и 8 были предметом исследований в развитии онкологических процессов из-за выраженных иммуномодулирующих и противоопухолевых эффектов их низкомолекулярных агонистов [60;73;176;178]. Хотя имеются значительные данные о клиническом применении агонистов TLR7 / 8 для противоопухолевой терапии, относительно мало известно о вкладе эндогенной активации TLR7 / 8 в канцерогенез. Одно из недавних исследований продемонстрировало, что микроРНК, высвобождаемые из опухолей через экзосомы, связываются с TLR7 и 8 и способствуют метастатическому росту [52]. Данное исследование предполагает, что активация малыми концентрациями эндогенных агонистов TLR7 / 8 оказывает опухоль - стимулирующие эффекты. Агонисты TLR7 / 8 преимущественно используются для противоопухолевой терапии базальноклеточной карциномы и меланомы [176]. Противоопухолевые эффекты преимущественно опосредованы активацией TLR7 / 8 на DCs, что приводит к их рекрутированию, активации и способности уничтожать опухолевые клетки [83,85]. Кроме того, TLR7 / 8-активированный DCs также активирует NK-

клетки и подавляет Treg [104;159]. Несмотря на большое количество публикаций по противоопухолевым эффектам агонистов TLR7 / 8, недавние исследования предполагают потенциальную роль TLR7 / 8 в развитии опухолей при определенных условиях: при раке поджелудочной железы наблюдается не только высокая экспрессия TLR7 как в эпителиальных, но также ускорение образования онкологического процесса после активации TLR7 [148]. И наоборот, фармакологическое ингибирование TLR7 снижает рост опухолевых клеток рака поджелудочной железы. TLR7 оказывает свое влияние на рак поджелудочной железы в клетках зоны воспаления, поскольку у химерных мышей с отсутствием экспрессией TLR7 в клетках костномозгового происхождения, наблюдается снижение канцерогенеза [148]. В легких как TLR7, так и TLR8 экспрессируются на опухолевых клетках и способствуют выживанию клеточных линий рака легких посредством активации NF-κB и активизации Bcl-2 [34]. Как обсуждалось выше, TLR7 / 8-агонистические микроРНК способствуют росту опухоли легких [52]. Таким образом, эффекты TLR7 / 8 на канцерогенез могут зависеть от органа, стадии опухоли, типа клеток и роль, которую противоопухолевые иммунные ответы играют в конкретной опухоли. В свете потенциального клинического применения агонистов TLR7 / 8 для противоопухолевой терапии необходимы дальнейшие фармакологические и генетические исследования, чтобы понять, в каких органах и условиях передача сигналов TLR7 / 8 способствует развитию рака.

TLR9

TLR9 является рецептором для неметирированной CpG-ДНК, которая обычно определяется у вирусов и бактерий [101]. Подобно TLR7 / 8, TLR9 широко изучался с точки зрения его роли в иммунологическом надзоре и в качестве потенциальной мишени для противоопухолевой терапии с использованием синтетических агонистов TLR9. Вклад TLR9 в иммунологический надзор подчеркивается тем фактом, что дефицит TLR9 приводит к острой лимфобластной Т-клеточной лейкемии после инфицирования эндогенной ретровирусной инфекцией [222]. Эти данные свидетельствуют о том,

что TLR9 может быть особенно актуален для вирус-индуцированных опухолей. И наоборот, активация TLR9 синтетическими CpG-ODN (oligodeoxynucleotide agonists; олигодезоксинуклеотидные агонисты) продемонстрировала противоопухолевую активность в ксенотрансплантатных моделях рака шейки матки мыши, нейробластомы и рака толстой кишки [14;23;31;72]. Аналогичным образом, комбинация агонистов TLR9 с siPHK Stat3 в одной молекуле стимулирует противоопухолевые ответы против подкожно имплантированных клеток меланомы, в то же время подавляя опосредованную Stat3 иммуносупрессию в TME (tumor microenvironment, опухолевое микроокружение) [100]. CpG-ODN изучаются в качестве монотерапии онкологических заболеваний, так и в комбинации с лучевой терапией и цитотоксической химиотерапией [101].

Агонисты TLR9 индуцируют секрецию интерферона I типа в DCs, что приводит к образованию цитотоксическому ответу DCs, активации NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, которые способствуют противоопухолевому иммунному ответу [15;71;86]. Помимо экспрессии иммунными клетками, TLR9 также экспрессируется на опухолевых клетках многих тканей [78,183], но функция TLR9 на опухолевых клетках *in vivo* в настоящее время не известна. Поскольку возможно, что стимуляция TLR9 может зависеть от клеток и условий активации и, возможно, вносить вклад в выживание или пролиферацию опухолевых клеток, необходимы дополнительные исследования на мышах с дефицитом TLR9 для изучения функциональной роли TLR9 в канцерогенезе *in vivo* [48;134;166].

1.3 Роль TLRs в остром миелоидном лейкозе

В отличие от солидных опухолей, клетки острого миелоидного лейкоза являются предшественниками миелоцитов и монобластов. Они могут дифференцироваться в моноциты, макрофаги и DCs (далее ОМЛ-DCs) после индукции. Такая индуцированная дифференцировка может быть усилена активацией TLR4, TLR7 и TLR8. Исследования *in vitro* показали, что агонисты TLR4 и TLR7 / 8 синергически облегчают дифференцировку бластов ОМЛ в активированные ОМЛ-DCs. ОМЛ-DCs экспрессируют поверхностные маркеры

DCs (например, CD40, CD86, CD1a, CD83, CCR7), предоставляя опухолевые лейкозные антигены и стимулируя активацию специфических для клеток ОМЛ цитотоксических Т-лимфоцитов [108;147;225].

Недавнее исследование показало, что агонист TLR7 / TLR8 R848 значительно рост клеток ОМЛ человека у иммунодефицитных мышей [79]. Эти исследования предполагают, что использование определенных агонистов TLRs может быть одним из вариантов лечения ОМЛ в сочетании с DC-индуцирующими цитокинами, что ведет к усилению дифференцировки DCs. ОМЛ-DCs могут дополнительно усиливать противоопухолевую активность относительно ОМЛ путем активации опосредованного Т-клетками адаптивного иммунного ответа. Тем не менее, такие методы лечения должны быть тщательно отобраны и оценены в будущих исследованиях, так как: ОМЛ-DCs могут все еще сохранять некоторые злокачественные признаки клеток ОМЛ; остается неизвестным могут ли ОМЛ-DCs индуцировать Т-клеточный ответ против ОМЛ *in vivo*; конкретные агонисты TLRs могут индуцировать пролиферацию и выживание клеток ОМЛ. Эффекты стимуляции или ингибирования TLRs на клетках ОМЛ должны быть тщательно изучены, чтобы определить потенциальную терапевтическую полезность.

Несмотря на то, что мутации TLRs и MyD88 не были обнаружены у пациентов с ОМЛ [81], повышенная экспрессия и активация TLR-MyD88 и IRAK достаточно часто выявляются в клетках ОМЛ, в основном в образцах от пациентов с диагнозом подтипов М4 и М5. (Каннова и др., неопубликованные данные). Функция TLR-MyD88 в патогенезе ОМЛ остается до конца не ясной. Большинство клеток ОМЛ, экспрессирующих TLRs, также экспрессируют высокие уровни провоспалительных цитокинов, таких как TNF α и IL-1 α / β . Как агонисты TLRs, так и провоспалительные цитокины стимулируют как NF- κ B, так и JNK-AP1, что, в свою очередь, способствует выживанию и пролиферативной передаче сигналов в клетках ОМЛ. Однако блокировка провоспалительных цитокинов и стимулируемая TLRs передача сигналов ингибирует только передачу сигналов JNK-AP1 без полной репрессии активности NF- κ B, поскольку почти все гематопоетические цитокины могут стимулировать NF- κ B в клетках ОМЛ.

Интересно, что провоспалительные цитокины индуцируют JNK-зависимый апоптоз / некроптоз в нормальных HSPC (hematopoietic stem and progenitor cells).

J. Cannova и соавторами показали, что инактивация сигнала TNF / IL1 / TLR-JNK вместе с обработкой ингибитором NF-κB может улучшить терапевтические показатели лечения для подтипов ОМЛ М4 и М5, усиливая цитотоксические эффекты на клетки ОМЛ и одновременно обеспечивая защиту HSPCs [117; 205]. Также в вышеназванном исследовании было показано, что большинство образцов МДС (MDS, myelodysplastic syndromes; миелодиспластический синдром) из исследования Rhyasen et al. были высокочувствительны к лечению ингибитором IRAK. Однако большинство клеток ОМЛ устойчивы к ингибированию IRAK1 благодаря компенсации, обеспечиваемой экспрессией BCL2, главного антиапоптотического гена-мишени NF-κB [144]. Совместная обработка клеток МДС или ОМЛ ингибитором IRAK1 с АВТ-263 (ингибитор Bcl2) синергически ингибирует пролиферацию клеток, функцию предшественников и выживание [168]. Активация передачи сигналов с TLRs в первую очередь опосредуется стимуляцией продукции провоспалительных цитокинов TNF, IL-1 и IL-6.

На настоящий момент функция передачи сигналов с TLRs в патогенезе ОМЛ остается в значительной степени неизвестной. Ранее мы описывали результаты исследований солидных опухолей, которые показали, что передача сигналов с TLRs может индуцировать либо супрессирующую либо активирующую активность на опухолевую прогрессию. TLR стимулируют рост опухоли, стимулируя пролиферативную и выживающую передачу сигналов в раковых клетках, а также индуцируя опухолевую воспалительную среду. Таким образом для определения роли TLRs, находящихся непосредственно на самих опухолевых клетках как солидных опухолей, так и лейкозов необходимо проведение дальнейших исследований как *in vitro*, так и *in vivo*.

1.4 Роль хемокинов в развитии онкологического процесса

Ранее было упомянуто, что активация PPRs, в частности TLRs ведет к выработке провоспалительных цитокинов, важнейшими из которых являются хемокины, так как участвуют в ангиогенезе опухоли и метастазировании опухолевых клеток. Хроническое воспаление в тканях способствует активации TLRs, что в свою очередь активирует факторы транскрипции, таких как NF- κ B, STAT-3, HIF-1 и др., приводящих к экспрессии провоспалительных цитокинов, в частности хемокинов [205].

Хемокины представляют собой семейство низкомолекулярных структурно родственных белков, которые связываются с хемокиновыми рецепторами, связанных с гетеротримерными G-белками. На настоящий момент у людей известно около 50 хемокинов и 20 хемокиновых рецепторов. Хемокиновая система признана основной группой белков, которые способствуют перемещению лейкоцитов и в меньшей степени других клеток в / из лимфоидных органов и тканей в условиях гомеостаза и патологического состояния внутренней среды организма [205]. Временная и пространственная регуляция перемещения лейкоцитов важна для эффективного ответа на чужеродные антигены и другие повреждающие агенты. Нарушенная регуляция экспрессии хемокинов или рецепторов хемокинов также является основным фактором, лежащим в основе хронического воспаления и онкогенеза [38]. Опухоли представляются как «органы», состоящие из различных типов клеток, которые взаимодействуют друг с другом. Эволюция в опухолях зависит от взаимодействия между опухолевыми клетками и стромальными клетками, которые включают в себя эндотелиальные и иммунные клетки. Хемокины являются важным компонентом перекрестной связи между различными типами клеток в микроокружении опухоли; они не только регулируют миграцию лейкоцитов в опухоль, но также воздействуют на опухолевые клетки и на другие компоненты стромальных клеток, способствуя или ингибируя развитие онкологического процесса [68].

В отличие от нормальных клеток, которые тщательно поддерживают клеточный гомеостаз путем строгой регуляции пространственно-временной экспрессии и реакции на факторы роста, опухолевые клетки «захватывают»

регуляторный механизм клетки-хозяина, отвечающий за синтез факторов роста и передачу сигналов для поддержания их собственного роста и пролиферации [68]. Хемокины могут способствовать пролиферации и выживанию опухолевых клеток несколькими способами. Лигирование рецепторов хемокинов на опухолевых клетках индуцирует стимуляцию сигнального пути митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) / внеклеточной регулируемой сигналом киназы (Erk), что приводит к экспрессии важных генов факторов роста, таких как циклины D1 [209], Fos [33] и HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor; гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста) [21]. Кроме того, хемокины могут способствовать выживанию опухолевых клеток, нарушая баланс между проапоптотическими и антиапоптотическими белками в опухолевых клетках, включая повышенную регуляцию экспрессии Mdm2 и подавление экспрессии Bcl-2 или ингибирование каспазы-3 и активация каспазы-9 [185].

Было показано, что опухолевые клетки способны продуцировать стимулирующие рост хемокины и экспрессировать рецепторы хемокинов. Например, было обнаружено, что меланома экспрессирует ряд хемокинов, включая CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, CCL2 и CCL5, которые участвуют в росте и прогрессировании опухоли [158]. Альтернативно, опухолевые клетки могут высоко экспрессировать хемокиновые рецепторы, тем самым создавая петлю обратной связи, в которой большее количество раковых клеток делится под влиянием стимулирующих рост хемокинов, которые доступны в микроокружении опухоли. Например, CXCR4, который обычно не обнаруживается на эпителиальных клетках молочной железы, часто экспрессируется на клетках рака молочной железы. Сверхэкспрессия CXCR4 делает опухолевые клетки чувствительными к его родственному лиганду CXCL12 [124;182]. Кроме того, опухолевые клетки могут стимулировать стромальные клетки для синтеза и секреции стимулирующих рост хемокинов, устанавливая взаимодействие между опухолью и стромой, что способствует росту опухоли. Было показано, что вспомогательные клетки в ТМЕ, такие как фибробласты, ассоциированные с раком (CAF) и макрофаги, продуцируют хемокины и способствуют росту опухоли [105;135;169].

Хемокин CXCL12 участвует в развитии многих видов онкологических заболеваний, включая острый лимфобластный лейкоз, хронический В-клеточный лейкоз, глиому, рак молочной железы, рак яичников, мелкоклеточный рак легких, неходжкинскую лимфому и рак толстой кишки [30;44;46;125;127;139;146;175;227]. Также было показано, что хемокины CXCL1, CXCL2 и CXCL3 играют роль в развитии рака поджелудочной железы, меланомы, рака легких, аденокарциномы и рака желудка [45;90]. Выявлено, что рецептор хемокина CXCL12 CXCR4 имеет высокую экспрессию в клетках меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, рака легкого, глиомы, рака почки, В-клеточного хронического лимфолейкоза и рака щитовидной железы [10;67;75;160;202;211;227]. Ингибирование CXCR4 приводит к апоптозу в клетках рака яичника, гепатомы и хронического лимфолейкоза, что свидетельствует о важности этого рецептора в выживании и пролиферации клеток [18;64;172]. Другой хемокиновый рецептор CXCR2 играет жизненно важную роль в пролиферации раковых клеток пищевода через $GRO\alpha$ и $GRO\beta$ [84]. Более того, рецепторы хемокина CXCL8: CXCR1 и CXCR2 экспрессируются в клетках карциномы желудка человека и играют роль в пролиферации раковых клеток [195]. Высокая экспрессия рецепторов CXCR1 и CXCR2 в клетках меланомы человека увеличивает пролиферацию и инвазию клеток *in vitro* и значительно усиливает рост опухолей *in vivo*, демонстрируя тем самым важность этих рецепторов в росте и прогрессировании меланомы [96]. Рецептор CCR6 экспрессируется при колоректальном раке, а стимуляция CCL20 способствует пролиферации клеток колоректального рака [110]. Экспрессия CXCR6 и его лиганда CXCL16 при раке предстательной железы коррелирует с тяжестью процесса и прогнозом, так как в исследованиях было показано, что CXCL16 усиливал пролиферацию CXCR6 – экспрессирующих опухолевых клеток [22;41]. CXCR6 наряду с CXCL16 опосредует проонкогенное действие на клетки рака предстательной железы, индуцируя миграцию и пролиферацию лейкоцитов, ассоциированных с опухолью. Хемокиновый рецептор CCR10 экспрессируется на клетках меланомы и воздействие лиганда CCL27 на клетки меланомы приводит к активации сигнального пути PI3K/Akt (Akt and phosphatidylinositol-3-kinase) и

защищает клетки от апоптоза. Таким образом, CCL27 / CCR10 способствует росту клеток меланомы путем активации пути PI3K/Akt и уклонения от противоопухолевого ответа хозяина [53]. Клетки плоскоклеточного рака головы и шеи секретируют хемокины CCL19 и CCL21, что приводит к активации CCR7 и способствует росту и прогрессированию опухоли [153].

С другой стороны, некоторые рецепторы хемокинов ингибируют пролиферацию опухолевых клеток. Например, CCR1 может способствовать снижению пролиферации клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека [97]. Кроме того, ингибирование CCR5 усиливает пролиферацию клеток рака молочной железы, несущих p53 дикого типа, что свидетельствует о том, что CCR5 ингибирует прогрессирование рака молочной железы p53-зависимым образом [76]. Следовательно, учитывая про- и противоопухолевую роль хемокинов и их рецепторов, необходимы новые дополнительные исследования, для выяснения причин двойной роли одного и того же хемокина в онкологическом процессе. Кроме того, будущие исследования должны быть сосредоточены на выяснении механизма, с помощью которого хемокины и хемокиновые рецепторы способствуют онкогенезу для дальнейшего использования полученных знаний в целенаправленной противоопухолевой терапии.

1.5 Хемокины в ангиогенезе

Ангиогенез, процесс образования новых кровеносных сосудов из существующих кровеносных сосудов, имеет решающее значение в прогрессировании опухоли. Многие хемокины и хемокиновые рецепторы играют жизненно важную роль в данном процессе. Хемокины могут либо стимулировать экспрессию проангиогенных факторов, либо связываться с рецепторами хемокинов на поверхности эндотелиальных клеток и способствовать ангиогенезу. Мотив ELR, присутствующий в хемокинах группы CXC, играет важную роль в развитии ангиогенеза [189]. Хемокины CXC, имеющие мотив ELR, являются мощными ангиогенными факторами, тогда как хемокины без мотива ELR способствуют ангиостазу [189]. Хемокины CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL12, CCL2, CCL11 и CCL16 являются ангиогенными

хемокинами, тогда как CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 и CXCL14 являются ангиостатическими хемокинами [93].

Снижение уровня хемокинов CXCL1, CXCL2 и CXCL3 при меланоме приводит к снижению ангиогенеза опухоли и росту опухоли, что указывает на важность этих хемокинов в вышеописанном процессе [123;154]. CXCR1, CXCR2 и CXCR4 экспрессируются на эндотелиальных клетках [102;181]. Нокаут генов CXCR1 и CXCR2 в эндотелиальных клетках капилляров человека уменьшал миграцию, инвазию и образование капиллярных структур [181]. Кроме того, хемокин CXCL12 активирует рецептор хемокинов CXCR4 на эндотелиальных клетках, что способствует миграции и пролиферации эндотелиальных клеток в раковых клетках яичников [219]. Рецептор хемокинов CCR2 также экспрессируется эндотелиальными клетками [210]. Недавнее исследование демонстрирует роль оси CCR2-CCL2 в ангиогенезе, а также выживаемости опухоли [80].

1.6 Хемокины в метастазировании

Метастазирование – это процесс, во время которого злокачественные опухолевые клетки покидают локализацию первичной опухоли, попадают в кровотоки или лимфатическую систему и мигрируют в другие органы или участки тела. Метастазирование является не случайным, а последовательным и орган-специфическим процессом. Некоторые органы, такие как печень, легкие, мозг, лимфатические узлы и костный мозг, являются основными участками метастазирования, тогда как другие, такие как почка, поджелудочная железа и кожа, редко поражаются метастазами [227]. Метастазирование является основной причиной смертности при большинстве солидных опухолей, и способность метастазировать является одной из ключевых особенностей, которая отличает злокачественные опухоли от доброкачественных поражений. Хотя метастазирование представляет собой сложный процесс с участием различных факторов и регуляторов малых молекул, исследования показали, что хемокины и их рецепторы играют ключевую роль в метастазировании [140].

При нормальных физиологических функциях гомеостатические хемокины регулируют миграцию лейкоцитов путем рекрутинга определенных популяций лимфоидных клеток в определенные ткани для осуществления иммунных реакций. Например, хемокиновый лиганд CCL27 индуцирует миграцию CLA + Т-клеток (CLA, cutaneous lymphocyte antigen; кожный лимфоцитарный антиген), которые экспрессируют хемокиновый рецептор CCR10, в кожу [77], а лиганд CXCL12 в костном мозге рекрутирует гемопоэтические стволовые клетки, которые экспрессируют рецептор CXCR4 [140]. Хотя хемокины обычно регулируют миграцию иммунных клеток, другие типы клеток могут использовать эти «пути» хемокинов, экспрессируя соответствующий рецептор. Недавние исследования показывают, что метастатические раковые клетки используют хемокиновые пути, чтобы мигрировать в отдаленные места. Как и при нормальной миграции лейкоцитов, метастазирование опухолевых клеток требует прохождения через сосудистые барьеры, проникновения в кровообращение и экстравазации в отдаленных, не случайных, специфичных для органа местах. Поскольку транспортировка лейкоцитов регулируется хемокиновыми рецепторами и их лигандами, хемокины также могут играть ключевую роль в инициации и регуляции миграции и метастазирования опухолевых клеток.

CCR7-CCL19 / CCL21

CCR7 – опосредованная миграция лейкоцитов чрезвычайно важна для нормальных иммунных реакций. CCR7 рекрутирует наивные Т-клетки и активированные дендритные клетки в лимфатические узлы, где они взаимодействуют друг с другом и иницируют адаптивные иммунные ответы [203]. CCR7 имеет два хемокиновых лиганда: CCL19 и CCL21. CCL21 регулирует хоуминг наивных Т-лимфоцитов во вторичные лимфоидные органы, тогда как CCL19 активирует Т-клетки [188]. Потеря CCL21 или ингибирование гена CCR7 приводит к значительному нарушению хоуминга Т-клеток во вторичные лимфоидные органы. Многие исследования предполагают, что опухолевые клетки используют нормальный механизм хоуминга лейкоцитов для метастазирования в лимфатические узлы. Исследования показывают, что большинство тканей

первичного рака молочной железы и метастатических раковых клеток в лимфатических узлах экспрессируют CCR7, и существует значительная корреляция между экспрессией CCR7 и метастазами в лимфатических узлах. Кроме того, более высокая экспрессия CCR7 коррелирует с более низкой выживаемостью и худшим прогнозом у пациентов с раком молочной железы [129]. Корреляция между метастазами в лимфатических узлах и экспрессией CCR7 наблюдается при многих онкологических заболеваниях, включая плоскоклеточный рак пищевода [47], меланому [194], немелкоклеточный рак легкого [193], рак головы и шеи [140], рак желудка [128] и колоректальный рак [128].

Экспрессия *de novo* CCR7 необходима для индукции преимущественного метастазирования в лимфатические узлы в нескольких клеточных линиях опухолей молочной железы человека и мыши, которые без экспрессии CCR7 обычно метастазируют исключительно в легкие [40]. Экспрессия CCR7 в неметастатической клеточной линии меланомы B16 также увеличивает метастазирование в лимфатические узлы [215]. Интересно, что экспрессия CCR7 в клетках меланомы B16 вызывает метастазирование в лимфатические узлы [215], в то время как экспрессия CXCR4 в мышечных клетках B16 усиливает метастазирование в легкие [141]. Высокая экспрессия CCR7 в неходжкинской лимфоме человека вызывает метастатическое распространение через сигнальный путь PI3K / Akt [219]. Экспрессия CCR7 также вызывает распространение через лимфатические сосуды при аденокарциноме протоков поджелудочной железы человека. В исследовании рака толстой кишки предполагается, что CCR7 способствует метастазированию путем усиления экспрессии матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) [175].

Дополнительные исследования показывают, что комбинированная экспрессия CCR7 и CXCR4 также коррелирует с метастазированием лимфатических узлов при раке молочной железы [27;115;140], раке желудка [13], раке шейки матки [98] и меланоме [140]. Высокие уровни CCR7 последовательно экспрессируются в клетках опухоли молочной железы наряду с CXCR4, хотя CCR7 также экспрессируется в нормальных эпителиальных клетках молочной

железы [140]. Подобно CXCR4, взаимодействия CCR7-CCL21 индуцируют направленную инвазию клеток опухоли молочной железы, образование псевдоподий и полимеризацию актина, что увеличивает инвазивность опухолевых клеток [140]. Поскольку и CCL21, и CXCL12 высоко экспрессируются в лимфатических узлах, а взаимодействия рецептор – лиганд обоих хемокинов способствуют инвазивности, вполне вероятно, что оба лиганда работают вместе, чтобы способствовать метастазированию в лимфатические узлы [115;140].

CCR7, по-видимому, играет особенно важную роль при лейкозах и лимфомах. Из-за своего лимфоидного происхождения многие клетки лейкемии и лимфомы высоко экспрессируют CCR7. Злокачественные новообразования В-клеток с обширным распространением в лимфатические узлы, такие как хронический лимфолейкоз В-клеток (В-ХЛЛ) [69], экспрессируют высокие уровни CCR7, который обеспечивает проникновение В-клеток в лимфоидную ткань, в то время как новообразования с небольшим метастазированием в лимфатических узлах, таких как множественная миелома или волосатоклеточный лейкоз [69], экспрессируются низкие уровни CCR7 и низкие и умеренные уровни CXCR4 [120].

Кроме того, исследования показывают, что CCR7 опосредует метастазирование клеток Т-клеточного лейкоза в центральную нервную систему (ЦНС). Buonomici et al. показывают, что как активный так и мутированный сигналинг Notch1, у большинства пациентов с Т-клеточным острым лимфобластным лейкозом, усиливает экспрессию CCR7 в Т-ОЛЛ. Экспрессия онкогенного Notch 1 вызывает у мышей развитие характерных патологических особенностей Т-ОЛЛ и инфильтрацию лептоменингеальных пространств головного мозга, демонстрируя, что онкогенный Notch1 способен индуцировать Т-ОЛЛ и направлять трансформированные клетки в ЦНС [26]. Анализ первичных образцов Т-ОЛЛ, а также клеточных линий Т-ОЛЛ, содержащих Notch1-активирующие мутации, имеет повышенную регуляцию CCR7, вызванную передачей сигналов Notch1 [26]. CCR7 также играет важную роль в плоскоклеточном раке головы и шеи (ПРГШ). Исследования показывают, что увеличение экспрессии CCR7 в ПРГШ коррелирует с более низкой

выживаемостью из-за усиления метастазирования [131]. CCR7 опосредует метастазирование в ПРГШ путем активации интегрина $\alpha\upsilon\beta 3$ [109], который способствует адгезии раковых клеток или миграции через внеклеточный матрикс. Кроме того, CCR7 опосредует выживание клеток метастатических клеточных линий ПРГШ путем фосфорилирования Akt PI3K-зависимым способом [114;131;208]. CCR7-CCL19 активация сигнального пути PI3K / Akt / mTOR впоследствии активирует нижележащую сигнальную молекулу NF- κ B [114]. Взаимодействия CCR7-CCL19 индуцируют фосфорилирование I κ B α , способствуя транслокации NF- κ B в ядро [114]. Ингибирование CCR7, PI3K, Akt и mTOR успешно останавливает фосфорилирование и ДНК-связывание. Более того, экспрессия CCR7 и NF- κ B в образцах пациентов напрямую коррелирует с увеличением метастазов в лимфатических узлах и клиническим прогрессированием [114].

CCR9-CCL25

В нормальных физиологических условиях CCR9 действует на иммунитет слизистой оболочки и транспорт лимфоцитов во время развития Т-клеток [224]. Его лиганд CCL25, или TECK (thymus-expressed chemokine), экспрессируется в тонкой кишке и тимусе [217]. Поскольку миграция CCR9-позитивных лимфоцитов в тонкую кишку зависит от хемоаттрактивного действия CCL25 и действия гетеродимеров $\alpha\beta$ интегрина, исследования показывают, что CCR9-CCL25 также опосредует метастазирование меланомы в тонкую кишку. Большинство опухолей тонкой кишки, которые являются редкими и составляют только 2% всех желудочно-кишечных опухолей, являются метастазами из меланомы [19;20;61]. Исследования, изучающие метастазирование меланомы, показывают, что CCR9 высоко экспрессируется в клетках меланомы и метастаза тонкой кишки [107] и что функциональная экспрессия CCR9 на клетках меланомы опосредует миграцию в тонкую кишку, объясняя их преимущественную миграцию в тонкую кишку [9].

Некоторые клеточные линии рака молочной железы также экспрессируют CCR9. Недавнее исследование показывает, что CCR9 может способствовать

метастазированию при раке молочной железы за счет усиления клеточной миграции, увеличения экспрессии матрикс-металлопротеиназы-9 (ММР-9) через CCL25 и поддержания выживаемости опухолевых клеток в метастатических сайтах. Некоторые клеточные линии и опухоли яичников также экспрессируют CCR9 [180]. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить роль CCR9 в других раковых заболеваниях и определить механизм, с помощью которого он способствует метастазированию.

CCR10-CCL27 / CCL28

CCR10 связывает CCL27, который высоко экспрессируется как в нормальной, так и в воспалительной коже [77]. В коже CCL27 рекрутирует CLA + Т-клетки, которые экспрессируют хемокиновый рецептор CCR10 [77]. Исследования показывают, что злокачественная меланома экспрессирует высокие уровни CCR10 в дополнение к CXCR4 и CCR7 [158]. Меланома имеет сходный метастатический фенотип с раком молочной железы, который также экспрессирует высокие уровни CXCR4 и CCR7, но, в отличие от рака молочной железы, чаще метастазирует в кожу [140]. Учитывая роль CCR10-CCL27 в миграции лейкоцитов в кожу, вполне вероятно, что экспрессия CCR10 в меланоме вызывает метастазирование в кожу. Тем не менее, другое исследование предполагает, что экспрессия CCR10 в меланоме способствует метастазированию в лимфатические узлы в дополнение к усилению инвазии, роста и иммунного выхода опухолевых клеток [179]. CCR10 и его лиганд CCL27 также активируются при плоскоклеточном раке кожи, и его экспрессия коррелирует с прогрессированием рака [87].

CXCR3-CXCL9, CXCL10, CXCL11

Экспрессия CXCR3 в злокачественной меланоме кожи коррелирует с прогрессированием опухоли [138] и конститутивно экспрессируется в нескольких клеточных линиях меланомы человека и клеточной линии меланомы B16F10 мыши [92]. Потеря экспрессии CXCR3 в меланоме мыши B16F10 уменьшает метастазирование в лимфатические узлы на ~ 15%, что позволяет предположить,

что CXCR3 может играть роль в метастазировании в лимфатические узлы [92]. CXCR3 также конститутивно экспрессируется при аденокарциноме легкого; однако экспрессия CXCR3 существенно не коррелирует с метастазированием. CXCR3 в опухолевых клетках, прогноз хуже, чем у пациентов без экспрессии CXCR3 [92]. Одно из исследований демонстрирует, что экспрессия CXCR3 в клеточной линии рака толстой кишки усиливает метастазирование *in vivo* в лимфатические узлы, но не в печень или легкие [92]. Cambien et. al, с другой стороны, сообщают, что активация CXCR3 *in vivo* усиливает метастазирование в легкие [29]. Дополнительные исследования предполагают, что активация CXCR3 при раке толстой кишки синергетически усиливает CXCR4-опосредованную миграцию опухолевых клеток в лимфатические узлы, печень и легкие [142]. Таким образом, функция CXCR3 при раке толстой кишки может зависеть от его взаимодействия с другими экспрессированными рецепторами хемокинов, такими как CXCR4 и CCR7.

В исследованиях было показано, что при остеосаркоме CXCR3 и его лиганды вызывают метастазирование в легкие, а затем стимулируют рост и усиление метастазирования [163]. Лечение мышей антагонистом CXCR3 AMG487 значительно уменьшает метастазы в легких в двух мышинных моделях остеосаркомы [207]. Ингибирование CXCR3 аналогичным образом снижает метастазирование в легкие у мышей с метастатическим раком молочной железы [207]. Эти исследования показывают, что CXCR3 может играть важную роль в миграции опухолевых клеток в ткань легких.

CXCR5-CXCL13

CXCR5, наряду с CXCR4 и CCR7, также помогает регулировать проникновение В-клеток во вторичные лимфоидные ткани и их перемещение в Т-зоны и В-зоны лимфоидных тканей [11;25]. Исследования показывают, что некоторые лимфомы экспрессируют CXCR5, клетки которых в большом объеме метастазируют в лимфатические узлы [69]. Экспрессия CXCR5 особенно высока при хронической лимфоцитарной лейкемии и мантийноклеточной лимфоме [69]. Последовательная активация CXCR5 также наблюдается в плоскоклеточном раке,

что позволяет предположить, что взаимодействия CXCR5 / CXCL13 могут служить новым дополнительным путем, опосредующим метастазирование в лимфатические узлы [140]. CXCR5 может также активировать метастазирование клеток нейробластомы в костный мозг через взаимодействия со стромальными клетками, экспрессирующими CCL16 [7]. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования для выяснения роли CXCR5 в других злокачественных новообразованиях и определить механизмы, с помощью которых он способствует метастазированию.

CXCR4-CXCL12

Ось CXCR4 / CXCL12 является одной из наиболее изученных осей хемокиновых рецепторов, и было показано, что она играет жизненно важную роль в метастазировании. Исследования показывают, что метастатический рак молочной железы избирательно экспрессирует CXCR4 и мигрирует в органы, которые экспрессируют высокие уровни его соответствующего лиганда CXCL12, также известного как SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) [140]. CXCR4 конститутивно высоко экспрессируется в клеточных линиях метастатического рака молочной железы, метастазах в лимфатических узлах и метастазах в печени, в то время как уровень экспрессии в нормальных эпителиальных клетках либо низкий, либо отсутствует [140]. Между тем, его лиганд, CXCL12, преимущественно экспрессируется в наиболее распространенных участках метастазирования рака молочной железы - легких, головном мозге, лимфатических узлах, печени и ККМ [22;140]. Это говорит о том, что метастатические клетки опухоли молочной железы избирательно экспрессируют CXCR4, что способствует миграции опухолевых клеток в органы с высоким уровнем экспрессии CXCL12. Более того, ингибирование взаимодействий CXCR4-CXCL12 *in vivo* значительно снижает метастазирование опухолевых клеток молочной железы в лимфатические узлы и легкие [140]. Взаимодействия CXCR4-CXCL12 также способствует повышенной инвазивной способности. Взаимодействия рецептора-лиганда CXCR4-CXCL12 при раке молочной железы запускают полимеризацию актина, которая позволяет опухолевым клеткам

проникать в соседние ткани и успешно метастазировать, формировать псевдоподии, индуцировать направленную инвазию клеток опухоли молочной железы [140]. Ингибирование взаимодействий CXCL12-CXCR4 с использованием антител против CXCR4 или CXCL12 значительно снижает миграцию на 63-76% и 60-62% соответственно [140].

Дополнительные исследования показывают, что экспрессия *de novo* CXCR4 усиливает инвазивную способность опухоли и органоспецифическое метастазирование [141]. В клеточной линии меланомы B16 мышей отмечается заметное увеличение метастазов в легкие при трансфекции с помощью CXCR4 [141]. Однако ингибирование CXCR4 низкомолекулярным антагонистом T22 останавливает увеличение метастазирования клеток CXCR4-B16 [141].

Клетки метастатического рака предстательной железы человека также экспрессируют CXCR4. Экспрессия CXCR4 при раке предстательной железы усиливает инвазивную метастатическую способность опухолевых клеток в присутствии лиганда CXCL12, тогда как ингибирование CXCR4 снижает метастатическую способность [44]. Кроме того, CXCR4 опосредует адгезию опухолевых клеток простаты через интегрины $\alpha 5$ и $\beta 3$ [51]. Высокие уровни экспрессии CXCR4 при раке предстательной железы человека связаны с более частым локальным рецидивом и отдаленными метастазами, что позволяет предположить, что CXCR4 служит не только потенциальной терапевтической мишенью, но и прогностическим маркером [84;190].

Высокие уровни CXCR4 также наблюдаются в CD44 + / CD133 + CSCs (prostate cancer stem cells; стволовые клетки рака предстательной железы) [49]. Поскольку CSCs могут инициировать метастазирование и способствуют формированию новых или рецидивирующих опухолей после первого курса лечения [56], путь CXCR4-CXCL12 может косвенно способствовать метастазированию, поддерживая и стимулируя CSCs [91]. Исследования показывают, что повышенная экспрессия CXCR4 и CXCL12 способствует адгезии CSC CD133 + / CD44 + простаты к внеклеточному белку фибронектину, который является важным для метастазирования в органы и возникновения вторичных опухолей [49]. CXCL12 вызывает активацию пути PI3K и способствует

пролиферации CXCR4 + CSC простаты [49]. Таким образом, активный путь CXCR4-CXCL12 в CSCs простаты может косвенно способствовать метастазированию, регулируя клеточную адгезию, пролиферацию и потенциал дифференцировки [49].

Также ось CXCL12-CXCR4 используется клетками ОМЛ, посредством чего активируются множественные сигнальные пути, включая (PI3K) / АКТ и (МАРК) / (ERK). Mohle и соавт. [136] впервые сообщили о вариабельной экспрессии CXCR4 на поверхности клеток ОМЛ, указывая на положительную корреляцию между поверхностной экспрессией CXCR4 и CXCL12-индуцированной миграцией.

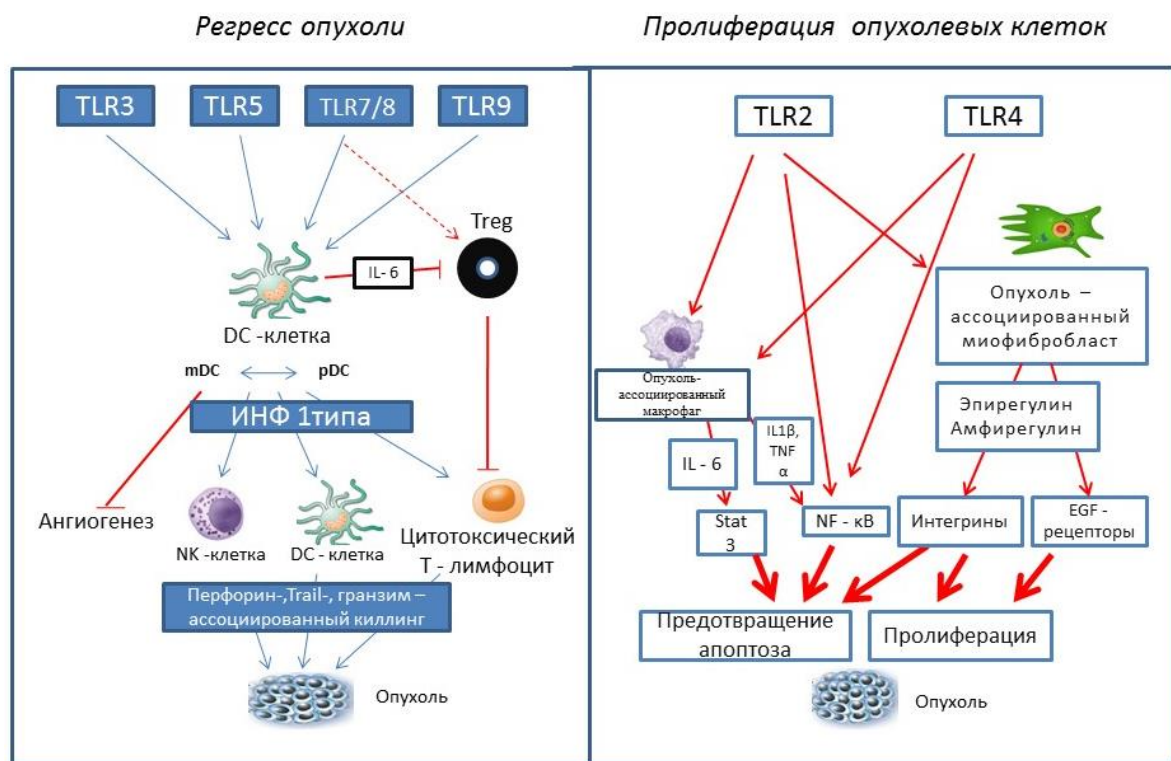


Рис.1 Роль TLRs в онкологическом процессе

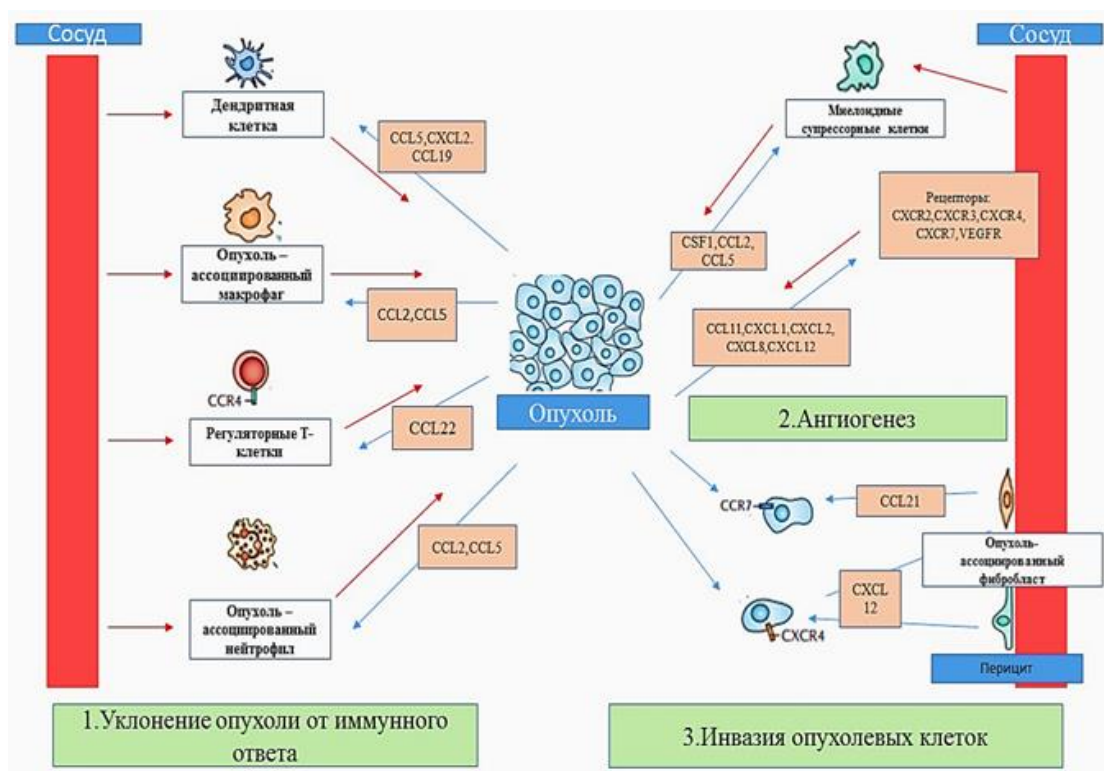


Рис.2 Влияние хемокинов на развитие онкологического процесса

Суммируя, можно отметить, что исследования показывают, что CXCR4 играет важную роль в метастазировании многих видов рака, включая рак молочной железы [110-111;211-212], рак легких [160;189;212], колоректальный рак [93;185;211], рак желудка [219;220;225], рак яичников[82;88], рак предстательной железы [8], поджелудочная железа [126;129], меланому [54;173], рак пищевода[87;98], рак мочевого пузыря [50], остеосаркому [149], нейробластому [117], глиобластому [169] и острый лимфобластный лейкоз [172]. (рис.2)

Активация TLR-опосредованных механизмов врожденного иммунитета может приводить к как прогрессии опухолевого процесса, так и к его регрессу. Влияние TLRs на судьбу опухолевых клеток зависит от множества факторов и их совокупности, которые были затронуты в обзоре. В отличие от влияния TLRs на солидные опухоли, влияние данных рецепторов на развитие патологических состояний в гемопоэзе остаются практически неизученными.

Активация TLRs ведет к выработке цитокинов, в том числе и хемокинов, которые также участвуют в развитии онкологического процесса и имеют двоякую роль в процессе опухолеобразования. В связи с вышесказанным необходим более многоуровневый подход к изучению влияния факторов врожденного иммунитета в развитии онкологических процессов. (рис1; 2)

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика клеточных линий и клинических групп

Работа была проведена при сотрудничестве с лабораторией молекулярной иммунологии (заведующая лабораторией чл.-корр. РАН, д.м.н. Свитич О.А.) ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, экспериментальной иммунологии (к.м.н., заведующая лабораторией Аммур Ю.И.) ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова и отделением клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского (заведующая отделением Клинушкина Е.Ф.) Лабораторией экспериментальной иммунологии были предоставлены материалы для исследования - клеточные линии K562 и Reh. Клеточная линия K562 представляет из себя эритроидно-миелоидные предшественники, выделенные из плевральной жидкости женщины 53 лет с хроническим миелоидным лейкозом. Клеточная линия Reh представляет из себя клетки, выделенные от пациента с пре-В острым лимфобластным лейкозом.

Клинический материал в виде крови от пациентов с острым миелоидным лейкозом (М4) до и после химиотерапии был предоставлен отделением клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, клинический материал от пациентов группы контроля был предоставлен ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова.

Общее количество пациентов составило 35 человек. Пациенты были подразделены на три группы:

1.Пациенты с впервые выявленным ОМЛ (М4) до назначения химиотерапии в количестве десяти человек. (таб.1)

2.Пациенты с впервые выявленным ОМЛ после первого курса химиотерапии, через три недели от окончания, в количестве шести человек.

3.Контрольная группа пациентов, соответствующая критериям включения, невключения пациентов в исследование и исключения пациентов группы контроля из исследования в количестве пятнадцати человек. (таб.2)

Таблица 1.

Критерии включения, невключения и критерии исключения пациентов с острым миелоидным лейкозом в клиническую группу исследования

Клиническая группа пациентов с острым миелоидным лейкозом (М4) (n=10)		
Критерии включения	Критерии невключения	Критерии исключения
1. Наличие письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании; 2. Мужчины и женщины в возрасте 18 – 50 лет 3. Установленный диагноз острый миелоидный лейкоз (М4) до химиотерапии и после химиотерапии	1. Возраст младше 18 и старше 50 лет 2. Беременность, кормление грудью – 3. Наличие сопутствующей патологии: острые инфекционные заболевания, ВИЧ-инфицирование, гепатит В, гепатит С, хронические инфекционные заболевания в фазе обострения, аутоиммунные заболевания.	1. Отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании; 2. Беременность

Таблица 2.

Критерии включения, невключения и критерии исключения в группу здоровых доноров

Контрольная группа (n=25)		
Критерии включения	Критерии невключения	Критерии исключения
1. Наличие письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании 2. Мужчины и женщины в возрасте 18 – 50 лет 3. Практически здоровые пациенты	1. Возраст до 18 лет и после 50 лет 2. Беременность, кормление грудью 3. Острые инфекционные заболевания, 4. ВИЧ-инфицирование, 5. Гепатит В, гепатит С, 6. Хронические инфекционные заболевания в фазе обострения, 7. Аутоиммунные заболевания, 8. Аллергические заболевания, 9. Эндокринологические заболевания 10. Онкологические заболевания в анамнезе и на момент проведения исследования 10. Грубые генетические аномалии	1. Отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании; 2. Беременность

2.2 Материалы

В качестве хемоаттрактанта использовался CXCL12 (ThermoFisher, США). В качестве TLRs лиганда использовался DNA_lig, синтезированный Лабжиновым П.А. на базе лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

2.3 Методы

2.3.1 Ведение клеточных культур

Клеточные культуры K562 и Reh культивировали суспензионным методом в среде RPMI с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки 10% и раствора гентамицина 1% в культуральных флаконах. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере CO₂. При достижении оптимальной плотности 1.0×10^5 - 1.0×10^6 клеток/мл проводили пересев культуры и дальнейшее культивирование. Подсчет клеток проводили с помощью камеры Горяева.

2.3.2 Выделение МНК от пациентов

Сотрудниками отделения клинической гематологии и иммунотерапии проводился отбор крови пациентов в вакуумные гепаринизированные пробирки в количестве 10 мл, затем в течение часа кровь доставлялась в лабораторию, после чего проводилось выделение мононуклеарных клеток. Проводилось разбавление крови средой RPMI-1640, без глутамина (ПанЭко, РФ) в соотношении 1:3 соответственно. Разбавленная кровь наслаивалась на фиколл (ПанЭко, РФ) в соотношении 1:3, после чего пробирки центрифугировали при 1000 rpm в течение 40 минут. После окончания центрифугирования производился сбор интерфазы, содержащей МНК в отдельную пробирку. МНК разводились средой RPMI в соотношении 1:1, после чего центрифугировались при 1200 rpm в течение 15 минут. После центрифугирования удалялась надосадочная жидкость, МНК разводились средой RPMI-1640 в соотношении 1:1 и проводилось повторное центрифугирование при 1200 rpm в течение 15 минут. Полученный осадок

ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640, после чего проводился подсчет количества клеток в камере Горяева.

2.3.3 Определение жизнеспособности клеток

Для определения жизнеспособности клеток использовали 0,2% раствор трипанового синего (Serva, США). Окрашивание клеток красителем осуществляли согласно стандартному протоколу. Подсчет клеток проводили с помощью камеры Горяева.

2.2.4 Исследование хемотаксиса клеток

Для исследования хемотаксиса использовалась камера Бойдена фирмы MultiScreen Migration Invasion and Chemotaxis Filter Plate (MERCK, Германия) с размерами пор 5 и 8 мкм. Камера Бойдена состоит из трех основных элементов: верхний отсек, куда помещаются клетки, нижний отсек, куда мигрируют клетки и поры между ними. MultiScreen Migration Invasion and Chemotaxis Filter представляет из себя 96-ти луночный планшет, каждая лунка из которых является одноразовой камерой для миграции. В верхний отсек каждой лунки помещалось 60 мкл взвеси клеток в концентрации 1.0×10^6 клеток/мл. В нижний отсек первой камеры помещалось 150 мкл раствора CXCL12 в концентрации 200 нг/мл, второй камеры 150 мкл раствор DNA_lig в концентрации 100 мкг/мл и третьей камеры 150 мкл среды RPMI-1640 в качестве контроля. Подсчет мигрировавших клеток в нижний отсек проводился через 15 минут, 60 минут и 24 часа. Для каждой временной точки использовалась отдельная камера. Подсчет мигрировавших клеток проводили с помощью камеры Горяева.

2.3.5 Выделение РНК

Для выделения РНК из клеток методом сорбции на силикагеле использовали набор “Рибо-сорб” (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, АмплиСенс, Россия). Выделение РНК проводили согласно инструкции производителя. Выделенные образцы РНК хранили при температуре минус 70С°.

2.3.6 Реакция обратной транскрипции

Для получения кДНК исследуемых генов на матрице выделенной РНК была проведена реакция обратной транскрипции. Подбор праймеров для реакции обратной транскрипции проводился согласно нуклеотидным последовательностям мРНК исследуемых генов (получены в базе данных Gene Bank) с помощью программы Vector NTI 8. Праймеры, используемые в работе, были синтезированы на фирме Синтол (Россия).

2.3.7 Проведение ПЦР-РВ

На первом этапе реакции обратной транскрипции проводили отжиг праймеров на РНК, для этого готовили смесь следующего состава:

- 1 мкл Random праймеров (1 ое/мл);
- 3 мкл обратных праймеров (1 ое/мл);
- 2 мкл мРНК.

В отрицательный контроль вместо мРНК добавляли 2 мкл H₂O (Синтол, Россия).

Полученную смесь инкубировали в термостате при 75°C в течение 3 минут. После отжига праймеров пробирки постепенно охлаждали, для этого их помещали в штатив со льдом. На следующем этапе в пробы добавляли реакционную смесь следующего состава:

- 3 мкл – SE-буфер Обратная транскриптаза M-MuV (Сибэнзим, Россия);
- 2 мкл – 25 мМ дНТФ (Сибэнзим, Россия);
- 19 мкл – H₂O (Синтол, Россия);
- 0,05 мкл – M-MuV Обратная транскриптаза (Сибэнзим, Россия).

Пробирки помещали в амплификатор “Терцик” (ДНК-технологии, Россия) и инкубировали в следующем режиме: 37°C – 60 мин; 95°C – 10 мин. Полученные образцы хранили при температуре минус 70°C.

В настоящей работе был использован метод ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Приготовление реакционной смеси проводили с использованием компонентов “Набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I (Буфер Б)” (Синтол, Россия). Реакционную смесь готовили согласно инструкции производителя. Оптимальные концентрации праймеров, зондов и $MgCl_2$ в реакционной смеси подбирались дополнительно для каждой системы.

Нуклеотидные последовательности праймеров были сконструированы с помощью программы Vector NTI 8 согласно последовательностям мРНК исследуемых генов, которые были получены в базе данных GenBank. Праймеры, используемые в настоящей работе, были синтезированы на фирме Синтол (Россия).

Для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I готовили реакционную смесь следующего состава:

1,5 мкл – 10х ПЦР буфер Б (Синтол, Россия);

1,5 мкл – 25 мМ $MgCl_2$ (Синтол, Россия);

1,5 мкл – 2,5 мМ дНТФ (Синтол, Россия);

1 мкл – прямой праймер (таб.3)

1 мкл – обратный праймер (таб.3)

5,5 мкл – H_2O (Синтол, Россия);

0,2 мкл – Taq ДНК-полимераза, 5 Е/мкл (Синтол, Россия);

3 мкл – образец кДНК, полученной в ходе реакции обратной транскрипции.

В отрицательный контроль реакций вместо кДНК добавляли 3 мкл H₂O (Синтол, Россия). Общий объем реакционной смеси составлял 15 мкл. Составление реакционных смесей проводили в стерильных условиях.

После приготовления реакционной смеси пробирки помещали в амплификатор ДТ-96 (Компания «ДНК-технология», Россия) и проводили ПЦР-РВ по заданной программе:

1. 95⁰С – 2 минуты;
2. 95⁰С 20 секунд. } 40 циклов
 58 – 64⁰С – 40 секунд } 40 циклов
3. 90⁰С 15 секунд } 100 циклов

Специфичность фрагментов, амплифицированных в ходе ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I, оценивали с помощью реакции плавления ДНК.

Таблица 3

Последовательности используемых праймеров в работе

Название праймера	Последовательность праймера
CXCL12_ <i>sen</i>	aga-gcc-aac-gtc-aag-cat-ct
CXCL12_ <i>an_sen</i>	agg-gtc-taa-atg-ctggcaaa
EGFR_ <i>sen</i>	gag-tcg-ggc-tct-gga-gga-aa
EGFR_ <i>an_sen</i>	gac-tgc-taa-ggc-ata-gga-att
CCR4_ <i>sen</i>	att-gcc-tca-cag-acc-ttc-ctc-a
CCR4_ <i>an_sen</i>	cca-aat-gcc-ttg-atg-cct-tct-t
TLR9_ <i>sen</i>	tgg-tgt-tga-agg-aca-gtt-ctc-tc
TLR9_ <i>an_sen</i>	cac-tcg-gag-gtt-tcc-cag-c

2.3.8 Статистический анализ данных

Для статистической обработки полученных результатов рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение от среднего. В работе результаты представлены в виде «медиана ($x_{0,75} - x_{0,25}$)». Статистический анализ полученных данных производился с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для сравнения двух выборок. Для расчета корреляционной зависимости использовался непараметрический метод ранговой корреляции Спирмена.

Статистический анализ проводили с использованием компьютерной статистической программой BioStat, а также программы Excel.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе научно-экспериментальной работы необходимо было подобрать оптимальные условия для исследования хемотаксиса *in vitro*, удовлетворяющие поставленные нами задачи. В качестве исследуемого объекта были подобраны две клеточные линии, которые относятся к разным типам лейкоза: K562 и Reh. Для подбора размера микропор были взяты камеры Бойдена фирмы MultiScreen Migration Invasion and Chemotaxis Filter Plate (MERCK, Германия) с размерами пор 5 и 8 мкм. Хемотаксис каждой линии исследовался с использованием двух видов камер.

3.1 Хемотаксис клеток опухолевых линий Reh и K562 к DNA_lig

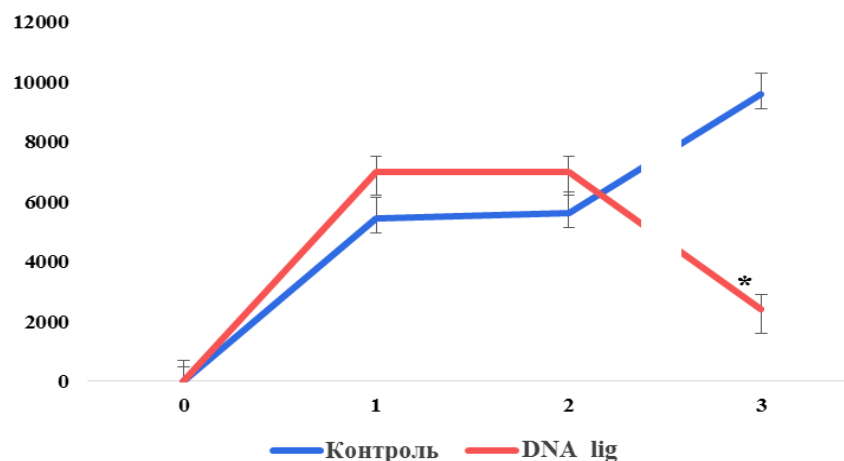
Динамика хемотаксиса клеток по направлению к DNA_lig увеличивается в течение первых десяти минут, затем в течение суток снижается. Динамика миграции клеток в контроле постепенно увеличивается на протяжении всего эксперимента в течение суток. Хемотаксис клеточной линии Reh по направлению к DNA_lig достоверно ниже через 24 часа в 4 раза. Достоверных отличий между хемотаксисом по направлению к лиганду и миграцией в контроле через 10 и 60 минут нет. (рис.3)

Хемотаксис клеток по направлению к DNA_lig увеличивается в течение первых десяти минут, затем в течение следующего часа постепенно снижается, в течение следующих суток динамика миграции возрастает. Миграция клеток в контроле увеличивается в течение первых десяти минут, затем в течение суток постепенно снижается. Хемотаксис клеточной линии Reh по направлению к DNA_lig достоверно ниже относительно контроля через 10 и 60 минут в 1,3 и 3 раза соответственно. Достоверных отличий между хемотаксисом по направлению к лиганду и миграцией в контроле через сутки нет.

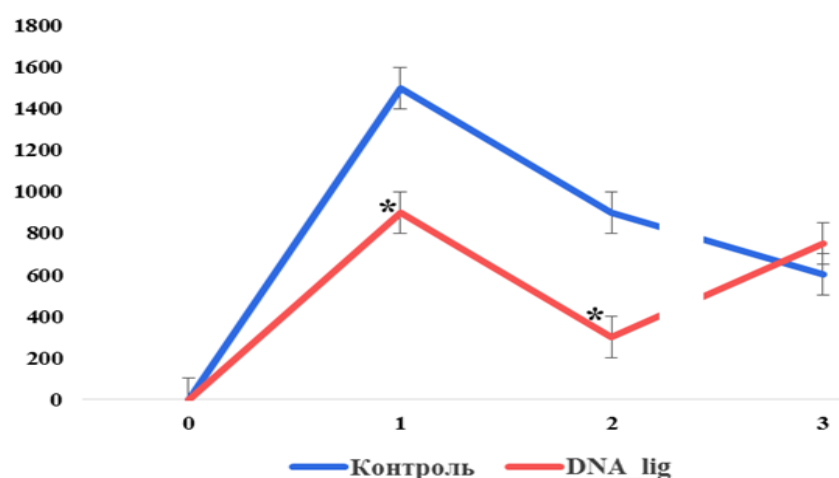
Динамика хемотаксиса клеток линии K562 по направлению к DNA_lig постепенно нарастает в течение суток. Динамика миграции клеток в контроле нарастает первый час исследования, затем резко снижается через сутки.

Количество мигрировавших клеток по направлению к DNA_lig достоверно ниже относительно контроля через 10 минут в 5 раза и достоверно ниже через 60 минут в 3.7 раза. Достоверных отличий между хемотаксисом по направлению к лиганду и миграцией в контроле через 24 часа нет.

Хемотаксис клеток линии K562 по направлению к DNA_lig постепенно нарастает в течение суток. Динамика миграции клеток резко нарастает за первые 10 минут, затем в течение часа находится в состоянии плато, после чего в течение 24 часов незначительно снижается. Количество мигрировавших клеток по направлению к DNA_lig достоверно ниже относительно контроля через 10 минут в 2,1 раза и достоверно ниже через 60 минут в 1,4 раза. Достоверных отличий между хемотаксисом по направлению к лиганду и миграцией в контроле через 24 часа нет. (рис.4)



а



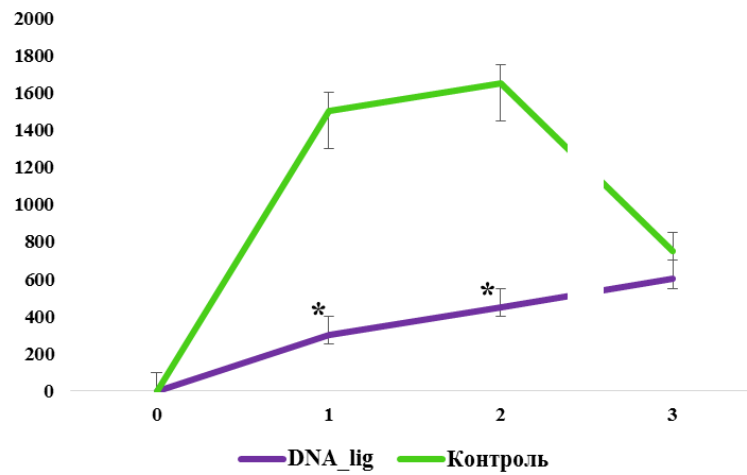
б

Рис.3 Динамика DNA_lig - индуцированного хемотаксиса и спонтанной миграции клеточной линии Reh в камере Бойдена, размер пор 8 мкм(а) и 5 мкм (б)

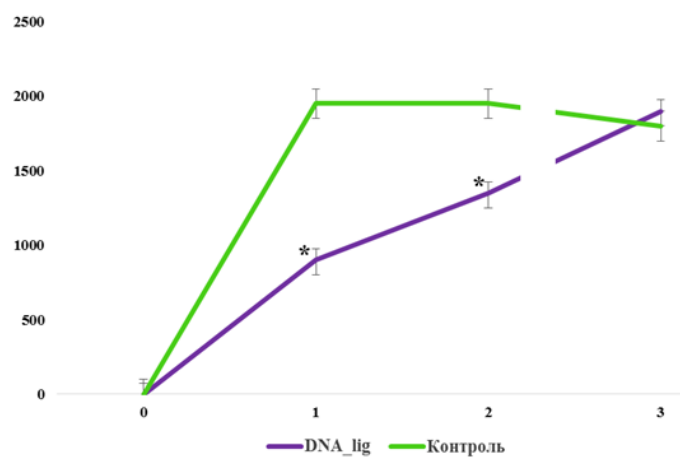
По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество мигрировавших клеток спонтанно или по направлению к CXCL12

** - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).*



а



б

Рис.4 Динамика DNA_lig - индуцированного хемотаксиса и спонтанной миграции клеточной линии K562 в камере Бойдена, размер пор 5 мкм(а) и 8мкм (б)

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество мигрировавших клеток спонтанно или по направлению к CXCL12

** - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).*

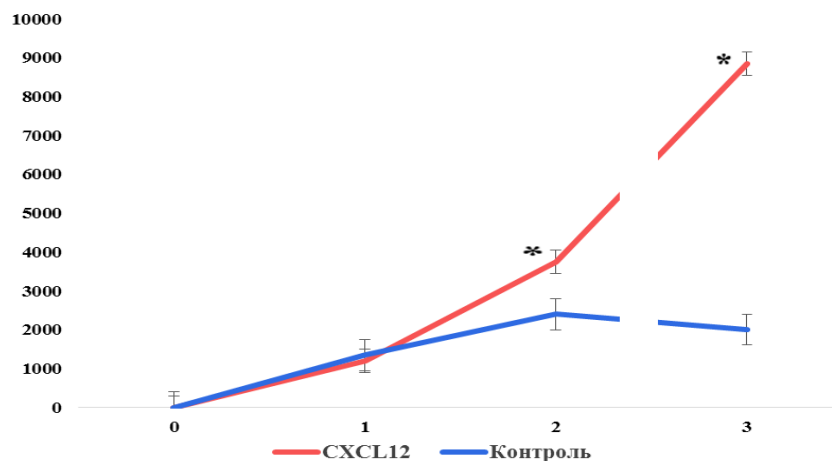
3.2 Хемотаксис клеток опухолевых линий Reh и K562 к CXCL12

Динамика хемотаксиса по направлению к CXCL12 нарастает на протяжении всего эксперимента, что соответствует динамике в контроле. Достоверных отличий от контроля на 10 минуте и 60 минуте эксперимента нет. Количество мигрировавших клеток по направлению к CXCL12 достоверно выше от контроля через 24 часа в 1,2 раза.

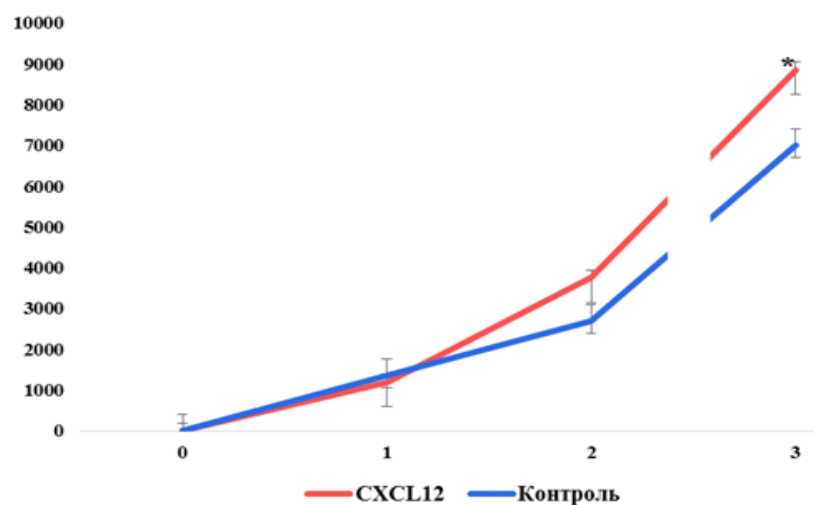
Хемотаксис по направлению к CXCL12 нарастает на протяжении всего эксперимента. Динамика миграции в контроле увеличивается в течение часа постепенно, затем постепенно снижается в течение суток. Достоверных отличий от контроля на 10 минуте эксперимента нет. Количество мигрировавших клеток по направлению к CXCL12 достоверно выше контроля через 60 минут и 24 часа в 1.6 и 4.4. раза. (рис.5)

Динамика хемотаксиса по направлению к CXCL12 нарастает на протяжении часа, в течение 24 часов падает. Динамика миграции в контроле увеличивается в течение часа постепенно, что соответствует динамике в контроле. Количество мигрировавших клеток достоверно отличается в 1.4 раза через 24 часа. Через 10 минут и 24 часа миграции достоверных отличий нет.

Динамика хемотаксиса по направлению к CXCL12 нарастает на протяжении всего эксперимента, что соответствует динамике в контроле. Количество мигрировавших клеток по направлению к CXCL12 достоверно выше контроля через 10, 60 минут и 24 часа в 2, 1.3 и 1.3 раз соответственно. (рис.6)



а



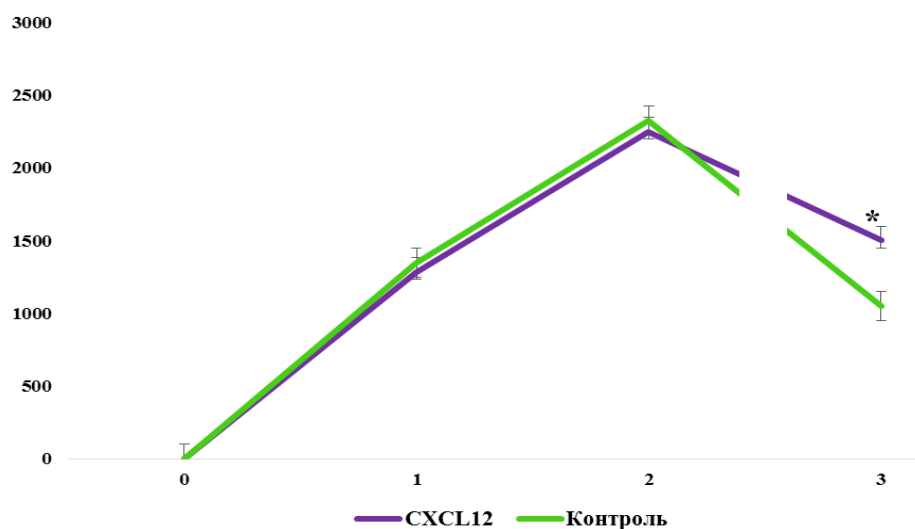
б

Рис.5 Динамика CXCL12 - индуцированного хемотаксиса и спонтанной миграции клеточной линии Reh в камере Бойдена, размер пор 5 мкм(а) и размер пор 8 мкм(б)

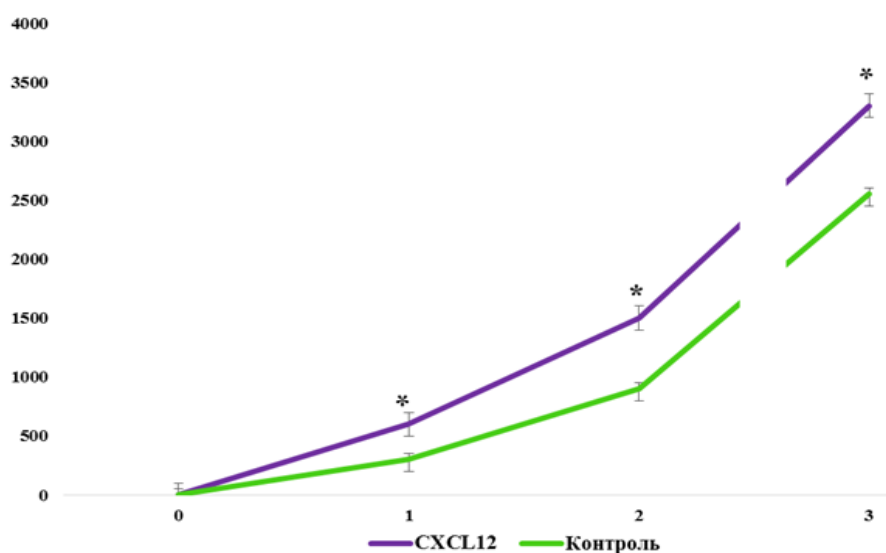
По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество мигрировавших клеток спонтанно или по направлению к CXCL12

** - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).*



а



б

Рис.6 Динамика CXCL12 - индуцированного хемотаксиса и спонтанной миграции клеточной линии K562 в камере Бойдена, размер пор 8 мкм(а) и 5 мкм(б)

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество мигрировавших клеток спонтанно или по направлению к CXCL12 * - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$)

На первом этапе нами был исследован индуцированный хемотаксис с использованием DNA_lig и CXCL12 и спонтанная миграция клеток опухолевых линий Reh и K562 с использованием камеры Бойдена с размерами пор 5 мкм и 8 мкм. Данный эксперимент проводился с целью подбора оптимальных условий - размер пор для дальнейших исследований по хемотаксису МНК, выделенных от здоровых пациентов, а также выделенных от пациентов с ОМЛ. Также была поставлена задача выявить влияние DNA_lig на возможную миграцию опухолевых клеток, так как ранее такие работы не проводились.

По результатам серии проведенных экспериментов было выявлено, что для исследования миграции и хемотаксиса клеточной линии K562 по направлению к DNA_lig возможно использование камеры Бойдена с порами 5 и 8 мкм, что подтверждается высокой достоверностью хемотаксиса через 10 и 60 минут, а также незначительным разбросом по количеству мигрировавших клеток при использовании разных пор. Также выявлено, что DNA_lig подавляет хемотаксис опухолевых клеток через 10 и 60 минут. Нами показано, что для исследования хемотаксиса клеток линии Reh по направлению к DNA_lig камера с размерами пор 8 мкм не является оптимальным вариантом, в связи с отсутствием достоверности на 10 и 60 минуте исследования, а также высоким разбросом между мигрировавшими клетками в камере с размером пор 5 мкм и 8 мкм, что может указывать на неоптимально подобранную камеру. В свою очередь для исследования индуцированного хемотаксиса по направлению к DNA_lig возможно использование камеры с размером пор 5 мкм в связи с высокой достоверностью.

Второй этап отработки методов исследования был проведен на серии экспериментов с использованием CXCL12 и камер Бойдена с разными размерами пор. После проведения серии экспериментов было выявлено, что камера Бойдена с размером пор 8 мкм не является оптимальным вариантом для исследования хемотаксиса клеточных линий Reh и K562 в связи с низкой достоверностью результатов. Исследования с использованием пор 5 мкм показали высокую достоверность в миграции обеих линий, а также, что CXCL12 частично

положительно влияет на миграцию клеток K562. Динамика хемотаксиса клеток линии Reh под действием хемокина также растет и количество мигрировавших клеток достоверно выше контроля.

Таким образом хемокин CXCL12 положительно влияет на хемотаксис клеточных линий K562 и Reh, усиливая хемотаксис, в то время как DNA_lig для данных опухолевых линий является ингибитором хемотаксиса.

3.3 Экспрессия гена CXCL12 в клетках K562

Проводя серию экспериментов по хемотаксису, мы опирались на ранее немногочисленные проведенные исследования, в которых изучался хемотаксис некоторых опухолевых линий лейкоза. Большинство из них указывают на положительную роль хемокина CXCL12 в хемотаксисе и метастазировании опухолевых клеток, что также подтверждено в наших экспериментах по хемотаксису опухолевых линий K562 и Reh, однако, не так давно стали появляться данные, что не всегда вышеназванный хемокин ведет к усилению хемотаксису. В связи с тем, что данные по хемотаксису опухолевых клеток лейкоза разнятся в различных источниках, нами было проведено исследование экспрессии факторов врожденного иммунитета в клетках K562, мигрировавших по направлению к CXCL12, а также в спонтанно мигрировавших клетках.

Нами было показано, что хемотаксис клеток K562 под действием CXCL12 значительно выше, чем миграция в контроле, в связи с чем нами была изучена экспрессия гена CXCL12 в контроле и индуцированном хемотаксисе. Было выявлено, что экспрессия гена CXCL12 в мигрировавших клетках под действием CXCL12 на 10 минуте и 60 минуте в 10 и 24 раз ниже и через 24 часа в 5 раз выше экспрессии в спонтанно мигрировавших образцах. (рис.7)

В наших исследованиях было замечено, что динамика миграции опухолевых клеток в контроле клеточной линии K562 также является положительной, несмотря на то, что в нижней камере не находилось хемоаттрактантов. Таким образом, нами была исследована экспрессия CXCL12 в

мигрировавших клетках K562. Была выявлена высокая экспрессия гена CXCL12 в спонтанно мигрировавших клетках, а также статистически значимая прямая корреляционная зависимость миграции от экспрессии гена. В связи вышеописанным можно говорить о том, что клетки лейкоза самостоятельно вырабатывают достаточное количество CXCL12 для аутоактивации рецепторов и дальнейшей миграции, в то время как под воздействием CXCL12 экспрессия гена данного хемокина значительно достоверно отличается от контроля, что может указывать на обратную отрицательную связь.

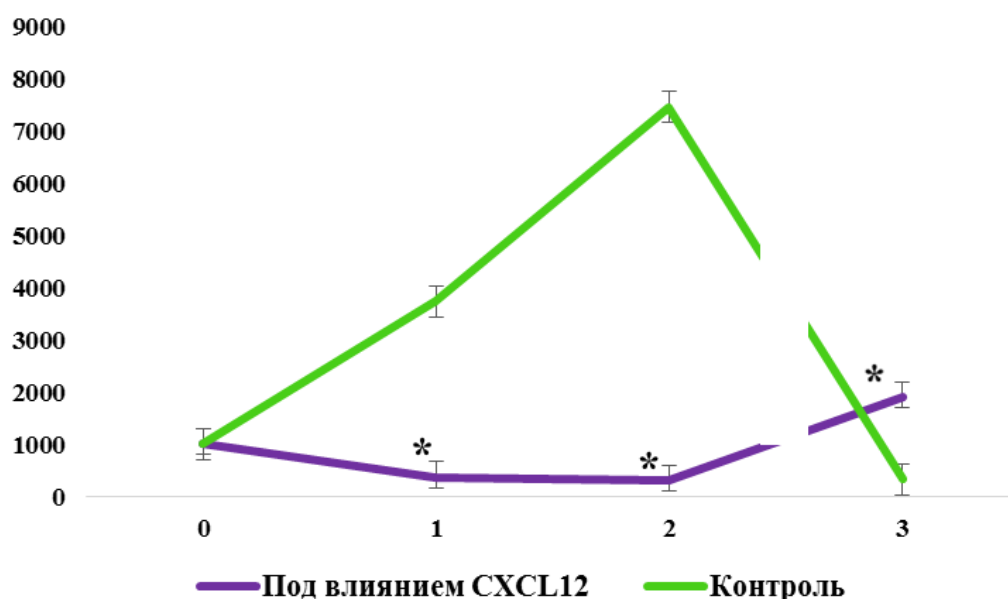


Рис.7 Экспрессия гена CXCL12 в линии K562 под действием CXCL12

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество копий

** - показатель достоверно отличается от такового в интактных*

3.4 Хемотаксис моноклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров и от пациентов с острым миелоидным лейкозом до начала химиотерапии

Миграция МНК, выделенных от здоровых доноров, по направлению к DNA_lig достоверно выше относительно контроля через 10 минут и 24 часа в 1,3 и 1,8 раз соответственно. Миграция МНК, выделенных от здоровых доноров, относительно DNA_lig достоверно ниже в 6 раз через 60 минут.(рис.8) Хемотаксис МНК здоровых доноров, по направлению к CXCL12 достоверно выше контроля через 10 минут, 60 минут и 24 часа в 1.5, 1.8 и 2.7 раз соответственно. (рис.9)

Хемотаксис МНК, выделенных от пациентов с острым миеломонобластным лейкозом, к DNA_lig достоверно не отличается от контроля на протяжении всего эксперимента (через 10 минут, 60 минут и 24 часа). (рис.8) Миграция МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ до начала химиотерапии, по направлению к CXCL12 достоверно ниже контроля через 60 минут и 24 часа в 1.8 и 1.4 раза соответственно. Через 10 минут данные между миграцией по направлению к CXCL12 и контролем недостоверны. (рис.10)

Миграция МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ через три недели от окончания первого курса химиотерапии, по направлению к CXCL12 достоверно ниже контроля через 60 минут в 1.6 раз. Через 10 минут и 24 часа данные между миграцией по направлению к CXCL12 и контролем недостоверны. (рис.11)

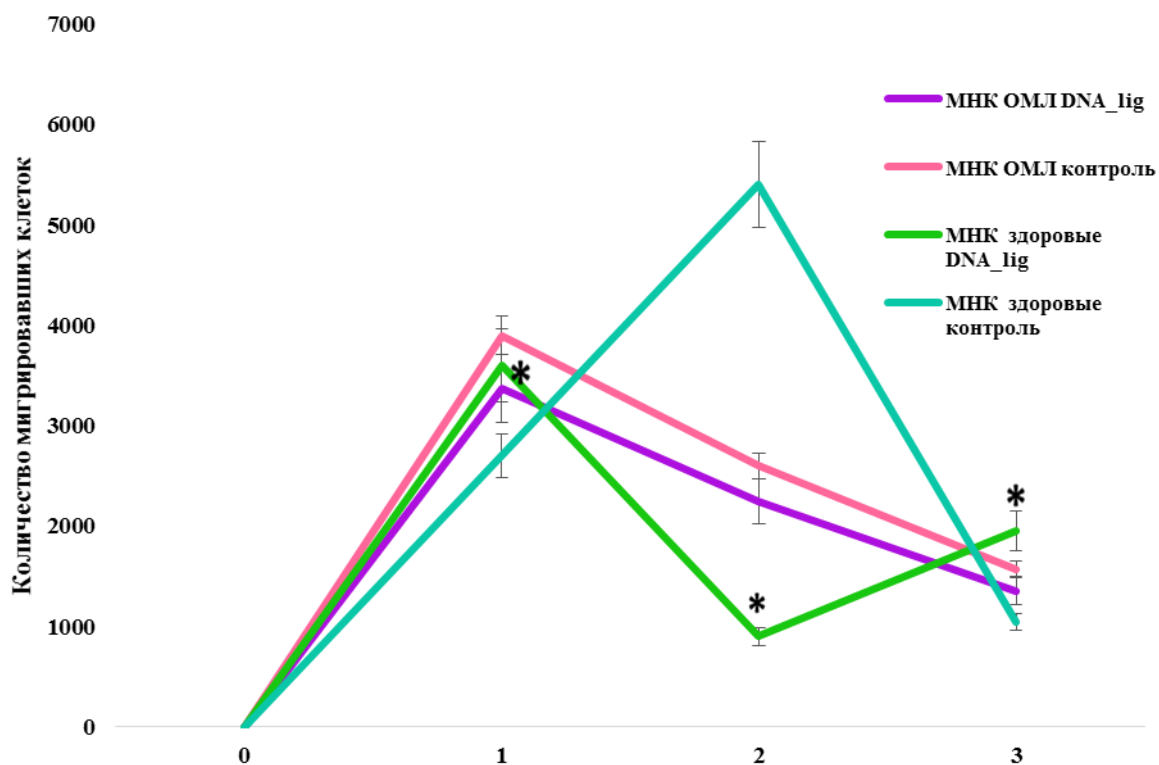


Рис.8 Динамика миграции МНК, выделенных от здоровых доноров, от пациентов с ОМЛ до начала по направлению к DNA_lig

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 30 мин; 3 – 60 мин

По оси ординат – количество мигрировавших клеток спонтанно или по направлению к CXCL12

* - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).

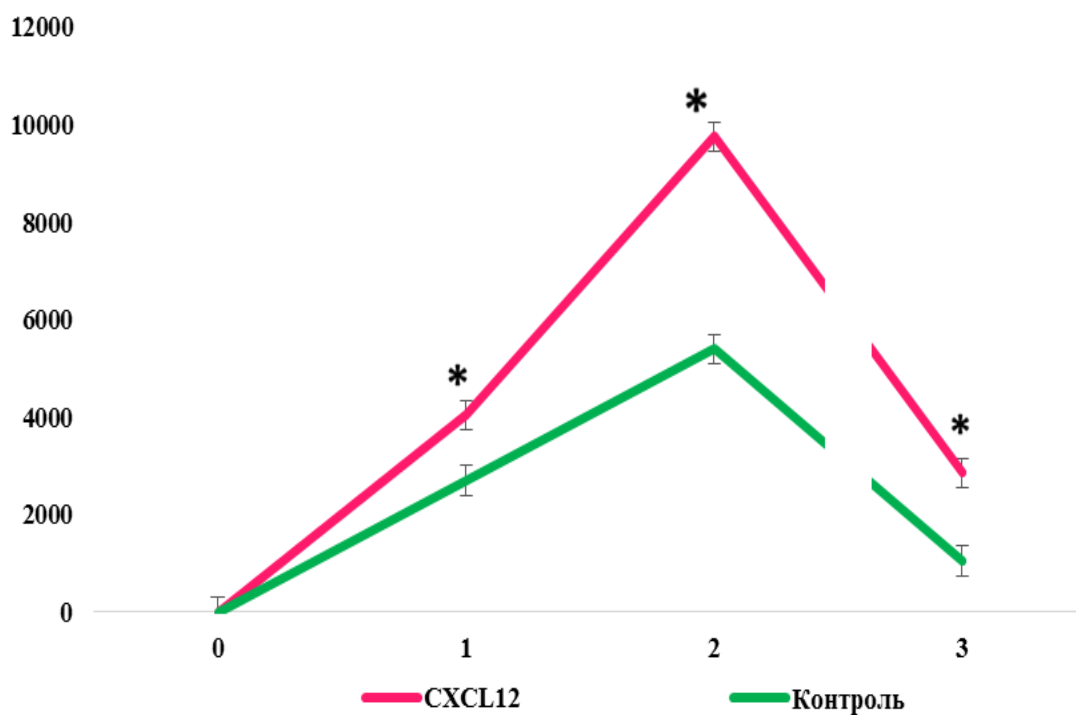


Рис.9 Динамика миграции МНК, выделенных от здоровых доноров по направлению к CXCL12.

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 30 мин; 3 – 60 мин

По оси ординат – количество мигрировавших клеток спонтанно или по направлению к CXCL12

* - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).

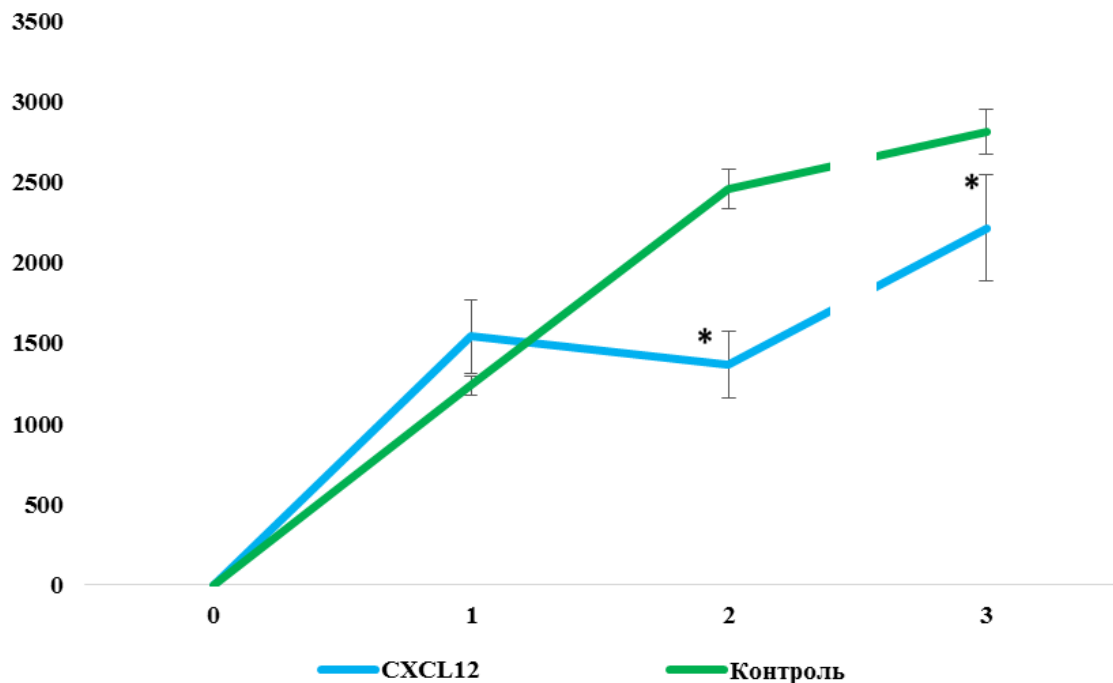


Рис.10 Динамика миграции МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ до начала химиотерапии по направлению к CXCL12.

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 30 мин; 3 – 60 мин

По оси ординат – количество мигрировавших клеток спонтанно или по направлению к CXCL12

* - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$)

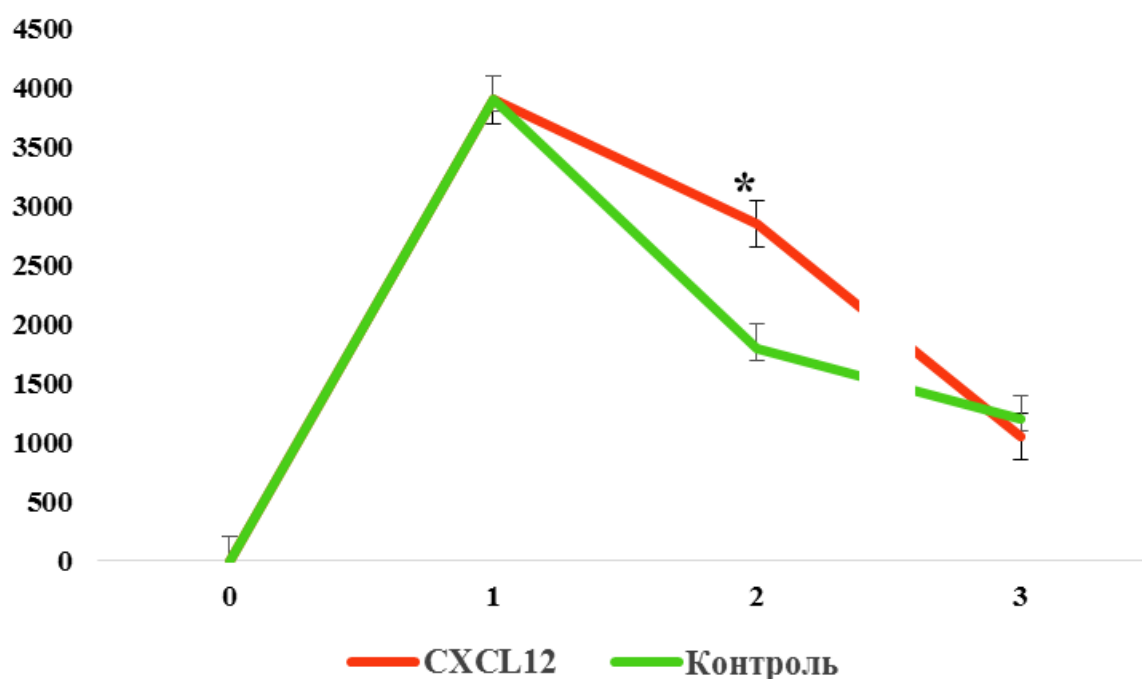


Рис.11 Динамика миграции МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ после проведения химиотерапии по направлению к CXCL12.

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 30 мин; 3 – 60 мин

По оси ординат – количество мигрировавших клеток спонтанно или по направлению к CXCL12

* - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).

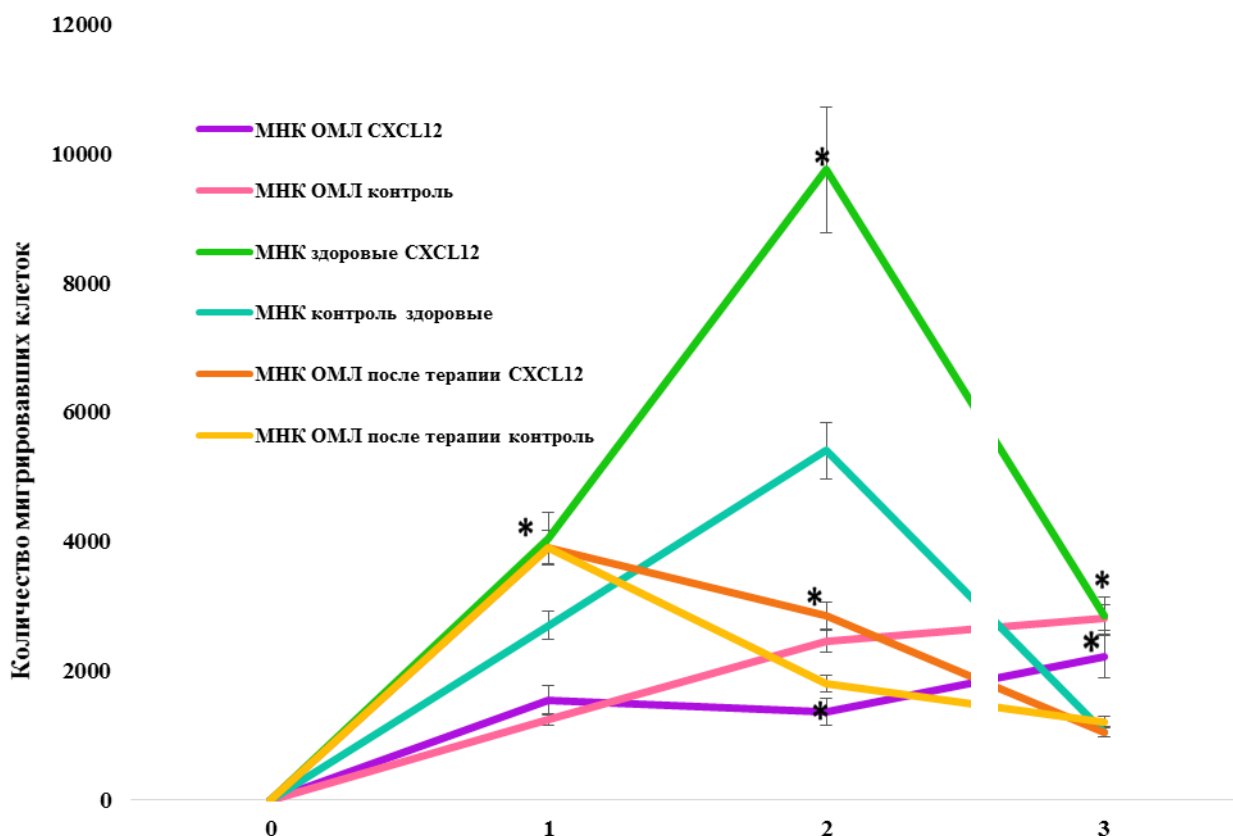


Рис.12 Сравнение хемотаксиса МНК, выделенных от здоровых доноров и от пациентов с ОМЛ до начала и после химиотерапии по направлению к CXCL12.

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 30 мин; 3 – 60 мин

По оси ординат – количество мигрировавших клеток спонтанно или по направлению к CXCL12

** - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).*

**Показатели мигрировавших МНК, выделенных от здоровых доноров,
от пациентов до и после химиотерапии.**

Количество мигрировавших клеток к CXCL12 через 10 минут	
МНК, выделенные от следующих групп пациентов	CXCL12
Здоровые (n=25)	4050 # (3800 - 4600)
ОМЛ до химиотерапии (n=10)	1541 (1300-2000)
ОМЛ после химиотерапии (n=10)	3900 (3000- 4200)
Количество мигрировавших клеток к CXCL12 через 60 минут	
МНК, выделенные от следующих групп пациентов	CXCL12
Здоровые (n=25)	9750 # (8660-10150)
ОМЛ до химиотерапии (n=10)	1367 # (1000 – 1500)
ОМЛ после химиотерапии (n=10)	2850# (2500-3150)
Количество мигрировавших клеток к CXCL12 через 24 часа	
МНК, выделенные от следующих групп пациентов	CXCL12
Здоровые (n=25)	2850 # (2200-3050)
ОМЛ до химиотерапии (n=10)	2217 # (1960 – 2750)
ОМЛ после химиотерапии (n=10)	1050 (930 – 1200)

- показатель достоверно отличается от контроля ($p \leq 0,05$).

Хемотаксис МНК здоровых пациентов по направлению к CXCL12 достоверно выше хемотаксиса МНК от пациентов с ОМЛ до химиотерапии через 10 и 60 минут в 2.6 и 7.1 соответственно, через 24 часа статистически значимой достоверности нет. Миграция МНК здоровых пациентов по направлению к CXCL12 выше хемотаксиса МНК пациентов после химиотерапии через 60 минут и 24 часа в 3.4 и 2.7 раз соответственно, через 10 минут статистически значимой достоверности нет. Показано, что хемотаксис МНК от пациентов с ОМЛ после химиотерапии достоверно выше хемотаксиса МНК от пациентов через 10 и 60 минут в 2.5 и 2 раза соответственно, и ниже в 2.1 раз через 24 часа. (табл.4) В ходе серии проведенных нами экспериментов не было выявлено статистически значимых отличий между DNA_lig - индуцированным хемотаксисом МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ от контроля, несмотря на то, что ранее нами было показано, что хемотаксис клеточной линии K562 значимо снижается под воздействием данного лиганда. Нами предполагается, что данные различия продиктованы в первую очередь разной степенью дифференцировки клеток – клетки линии K562 относятся к более ранним предшественникам, эритроидно-миелоидным, в то время как клетки ОМЛ (M4) относятся к более поздним миеломоноцитарным предшественникам. В связи с полученными статистически незначимыми данными по хемотаксису клеток пациентов с ОМЛ, нами сделан вывод об отсутствии влияния DNA_lig на хемотаксис клеток в данном типе лейкоза. Также нами было показано, что DNA_lig является одним из возможных ингибиторов миграции МНК от здоровых доноров.

На следующем этапе была проведена серия экспериментов, направленная на исследование влияния CXCL12 на хемотаксис МНК, выделенных от здоровых доноров; пациентов с ОМЛ до химиотерапии и от пациентов с ОМЛ через 3 недели после окончания первого курса химиотерапии. Было показано, что количество мигрировавших МНК здоровых доноров относительно CXCL12 статистически значимо превышает количество мигрировавших клеток в контроле на протяжении всего эксперимента, в то время как влияние хемокина на хемотаксис МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ до химиотерапии, отрицательно и снижает хемотаксис как относительно контроля, так и

относительно хемотаксиса здоровых клеток. После воздействия химиотерапии миграционная активность частично возвращается, но также не достигает уровней значения хемотаксиса МНК здоровых пациентов.

В отличие от ранних исследований, сфокусированных в основном на усилении хемотаксиса злокачественных клеток хемокином CXCL12, в нашей работе было продемонстрировано противоположный эффект вышеназванного хемокина. Также не так давно канадскими учеными Luke J. Drury и др. было продемонстрировано, что CXCL12 может иметь антиметастатический эффект, в проведенном ими исследованиями было показано что экзогенный CXCL12 является мощным ингибитором метастазирования при онкологических заболеваниях. Таким образом дальнейшей задачей второго этапа нашего исследования стояло исследовать экспрессию факторов врожденного иммунитета, которые могут влиять на хемотаксис, а также могут способствовать прогрессии опухолевых клеток.

3.5 Экспрессия генов CXCL12, CCR4, EGFR, TLR9 в мононуклеарных клетках, выделенных от здоровых доноров и пациентов с острым миелоидным лейкозом до и после химиотерапии

В настоящее время недостаточно данных о влиянии рецепторов не хемокинового ряда, а также взаимовлиянии гетерологичных рецепторов на хемотаксис опухолевых клеток. В связи с этим нами была изучена экспрессия рецепторов врожденного иммунитета под воздействием DNA_lig и CXCL12 в МНК, выделенных от здоровых доноров, а также от пациентов с ОМЛ до и после химиотерапии.

Экспрессия гена CXCL12 в мигрировавших МНК здоровых пациентов как в контроле так и под действием хемокина CXCL12 достоверно не отличалась через 10 и 60 минут. Динамика экспрессии гена CXCL12 в МНК через 24 часа под воздействием CXCL12 была достоверно ниже контроля в 10 раз. (рис.13)

Экспрессия гена CCR4 под действием CXCL12 достоверно выше контроля 10 минут и ниже через 24 часа в 900 и 427 раз соответственно. Экспрессия CCR4 в мигрировавших МНК здоровых пациентов под действием хемокина CXCL12 достоверно не отличалась через 60 минут эксперимента. (рис.14) Экспрессия гена EGFR в МНК, выделенных от здоровых пациентов достоверно выше контроля через 60 минут в 23 раза. Через 10 минут и 24 часа экспрессия EGFR статистически не достоверна. (рис.15) Экспрессия гена TLR9 в МНК, выделенных от здоровых пациентов достоверно выше контроля через 24 часа в 7 раз. Через 10 и 60 минут экспрессия гена TLR9 статистически не достоверна. (рис.16)

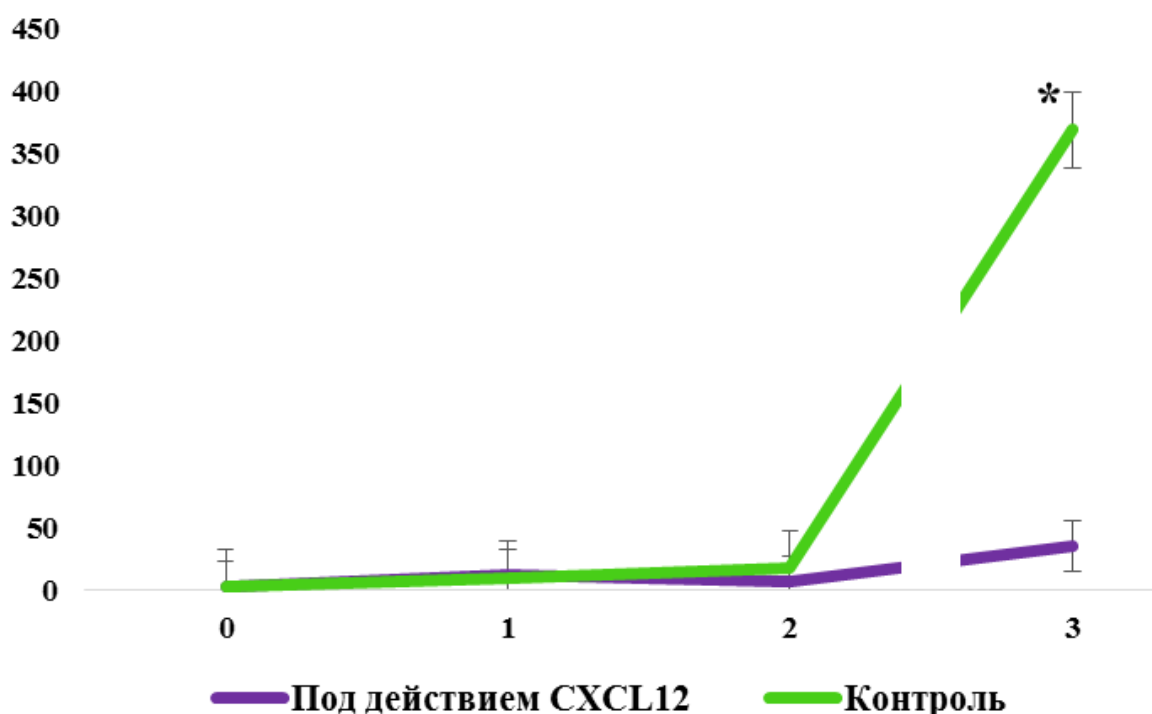


Рис.13 Динамика экспрессии CXCL12 в МНК, выделенных от здоровых доноров

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество копий

* - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).

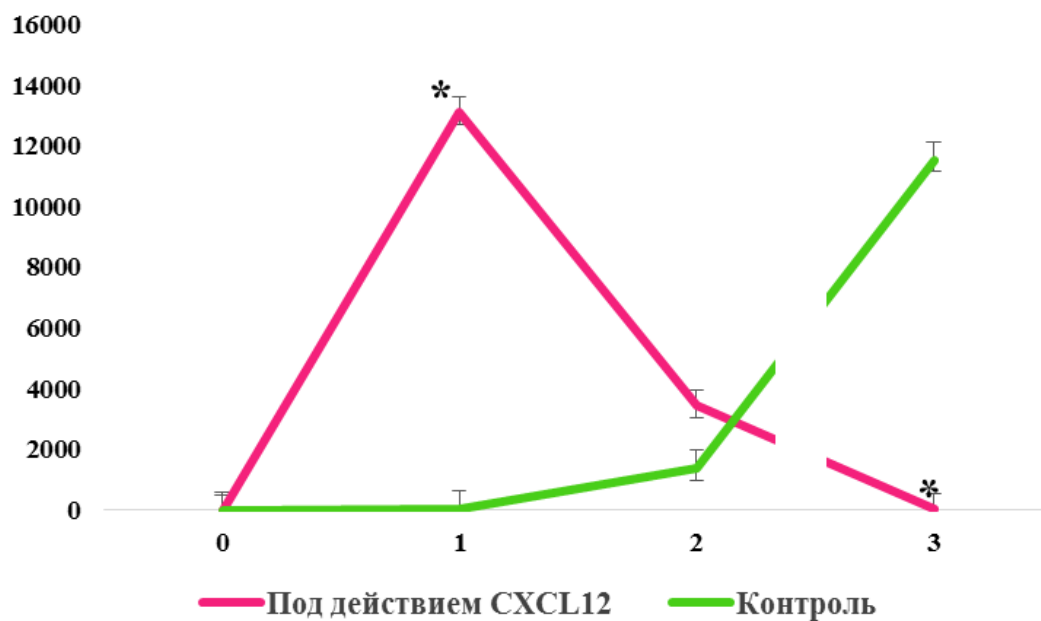


Рис.14 Динамика экспрессии CCR4 в МНК, выделенных от здоровых доноров

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество копий

* - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).

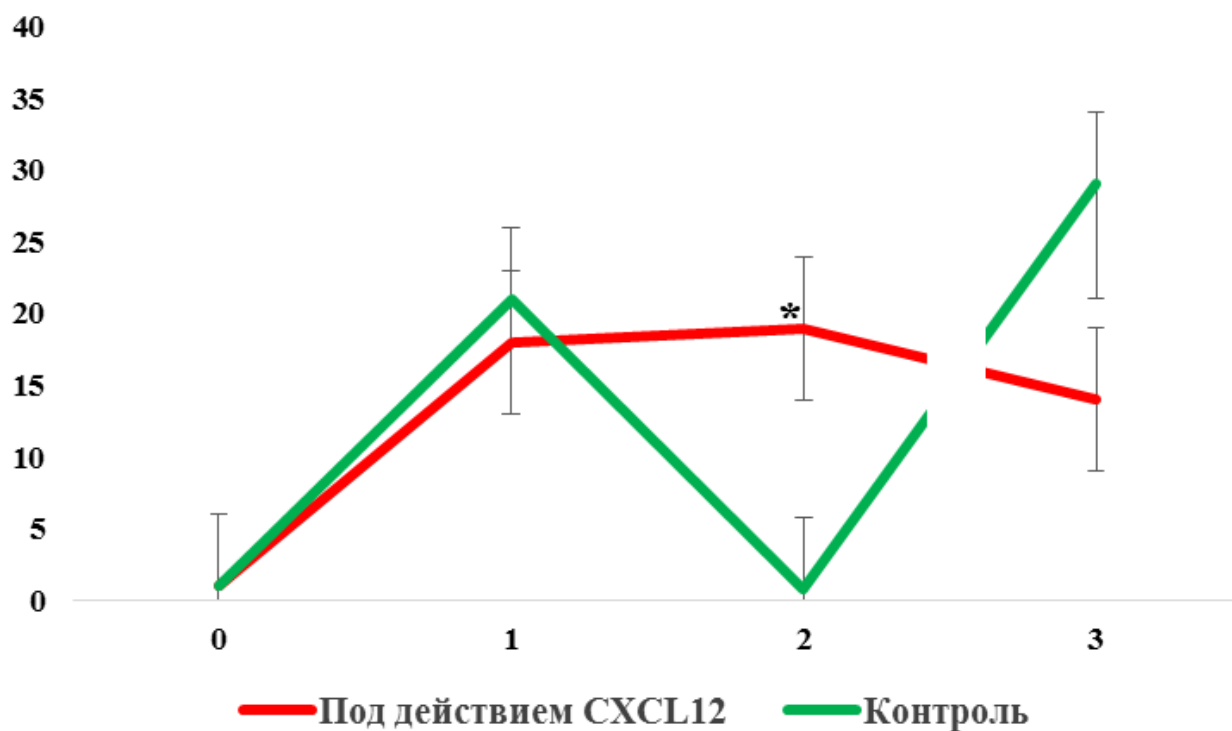


Рис.15 Динамика экспрессии EGFR в МНК, выделенных от здоровых доноров

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество копий

* - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).

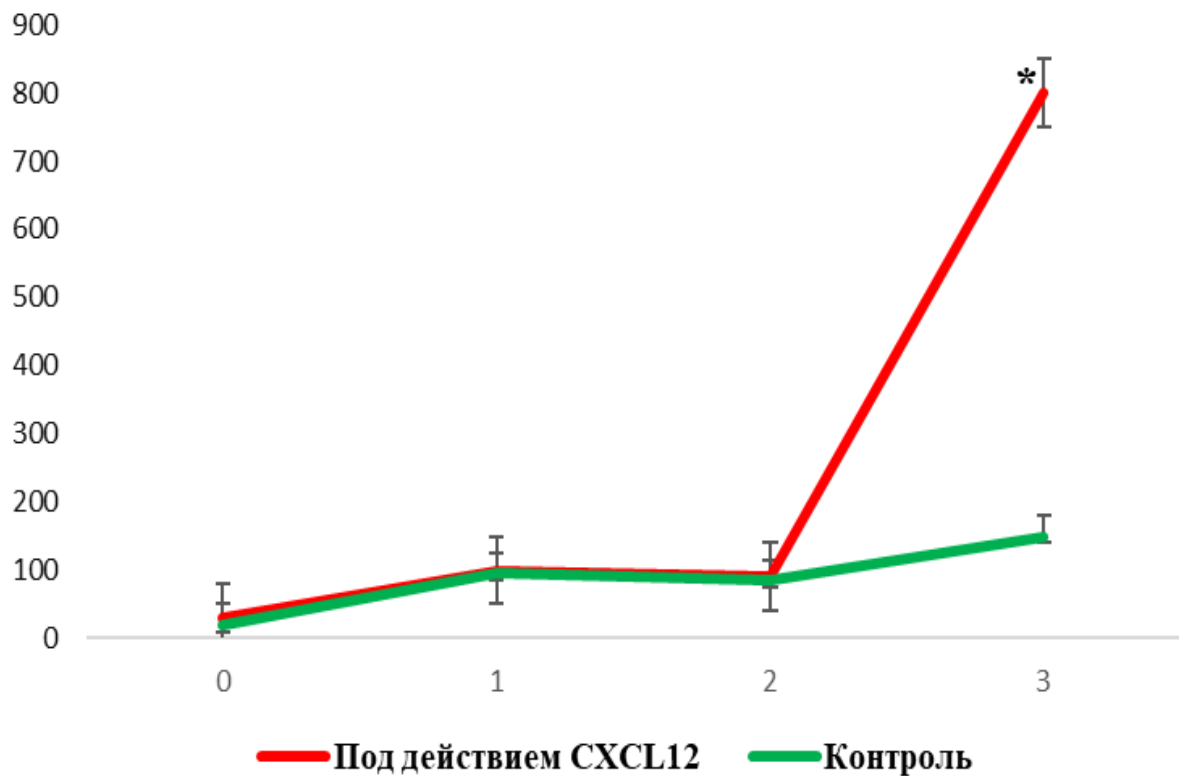


Рис.16 Динамика экспрессии TLR9 под действием CXCL12 в МНК здоровых доноров

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество копий

* - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).

Экспрессия гена *CXCL12* в мигрировавших МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ до химиотерапии, под действием CXCL12 была достоверно ниже контроля через 10, 60 минут и 24 часа в 16, 3.9 и 24.4 раз соответственно. (рис.17) Была выявлена высокая отрицательная корреляционная зависимость хемотаксиса МНК от пациентов с ОМЛ до химиотерапии с экспрессией гена *CXCL12* через 60 минут и 24 часа ($rs = 0,75$).

Показано, что экспрессия гена *CXCL12* в мигрировавших МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ после химиотерапии, под действием CXCL12 была достоверно ниже контроля через 60 минут и 24 часа в 2.9 и 5.9 раз соответственно. Достоверных отличий экспрессии *CXCL12* под воздействием CXCL12 от контроля через 10 минут не было. (рис.17)

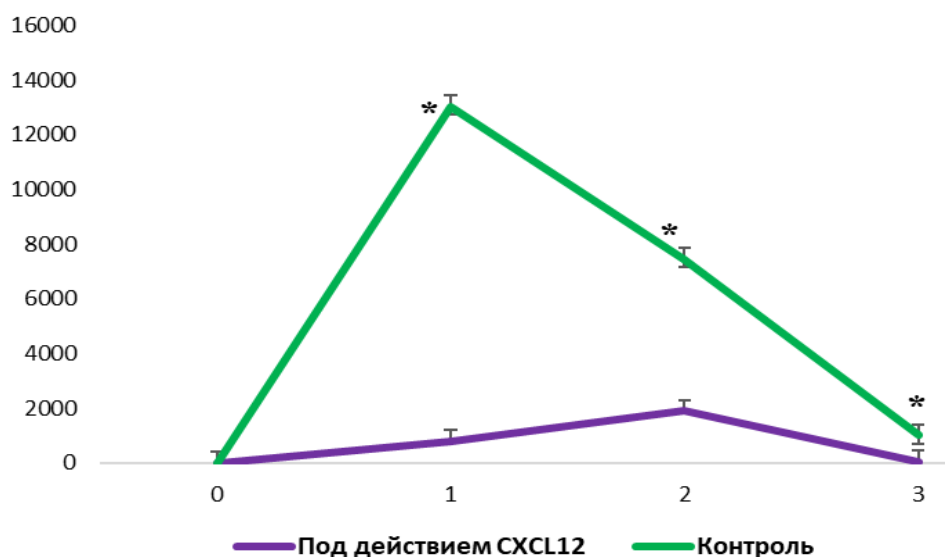
Экспрессия гена *CCR4* в мигрировавших МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ до начала химиотерапии, под действием CXCL12 была достоверно выше контроля через 10 минут в 39,3 раза и ниже через 24 часа в 5128 раз. Через 60 минут данные между экспрессией гена *CCR4* в клетках, мигрировавших по направлению к CXCL12 и контролем недостоверны. Экспрессия гена *CCR4* в мигрировавших МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ после химиотерапии, под действием CXCL12 была достоверно ниже контроля через 10 минут в 4 раза и выше через 24 часа в 2,1 раз. Через 60 минут данные между экспрессией гена *CCR4* в клетках, мигрировавших по направлению к CXCL12 и контролем недостоверны. (рис.18)

Установлено, что экспрессия гена *EGFR* в мигрировавших МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ до начала химиотерапии, под действием CXCL12 была достоверно ниже контроля через 10 минут в 8,3 раз. Через 60 минут и 24 часа данные между экспрессией *EGFR* в клетках, мигрировавших по направлению к CXCL12 и контролем недостоверны.

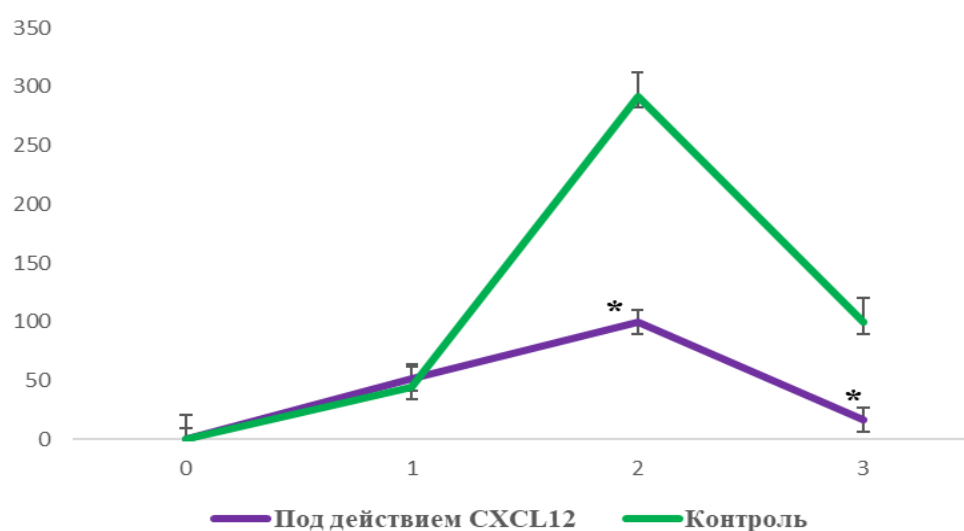
Экспрессия гена *EGFR* в мигрировавших МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ после химиотерапии, под действием CXCL12 была достоверно выше контроля через 10 минут в 12,8 раза и ниже через 60 раз в 5 раз. Через 24 часа

минут данные между экспрессией EGFR в клетках, мигрировавших по направлению к CXCL12 и контролем недостоверны. (рис.19)

На следующем этапе была определена экспрессия гена *TLR9* в мигрировавших МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ до начала химиотерапии, под действием CXCL12 была достоверно ниже контроля через 10 минут в 576 раз и в 187.5 раз выше контроля через 24 часа. Через 60 минут между экспрессией *TLR9* в клетках, мигрировавших по направлению к CXCL12 и контролем недостоверны. Экспрессия гена *TLR9* в мигрировавших МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ после химиотерапии, под действием CXCL12 достоверно не отличается от контроля на протяжении всего эксперимента. (рис.20)



а



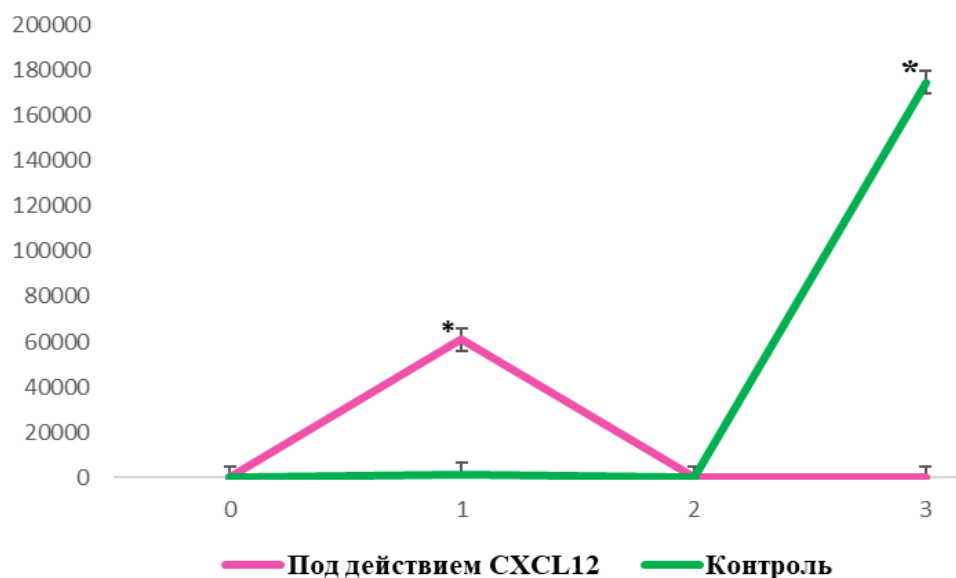
б

Рис.17 Динамика экспрессии CXCL12 под действием CXCL12 в МНК пациентов до химиотерапии (а) и после (б)

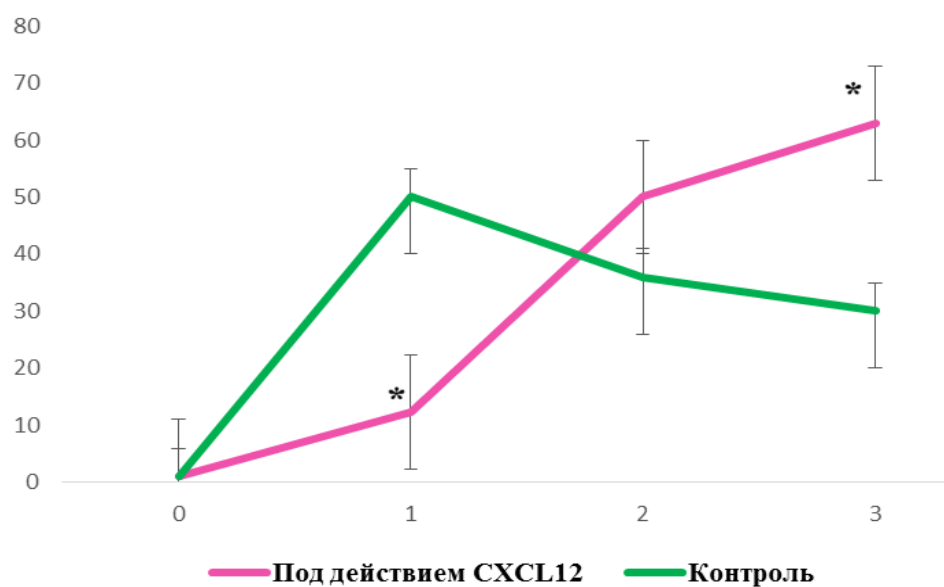
По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество копий

** - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).*



а



б

Рис.18 Динамика экспрессии *CCR4* под действием CXCL12 в МНК пациентов до химиотерапии (а) и после (б)

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество копий

* - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).

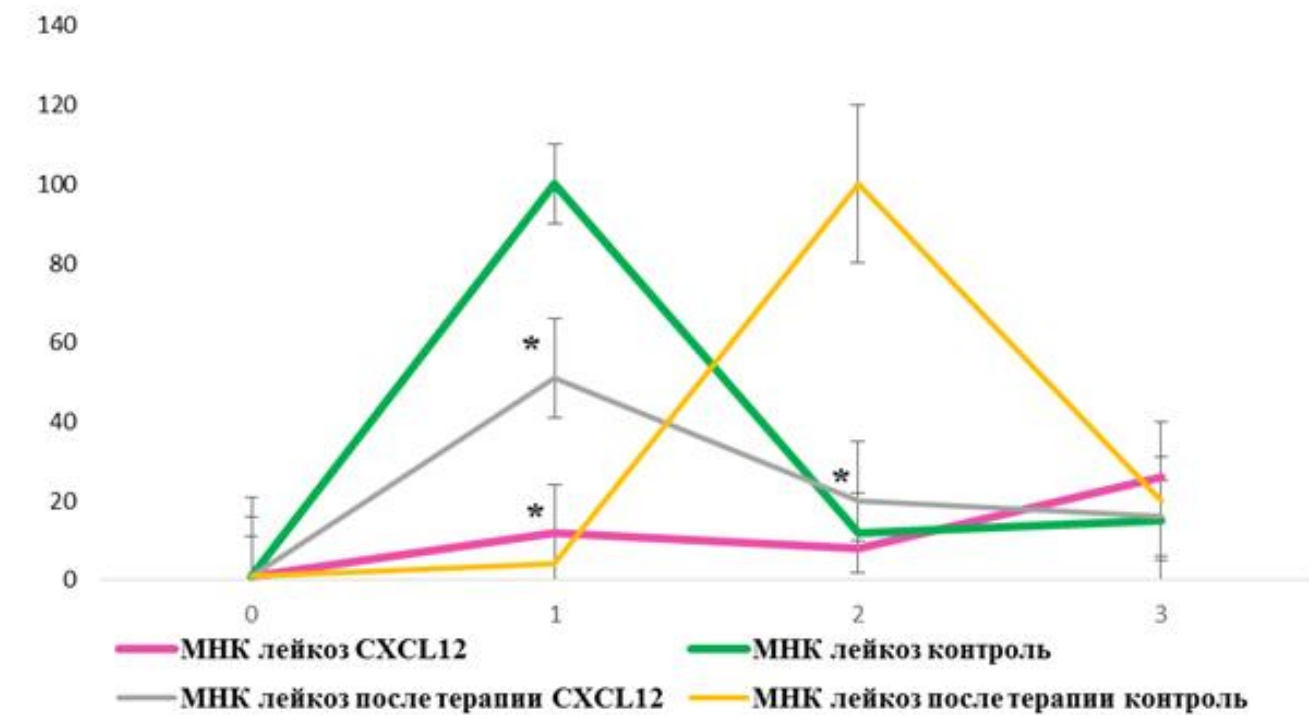
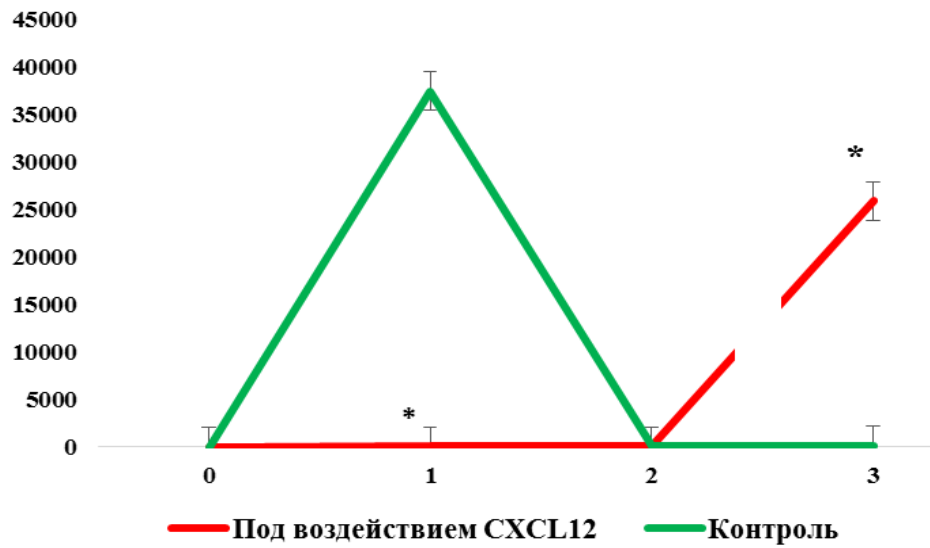


Рис.19 Динамика экспрессии *EGFR* под действием CXCL12 в МНК пациентов до и после химиотерапии

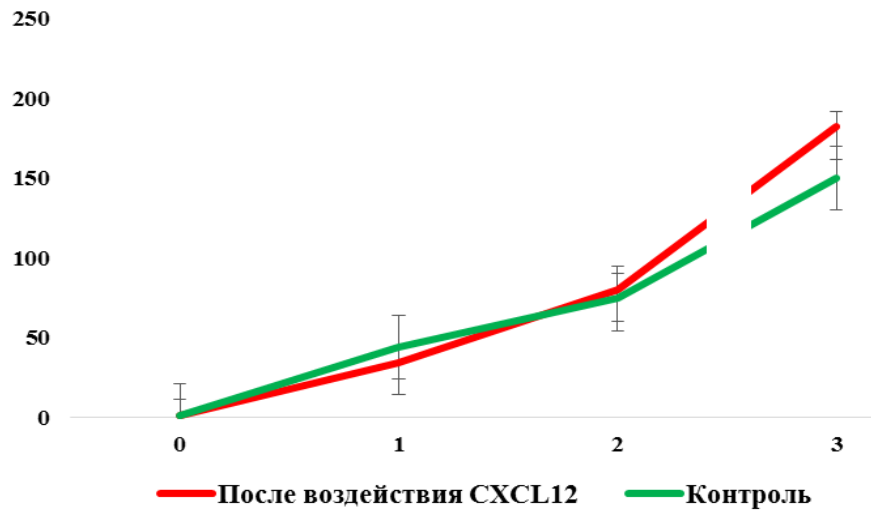
По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество копий

* - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).



а



б

Рис.20 Динамика экспрессии *TLR9* под действием CXCL12 в МНК пациентов до химиотерапии (а) и после (б)

По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток: 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество копий

* - показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ($p \leq 0,05$).

Нами были получены данные о сниженной экспрессии CXCL12 в МНК от здоровых доноров, что объясняет высокую чувствительность клеток к данному хемокину и высокий уровень мигрировавших клеток к CXCL12, в то время как конститутивная экспрессия гена CXCL12 в клетках ОМЛ до химиотерапии говорит о возможном высоком уровне выработки данного хемокина самой опухолевой клеткой. Введенный извне CXCL12 приводит к снижению экспрессии, а также к отсутствию чувствительности клеток на хемокин CXCL12. После проведенной химиотерапии конститутивная экспрессия остается также высокой, однако, уровень экспрессии ниже чем в МНК до химиотерапии. Вышесказанное указывает на возможную причину низкого уровня хемотаксиса по направлению к CXCL12.

Нами была исследована экспрессия CCR4 под воздействием CXCL12, так как в китайском исследовании, проведенном Yan Zhang с соавт. было показано, что активация CCR4 способствует интернализации CXCR4, который является рецептором CXCL12, что может приводить к снижению хемотаксиса опухолевых клеток, а также к неответственности клетки на воздействия CXCL12. Было показано, что экспрессия CCR4 в МНК здоровых доноров под действием CXCL12 повышается на 10 минут, затем снижается, что соответствует результатам полученным для экспрессии в МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ до химиотерапии. В МНК от пациентов с ОМЛ после химиотерапии уровень как конститутивной так и индуцированной экспрессии CCR4 значительно ниже, при этом динамика экспрессии под действием CXCL12 положительная. Данные по экспрессии CCR4 при активации хемокином CXCL12 указывают на взаимосвязь гетерологичных рецепторов и подтверждает теорию о возможных путях снижения метастазирования опухолевых клеток не только путем ингибирования рецепторов CXCL12.

Нами также был выбран рецептор EGFR, так как на настоящий момент ингибиторы этого рецептора используются для лечения немелкоклеточного рака легких и поджелудочной железы и есть сообщения и попытки использования данных препаратов при ОМЛ, однако, исследования Daniel J. DeAngelo и соавт. показали низкую эффективность этих препаратов. Наши исследования показали

высокий уровень снижения экспрессии EGFR под действием CXCL12 в МНК от пациентов с ОМЛ до химиотерапии через 10 минут от начала эксперимента, после проведения химиотерапии экспрессия вышеуказанного рецептора выше под действием CXCL12 выше чем в контроле. Снижение экспрессии EGFR под действием CXCL12 является одной из возможных причин неответаемости пациентов с ОМЛ на ингибиторы EGFR.

Динамика экспрессии TLR9 под действием в МНК пациентов с ОМЛ до химиотерапии соответствует динамике экспрессии в МНК здоровых доноров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день остро стоит вопрос о лечении онкологических заболеваний, в том числе и лейкозов. Роль факторов врожденного иммунитета в опухолевом процессе активно изучается последнее десятилетие, и из многочисленных исследований показано, что эта роль является немаловажной.

Немалое количество онкологических заболеваний связано с инфекцией или с хроническим воспалительным процессом, вызванным инфекцией. Большинство инфекционных агентов является для организма PAMPs, которые распознаются TLRs, которые относятся к факторам врожденного иммунитета.

Существует значительное количество работ, направленных на изучение влияния TLRs на онкогенез, результаты которых достаточно неоднозначны: показана как отрицательная так и положительная роли рецепторов в развитии опухолевого процесса.

Известно, что отрицательная роль связана с активацией антиапоптотических сигнальных путей, а также активной выработкой хемокинов, которые способствуют миграции опухолевых клеток и может приводить к иммунной толерантности.

Таким образом, TLRs и хемокины, а так же их рецепторы, активно участвуют в онкогенезе, при том, что окончательная роль выяснена не до конца. Касаясь особой группы онкологических заболеваний, таких как лейкозы, при анализе данных исследований последних десятилетий, было выявлено, что относительно них роль факторов врожденного иммунитета в своей совокупности изучена в меньшем объеме, чем в других группах онкологических заболеваний.

В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования стало изучение влияния факторов врожденного иммунитета, таких как CXCL12 и лиганда TLR9 на хемотаксис опухолевых клеток, а также экспрессию CXCL12, EGFR, TLR9, CCR4, так как указанные факторы предположительно значимо влияют на хемотаксис опухолевых клеток, в дальнейшем на метастазирование, но при этом их взаимовлияние друг на друга не было изучено.

В связи с этим был проведен комплексный подход. Нами были выбраны опухолевые линии Reh и K562, набраны пациенты с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии, здоровые доноры.

На первом этапе изучался хемотаксис опухолевых линий K562 и Reh по направлению к DNA_lig, который является лигандом TLR9, и по направлению к CXCL12 с использованием камеры Бойдена с разными размерами пор (5 и 8 мкм). Было выявлено, что лиганд TLR9 значительно снижает хемотаксис клеток обеих линий, в то время как CXCL12 усиливает хемотаксис Reh и K562.

На втором этапе исследования хемотаксиса установлено, что вводимый извне CXCL12 *in vitro* снижает хемотаксис МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ (М4) до химиотерапии, после воздействия химиотерапии хемотаксис частично восстанавливается, однако не до значений хемотаксиса МНК, выделенных от здоровых доноров.

На третьем этапе оценивалась экспрессия таких факторов врожденного иммунитета как CCR4, CXCL12, TLR9, EGFR в мигрировавших клетках МНК от пациентов с ОМЛ до химиотерапии, после химиотерапии и здоровых доноров по направлению к CXCL12.

По результатам третьего этапа исследования было выявлено, что в МНК пациентов с ОМЛ экспрессия CXCL12 конститутивно высокая, что объясняет низкую миграционную активность при введении извне CXCL12 в связи с десенсибилизацией рецепторов и неответчивости на данный хемокин. После воздействия химиотерапии уровень конститутивной экспрессии CXCL12 значительно снижался, что указывает на высокую значимость проведенной химиотерапии в хемотаксисе опухолевых клеток. Также было выявлено, что экспрессия CCR4 увеличивается под действием CXCL12 как в МНК здоровых пациентов, так и в МНК пациентов от пациентов с ОМЛ до и после химиотерапии. Полученные данные указывают на активацию гетерологичных рецепторов как в здоровых клетках, так и опухолевых. Проведенный анализ экспрессии EGFR в МНК пациентов с ОМЛ до химиотерапии показал, что экспрессия данного рецептора под действием CXCL12 значительно снижается относительно контроля, в то время как в МНК от пациентов с ОМЛ после терапии прямо противоположная картина,

что указывает на сильное подавление данным хемокином на экспрессию EGFR в клетках лейкоза. Что касается экспрессии TLR9 под действием CXCL12, то значимых отличий между экспрессией в МНК здоровых доноров и МНК от пациентов с ОМЛ не обнаружено, в то время как в МНК от пациентов с ОМЛ до химиотерапии результаты недостоверны.

По данным литературы проведены многочисленные исследования, которые указывают на возможность использования препаратов ингибиторов рецепторов CXCL12 и EGFR для достижения снижения метастазирования. Если на настоящий момент достаточно исследований, направленных на ингибирование рецепторов CXCL12, которые рассматривают данные препараты как один из дополнительных этапов лечения, то, к сожалению применение ингибиторов EGFR до сих пор носит неоднозначный характер. И нами продемонстрирован один механизм снижения ответности на ингибиторы EGFR - влияние CXCL12 снижает экспрессию данного рецептора. Также нами показано ингибирование хемотаксиса путем использования лиганда TLR9 в клеточных опухолевых линиях, что также может использоваться как дополнительная мишень воздействия.

Из вышесказанного следует, что хемотаксис лейкозных клеток не так однозначен, как считалось еще пять лет назад. Существуют дополнительные пути регуляции данного процесса, такие как перекрестная десенситизация рецепторов, что может приводить к нечувствительности данных клеток такими методами лечения как применение пептидных ингибиторов рецепторов хемотаксиса, в частности CXCR4 и EGFR. Вследствие этого перед применением дополнительных методов лечения, направленных на блокировку рецепторов врожденного иммунитета, необходимо проводить персонализированный подход к каждому пациенту с исследованием уровня экспрессии данных рецепторов и хемокина CXCL12.

ВЫВОДЫ

1. Создана модель для исследования хемотаксиса, которая позволяет оценить и выявить индивидуальные особенности миграционной активности как клеточных линий, так и опухолевых клеток.
2. Установлено разнонаправленное действие CXCL12 и лиганда TLR9 на хемотаксис клеток различных опухолевых культур (K562 и Reh), так CXCL12 активировал хемотаксис клеточных линий, в то время как лиганд TLR9 приводил к ингибированию миграционной активности. Таким образом, полученная система может быть использована для оценки препаратов, влияющих на хемотаксис опухолевых клеток.
3. Показан индуцированный хемотаксис мононуклеарных клеток здоровых доноров относительно лиганда TLR9 и CXCL12 в 1,5 и более раз в динамике.
4. Определено снижение хемотаксиса МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ до начала химиотерапии, по направлению к CXCL12, при этом миграция к лиганду TLR9 – не отличалась относительно контроля. После проводимой терапии динамика миграции МНК пациентов с острым миелобластным лейкозом практически не отличалась от показателей в группе здоровых доноров.
5. В спонтанно мигрировавших мононуклеарных клеток, выделенных от пациентов с ОМЛ (М4) показана прямая корреляционная зависимость уменьшения хемотаксиса от экспрессии гена CXCL12, что говорит о потенциальной роли этого фактора врожденного иммунитета в качестве прогностического маркера эффективности терапии.
6. Показаны увеличение экспрессии гена гетерологичного рецептора CCR4 и снижение экспрессии гена EGFR в МНК пациентов с ОМЛ (М4) до химиотерапии под воздействием CXCL12, при этом следует отметить, что после проводимой терапии экспрессионные профили меняют свое направление, что коррелировало с эффективностью проводимого лечения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

МДС – миелодиспластический синдром

В - ХЛЛ – В-лимфоцитарный хронический лейкоз

ПРГШ – плоскоклеточный рак головы и шеи

Т-ОЛЛ Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз

АОМ/DSS – azoxymethane / dextran sulfate sodium

CAF - cancer-associated fibroblast

CLA - cutaneous lymphocyte antigen

DAMPs – damage-associated molecular patterns

DCs – dendritic cells (дендритные клетки)

EGFR – epidermal growth factor receptor

ERK1/2 – extracellular signal-regulated kinase 1/2

CpG-ODN – oligodeoxynucleotide agonists

HSPC – hematopoietic stem and progenitor cells

JAK/STAT – Janus kinase/signal transducers and activators of transcription

PAMPs – pathogen-associated molecular pattern

TLRs – Toll-like receptors

VEGF –vascular endothelial growth factor

IL-1 β – Interleukin 1 beta

IRAK –interleukin-1 receptor-associated kinase

siRNA – small interfering RNA

TIR –The Toll/interleukin-1 receptor

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гланц Стентон. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – С. 459.
2. Ковальчук Л. В., Игнатьева Г. А., Ганковская Л. В. Иммунология: практикум: учеб. пособие. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 176.
3. Льюин Б. Клетки. – М.: БИНОМ. Лаборат. Знаний, 2011. – С. 951.
4. Сташкевич, Д. С., Филиппова Ю. Ю., Бурмистрова А. Л. Актуальные вопросы иммунологии: система цитокинов, биологическое значение, генетический полиморфизм, методы определения: учеб. пособие. – Челябинск: Цицеро. – С. 82.
5. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство – М.:БИНОМ. Лаборат. Знаний, 2010 – С. 691.
6. Ярилин, А.А. Иммунология. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010 – С. 752.
7. Airolidi I. CXCR5 may be involved in the attraction of human metastatic neuroblastoma cells to the bone marrow / I. Airolidi, C. Cocco, F. Morandi, I. Prigione, V. Pistoia. // Cancer Immunol. Immunother. – 2008. – V. 57(4). – P. 541–548.
8. Akashi T. Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer / T. Akashi, K. Koizumi, K. Tsuneyama, I. Saiki, Y. Takano, H. Fuse // Cancer Sci. – 2008. – V. 99(3). – P. 539–542.
9. Amersi F.F. Activation of CCR9/CCL25 in cutaneous melanoma mediates preferential metastasis to the small intestine / F.F. Amersi, A.M. Terando, Y. Goto, R.A. Scolyer, J.F. Thompson, A.N. Tran, M.B. Faries, D.L. Morton, D.S. Hoon // Clin. Cancer Res. – 2008. – V. 14(3). – P. 638–645.

10. Andersson A. IL-7 promotes CXCR3 ligand-dependent T cell antitumor reactivity in lung cancer / A. Andersson, S-C. Yang, M. Huang, L. Zhu, U.K. Kar, R.K. Batra et al. // J Immunol. – 2009. – V. 182. – P. 6951–6958.
11. Ansel K.M. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles / K.M. Ansel, V.N. Ngo, P.L. Hyman, S.A. Luther, R. Forster, J.D. Sedgwick, J.L. Browning, M. Lipp, J.G. Cyster // Nature. – 2000. – V. 406(6793). – P. 309–314
12. Apte R.N. Is interleukin-1 a good or bad ‘guy’ in tumor immunobiology and immunotherapy? / R.N. Apte, E. Voronov / Immunol Rev. – 2008. – V. 222. – P. 222–241.
13. Arigami T. CCR7 and CXCR4 expression predicts lymph node status including micrometastasis in gastric cancer / T. Arigami, S. Natsugoe, Y. Uenosono, S. Yanagita, H. Arima, M. Hirata, S. Ishigami, T.Aikou // Int. J. Oncol. – 2009. – V. 35(1). – P. 19–24.
14. Baines J. Immune-mediated tumor regression induced by CpG-containing oligodeoxynucleotides / J. Baines, E. Celis // Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2003. – V. 9. – P. 2693–2700.
15. Ballas Z.K. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA / Z.K. Ballas, W.L. Rasmussen, A.M. Krieg // J Immunol. – 1996. – V. 157. – P. 1840–1845.
16. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer / F. Balkwill // Nat Rev Cancer. – 2009. – V. 9. – P. 361–371.
17. Bauer A.K. Toll-like receptor 4 in butylated hydroxytoluene-induced mouse pulmonary inflammation and tumorigenesis / A.K. Bauer et al. // Journal of the National Cancer Institute. – 2005. – V. 97. – P. 1778–1781.

18. Biswas S.K. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm / S.K. Biswas, A. Mantovani // *Nat Immunol.* – 2010. – V. 11. – P. 889–896.
19. Bender G.N. Malignant melanoma: patterns of metastasis to the small bowel, reliability of imaging studies, and clinical relevance / G.N. Bender, D.D. Maglinte, J.H. McLarney, D. Rex, F.M. Kelvin // *Am. J. Gastroenterol.* – 2001. – V. 96(8). – P. 2392–2400.
20. Blecker D. Melanoma in the gastrointestinal tract / D. Blecker, S. Abraham, E.E. Furth, M.L. Kochman // *Am. J. Gastroenterol.* – 1999. – V. 94(12). – P. 3427–3433.
21. Bolitho C. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor / C. Bolitho, M.A. Hahn, R.C. Baxter, D.J. Marsh // *Endocr Relat Cancer.* – 2010. – V. 17(4). – P. 929–940.
22. Bos P.D. Transient regulatory T cell ablation deters oncogene-driven breast cancer and enhances radiotherapy / P.D. Bos, G. Plitas, D. Rudra, S.Y. Lee, A.Y. Rudensky // *J Exp Med.* – 2013. – V. 210. – P. 2435–2466.
23. Brignole C. Therapeutic targeting of TLR9 inhibits cell growth and induces apoptosis in neuroblastoma / C. Brignole et al. // *Cancer research.* – 2010. – V. 70. – P. 9816–9826.
24. Bruce J. Patterns of recurrent disease in breast cancer / J. Bruce, D.C. Carter, J. Fraser // *Lancet.* – 1970. – V. 1(7644). – P. 433–435.
25. Bruns P. Die Heilwirkung des Erysipelas auf Geschwülste / P. Bruns // *Beitr Klin Chir.* – 1888. – V. 3. – P. 443.
26. Buonamici S. CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia / S. Buonamici, T. Trimarchi, M.G. Ruocco, L. Reavie, S. Cathelin et al. // *Nature.* – 2009. – V. 459(7249). – P. 1000–1004.
27. Cabioglu N. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer / N. Cabioglu, M.S. Yazici, B. Arun, K.R.

- Broglia, G.N. Hortobagyi, J.E. Price, A. Sahin // Clin. Cancer Res. – 2005. – V. 11(16). – P. 5686–5693.
28. Cai Z. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth / Z. Cai et al. // Cancer research. – 2011. – V. 71. – P. 2466–2475.
29. Cambien B. Organ-specific inhibition of metastatic colon carcinoma by CXCR3 antagonism / B. Cambien, B.F. Karimjee, P. Richard-Fiardo, H. Bziouech, R. Barthel et al. // Br. J. Cancer. – 2009. – V. 100(11). – P. 1755–1764.
30. Campanella G.S. CXCL10 can inhibit endothelial cell proliferation independently of CXCR3 / G.S. Campanella, R.A. Colvin, A.D. Luster // PLoS One. – 2010. – V. 5. – P. e12700.
31. Carpentier A. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice / A. Carpentier, L. Chen, F. Maltonti, J. Delattre // Cancer research. – 1999. – V. 59. – P. 5429–5432.
32. Cataisson C. IL-1R-MyD88 signaling in keratinocyte transformation and carcinogenesis / C. Cataisson et al. // The Journal of experimental medicine. – 2012. – V. 209. – P. 1689–1702.
33. Chen H.J. Chemokine 25-induced signaling suppresses colon cancer invasion and metastasis / H.J. Chen, R. Edwards, S. Tucci, P. Bu, J. Milsom, S. Lee, W. Edelmann, Z.H. Gümüs, X. Shen, S.J. Lipkin // Clin Invest. – 2012. – V. 122(9). – P. 3184–3196.
34. Cherfils-Vicini J. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance / J. Cherfils-Vicini et al. // The Journal of clinical investigation. – 2010. – V. 120. – P. 1285–1297.
35. Chin A.I. Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance / A.I. Chin et al. // Cancer research. – 2010. – V. 70. – P. 2595–2603.

36. Chew V. Toll-like receptor 3 expressing tumor parenchyma and infiltrating natural killer cells in hepatocellular carcinoma patients / V. Chew et al. // Journal of the National Cancer Institute. – 2012. – V. 104. – P. 1796–1807.
37. Coley W.B. Treatment of inoperable malignant tumors with the toxins of erysipelas and the Bacillus prodigiosus / W.B. Coley // Trans Amer Surg Assn. – 1894. – V. 12. – P. 183–212.
38. Comerford I. Advances in understanding the pathogenesis of autoimmune disorders: focus on chemokines and lymphocyte trafficking / I. Comerford, E.E. Kara, D.R. McKenzie, S.R. McColl // Br. J. Haematol. – 2014. – V. 164. – P. 329–341.
39. Coussens L.M. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? / L.M. Coussens, L. Zitvogel, A.K. Palucka // Science. – 2013. – V. 339. – P. 286–291.
40. Cunningham H.D. Expression of the C-C chemokine receptor 7 mediates metastasis of breast cancer to the lymph nodes in mice / H.D. Cunningham, L.A. Shannon, P.A. Calloway, B.C. Fassold, I. Dunwiddie, G. Vielhauer, M. Zhang, C.M. Vines // Transl Oncol. – 2010. – V. 3(6). – P. 354–361.
41. Curiel T.J. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival / T.J. Curiel, G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram et al. // Nat Med. – 2004. – V. 10. – P. 942–949.
42. Dajon, M., Iribarren, K., & Cremer, I. (2017). Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. Immunobiology, 222(1), 89–100.
43. Dapito D.H. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4 / D.H. Dapito et al. // Cancer Cell. – 2012. – V. 21. – P. 504–516.
44. Darash-Yahana M. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis / M. Darash-Yahana, E. Pikarsky, R.

- Abramovitch, E. Zeira, B. Pal, R. Karplus et al. // *FASEB J.* – 2004. – V. 18. – P. 1240–1242.
45. Das S. Tumor cell entry into the lymph node is controlled by CCL1 chemokine expressed by lymph node lymphatic sinuses / S. Das, E. Sarrou, S. Podgrabinska, M. Cassella, S.K. Mungamuri, N. Feirt et al. // *J Exp Med.* – 2013. – V. 210. – P. 1509–1528.
 46. Dimberg A. The Chemokine System in Experimental and Clinical Hematology / A. Dimberg // Springer; 2010. Chemokines in angiogenesis; pp. 59–80. .
 47. Ding Y. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma / Y. Ding, Y. Shimada, M. Maeda, A. Kawabe, J. Kaganoi et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – V. 9(9). – P. 3406–3412.
 48. Droemann D. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9 / D. Droemann et al. // *Respiratory research.* – 2005. – V. 6. – P. 1.
 49. Dubrovskaya A. CXCR4 expression in prostate cancer progenitor cells / A. Dubrovskaya, J. Elliott, R.J. Salamone, G.D. Teleguev, A.E. Stakhovsky et al. // *PloS one.* – 2012. – V. 7(2). – P. e31226.
 50. Eisenhardt A. Expression analysis and potential functional role of the CXCR4 chemokine receptor in bladder cancer / A. Eisenhardt, U. Frey, M. Tack, D. Roskopf, G. Lummen, H. Rubben, W. Siffert // *Eur. Urol.* – 2005. – V. 47(1). – P. 111–117.
 51. Engl T. CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through alpha5 and beta3 integrins / T. Engl, B. Relja, D. Marian, C. Blumenberg, I. Muller et al. // *Neoplasia.* – 2006. – V. 8(4). – P. 290–301.
 52. Fabbri M. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response / M. Fabbri et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – V. 109. – P. E2110–2116.

53. Facciabene A. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells / A. Facciabene, X. Peng, I.S. Hagemann, K. Balint, A. Barchetti, L-P. Wang et al. // *Nature*. – 2011. – V. 475. – P. 226–30.
54. Forte G. Polyinosinic-polycytidylic acid limits tumor outgrowth in a mouse model of metastatic lung cancer / G. Forte et al. // *J Immunol*. – 2012. – V. 188. – P. 5357–5364.
55. Franco R. CXCR4-CXCL12 and VEGF correlate to uveal melanoma progression / R. Franco, G. Botti, M. Mascolo, G. Loquercio, G. Liguori et al. // *Front Biosci (Elite Ed)*. – 2010. – V. 2. – P. 13–21.
56. Fukata M. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors / M. Fukata et al. // *Gastroenterology*. – 2007. – V.133. – P. 1869–1881.
57. Furusato B. CXCR4 and cancer / B. Furusato, A. Mohamed, M. Uhlen, J.S. Rhim // *Pathol. Int*. – 2010. – V. 60(7). – P. 497–505.
58. Galluzzi L. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy / L. Galluzzi et al. // *Oncoimmunology*. – 2012. – V. 1. – P. 699–716.
59. Garaude J. Simultaneous targeting of toll- and nod-like receptors induces effective tumor-specific immune responses / J. Garaude, A. Kent, N. van Rooijen, J.M. Blander // *Science translational medicine*. – 2012. – V.4. – P. 120
60. Gibson S.J. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod / S.J. Gibson et al. // *Cellular immunology*. – 2002. – V. 218. – P. 74–86.
61. Gill S.S. Small intestinal neoplasms / S.S. Gill, D.M. Heuman, A.A. Mihas // *J. Clin. Gastroenterol*. – 2001. – V. 33(4). – P. 267–282.
62. Gilmore T.D. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction / T.D. Gilmore // *Oncogene*. – 1999. – V. 18. – P. 6842–6844.
63. Goldszmid RS, Trinchieri G. The price of immunity // *Nat Immunol*. – 2012 – V.13 – P. 932–938.

64. González-Martín A. Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells / A. González-Martín, L. Gómez, J. Lustgarten, E. Mira, S. Mañes // *Cancer Res.* – 2011. – V. 71. – P. 5455–5466.
65. Goutagny N. Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy / N. Goutagny, Y. Estornes, U. Hasan, S. Lebecque, C. Caux // *Targeted oncology.* – 2012. – V. 7. – P. 29–54.
66. Grivennikov S.I. Immunity, inflammation, and cancer / S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin // *Cell.* – 2010. – V. 140(6). – P. 883–899.
67. Groom J.R. CXCR3 in T cell function / J.R. Groom, A.D. Luster // *Exp Cell Res.* – 2011. – V. 317. – P. 620–631.
68. Hanahan D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. Weinberg // *Cell.* – 2011. – V. 144. – P. 646–674.
69. Harris N.L. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group / N.L. Harris, E.S. Jaffe, H. Stein, P.M. Banks, J.K. Chan et al. // *Blood.* – 1994. – V. 84(5). – P. 1361–1392.
70. Hasan U.A. Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is antagonized by type I IFNs / U.A. Hasan et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – V. 104. – P. 8047–8052.
71. Hartmann G. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells / G. Hartmann, G.J. Weiner, A.M. Krieg // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1999. – V. 96. – P. 9305–9310.
72. Heckelsmiller K. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model / K. Heckelsmiller et al. // *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950).* – 2002. – V. 169. – P. 3892–3899.

73. Hemmi H. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway / H. Hemmi et al. // *Nat Immunol.* – 2002. – V. 3. – P. 196–200.
74. Hennessy E.J. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? / E.J. Hennessy, A.E. Parker, L.A. O'Neill // *Nat Rev Drug Discov.* – 2010. – V. 9. – P. 293–307.
75. Hensbergen P.J. The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity in vivo involving attraction of CD8⁺ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis / P.J. Hensbergen, P.G.B. Wijnands, M.W. Schreurs, R.J. Scheper, R. Willemze, C.P. Tensen // *J Immunother.* – 2005. – V. 28. – P. 343–351.
76. Hoerning A. Subsets of human CD4⁺ regulatory T cells express the peripheral homing receptor CXCR3 / A. Hoerning, K. Koss, D. Datta, L. Boneschansker, C.N. Jones, I.Y. Wong et al. // *Eur J Immunol.* – 2011. – V. 41. – P. 2291–2302.
77. Homey B. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation / B. Homey, H. Alenius, A. Muller, H. Soto, E.P. Bowman et al. // *Nat. Med.* – 2002. – V. 8(2). – P. 157–165.
78. Huang B. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance / B. Huang et al. // *Cancer research.* – 2005. – V. 65. – P. 5009–5014.
79. Ignatz-Hoover J.J. The role of TLR8 signaling in acute myeloid leukemia differentiation / J.J. Ignatz-Hoover, H. Wang, S.A. Moreton, A. Chakrabarti, M.K. Agarwal et al. // *Leukemia.* – 2015. – V. 29(4). – P. 918–926.
80. Izhak L. Dissecting the autocrine and paracrine roles of the CCR2-CCL2 axis in tumor survival and angiogenesis / L. Izhak, G. Wildbaum, S. Jung, A. Stein, Y. Shaked, N. Karin // *PloS one.* – 2012. – V. 7(1). – P. e28305.
81. Je E.M. Absence of MYD88 gene mutation in acute leukemias and multiple myelomas / E.M. Je, N.J. Yoo, S.H. Lee // *Eur J Haematol.* – 2012. – V. 88 (3). – P. 273–274

82. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J. Clin.* 60, P. 277–300 (2010).
83. Jiang Y.P. Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression / Y.P. Jiang, X.H. Wu, B. Shi, W.X. Wu, G.R. Yin // *Gynecol. Oncol.* – 2006. – V. 103(1). – P. 226–233.
84. Josefowicz S.Z. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function / S.Z. Josefowicz, L-F. Lu, A.Y. Rudensky // *Annu Rev Immunol.* – 2012. – V. 30. – P. 531–564.
85. Jung S.J. Correlation between Chemokine Receptor CXCR4 Expression and Prognostic Factors in Patients with Prostate Cancer / S.J. Jung, C.I. Kim, C.H. Park, H.S. Chang, B.H. Kim, M.S. Choi, H.R. Jung // *Korean J Urol.* – 2011. – V. 52(9). – P. 607–611.
86. Kadowaki N. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN / N. Kadowaki, S. Antonenko, Y.J. Liu // *J Immunol.* – 2001. – V. 166. – P. 2291–2295.
87. Kai H. CCR10 and CCL27 are overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma / H. Kai, T. Kadono, T. Kakinuma, M. Tomita, H. Ohmatsu et al. // *Pathol. Res. Pract.* – 2011. – V. 207(1). – P. 43–48.
88. Kaifi J.T. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer / J.T. Kaifi, E.F. Yekebas, P. Schurr, D. Obonyo, R. Wachowiak et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2005. – V. 97(24). – P. 1840–1847.
89. Kajiyama H. Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma / H. Kajiyama, K. Shibata, M. Terauchi, K. Ino, A. Nawa, F. Kikkawa // *Int. J. Cancer.* – 2008. – V. 122(1). – P. 91–99.

90. Kang H. The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer / H. Kang, G. Watkins, A. Douglas-Jones, R.E. Mansel, W.G. Jiang // *The Breast*. – 2005. – V. 14. – P. 360–367.
91. Karin M. NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets / M. Karin // *Mol Carcinog*. – 2006. – V. 45. – P. 355–361.
92. Kawada K. Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes / K. Kawada, M. Sonoshita, H. Sakashita, A. Takabayashi, Y. Yamaoka et al. // *Cancer Res*. – 2004. – V. 64(11). – P. 4010–4017.
93. Kiefer F. The role of chemokines and their receptors in angiogenesis / F. Kiefer, A.F. Siekmann // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. – 2011. – V. 68(17). – P. 2811–2830.
94. Kim J. Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome / J. Kim, T. Mori, S.L. Chen, F.F. Amersi, S.R. Martinez et al. // *Ann. Surg*. – 2006. – V. 244(1). – P. 113–120.
95. Kim S. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis / S. Kim et al. // *Nature*. – 2009. – V. 457. – P. 102–106.
96. Klages K. Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma / K. Klages, C.T. Mayer, K. Lahl, C. Loddenkemper, M.W. Teng, S.F. Ngiew et al. // *Cancer Res*. – 2010. – V. 70. – P. 7788–7799.
97. Koch M.A. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation / M.A. Koch, Gs. Tucker-Heard, N.R. Perdue, J.R. Killebrew, K.B. Urdahl, D.J. Campbell // *Nat Immunol*. – 2009. – V. 10. – P. 595–602.
98. Kodama J. Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer / J. Kodama, Hasengaowa, T.

- Kusumoto, N. Seki, T. Matsuo et al. // *Ann. Oncol.* – 2007. – V. 18(1). – P. 70–76.
99. Koishi K. Persistent CXCR4 expression after preoperative chemoradiotherapy predicts early recurrence and poor prognosis in esophageal cancer / K. Koishi, R. Yoshikawa, T. Tsujimura, T. Hashimoto-Tamaoki, S. Kojima et al. // *World J Gastroenterol.* – 2006. – V. 12(47). – P. 7585–7590.
 100. Kortylewski M. In vivo delivery of siRNA to immune cells by conjugation to a TLR9 agonist enhances antitumor immune responses / M. Kortylewski et al. // *Nat Biotechnol.* – 2009. – V. 27. – P. 925–932.
 101. Krieg A.M. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer / A.M. Krieg // *Oncogene.* – 2008. – V. 27. – P. 161–167.
 102. Kryczek I. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers / I. Kryczek, A. Lange, P. Mottram, X. Alvarez, P. Cheng et al. // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65(2). – P. 465–472.
 103. Kuraishy A. Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation / A. Kuraishy, M. Karin, S.I. Grivennikov // *Immunity.* – 2011. – V. 35. – P. 467–477.
 104. Lan T. Stabilized immune modulatory RNA compounds as agonists of Toll-like receptors 7 and 8 / T. Lan et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – V. 104. – P. 13750–13755.
 105. Lau T.S. Cancer cell-derived lymphotoxin mediates reciprocal tumour-stromal interactions in human ovarian cancer by inducing CXCL11 in fibroblasts / T.S. Lau, T.K.H. Chung, T.H. Cheung, L.K.Y. Chan, L.W.H. Cheung, S.F. Yim, et al. // *J Pathol.* – 2014. – V. 232. – P. 43–56.
 106. Lee J. Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming / J. Lee et al. // *Cell.* – 2012. – V. 151. – P. 547–558.
 107. Letsch A. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis / A. Letsch, U. Keilholz, D. Schadendorf, G. Assfalg, A.M. Asemisen et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2004. – V. 122(3). – P. 685–690.

108. Li L. Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens / L. Li, P. Reinhardt, A. Schmitt, T.F. Barth, J. Greiner et al. // *Cancer Immunol Immunother* – 2005. – V. 54(7). – P. 685–693.
109. Li P. Chemokine receptor 7 promotes cell migration and adhesion in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck by activating integrin α v β 3 / P. Li, F. Liu, L. Sun, Z. Zhao, X. Ding et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2011. – V. 27(5). – P. 679–687.
110. Li X. Efficient Treg depletion induces T-cell infiltration and rejection of large tumors / X. Li, E. Kostareli, J. Suffner, N. Garbi, G.J. Hämmerling // *Eur J Immunol.* – 2010. – V. 40. – P. 3325–3335.
111. Li Y. Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APCMin/+ mice / Y. Li et al. // *Carcinogenesis.* – 2012. – V. 33. – P. 1231–1238.
112. Liang Z. Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4 / Z. Liang, T. Wu, H. Lou, X. Yu, R.S. Taichman et al. // *Cancer Res.* – 2004. – V. 64(12). – P. 4302–4308.
113. Lin H. Loss of immunity-supported senescence enhances susceptibility to hepatocellular carcinogenesis and progression in Toll-like receptor 2-deficient mice / H. Lin et al. // *Hepatology.* – 2013. – V. 57. – P. 171–182.
114. Liu F.Y. NF-kappaB participates in chemokine receptor 7-mediated cell survival in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck / F.Y. Liu, Z.J. Zhao, P. Li, X. Ding, N. Guo et al. // *Oncol. Rep.* – 2011. – V. 25(2). – P. 383–391.
115. Liu Y. Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis / Y. Liu, R. Ji, J. Li, Q. Gu, X. Zhao et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2010. – V. 29. – P. 16.

116. Li Y.M. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis / Y.M. Li, Y. Pan, Y. Wei, X. Cheng, B.P. Zhou et al. // *Cancer Cell*. – 2004. – V. 6(5). – P. 459–469.
117. Liu X. The synergistic repressive effect of NF- κ B and JNK inhibitor on the clonogenic capacity of Jurkat leukemia cells / X. Liu, J. Zhang, J. Li, A. Volk, P. Breslin et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9(12). – P. e115490
118. Lohr J.G. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing / J.G. Lohr et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – V. 109. – P. 3879–3884.
119. Lofgren J.L. Lack of commensal flora in *Helicobacter pylori*-infected INS-GAS mice reduces gastritis and delays intraepithelial neoplasia / J.L. Lofgren et al. // *Gastroenterology*. – 2011. – V. 140. – P. 210–220.
120. Lopez-Giral S. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination / S. Lopez-Giral, N.E. Quintana, M. Cabrerizo, M. Alfonso-Perez, M. Sala-Valdes et al. // *J. Leukoc. Biol*. – 2004. – V. 76(2). – P. 462–471.
121. Lotze M.T. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity / M.T. Lotze et al. // *Immunol Rev*. – 2007. – V. 220. – P. 60–81
122. Lowe E.L. Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer / E.L. Lowe et al. // *PloS one*. – 2010. – V. 5. – P. e13027.
123. Luan J. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression / J. Luan, R. Shattuck-Brandt, H. Haghnegahdar, J.D. Owen, R. Strieter et al. // *J. Leukoc. Biol*. – 1997. – V. 62(5). – P. 588–597.

124. Luker K.E. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer / K.E. Luker, G.D. Luker // *Cancer Lett.* – 2006. – V. 238(1). – P. 30-41
125. Luster A.D. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation / A.D. Luster, S.M. Greenberg, P. Leder // *J Exp Med.* – 1995. – V. 182. – P. 219–31.
126. Maeda S. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis / S. Maeda, H. Kamata, J.L. Luo, H. Leffert, M. Karin // *Cell.* – 2005. – V. 121. – P. 977–990.
127. Marchesi F. Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4 / F. Marchesi, P. Monti, B.E. Leone, A. Zerbi, A. Vecchi et al. // *Cancer Res.* – 2004. – V. 64(22). – P. 8420–8427.
128. Mashino K. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma / K. Mashino, N. Sadanaga, H. Yamaguchi, F. Tanaka, M. Ohta et al. // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62(10). – P. 2937–2941.
129. Mattern J. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma / J. Mattern, R. Koomagi, M. Volm // *Br. J. Cancer.* – 1996. – V. 73(7). – P. 931–934.
130. Marechal R. High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma / R. Marechal, P. Demetter, N. Nagy, A. Berton, C. Decaestecker et al. // *Br. J. Cancer.* – 2009. – V. 100(9). – P. 1444–1451.
131. Mburu Y.K. Chemokine receptor 7 (CCR7) gene expression is regulated by NF-kappaB and activator protein 1 (AP1) in metastatic squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN) / Y.K. Mburu, A.M. Egloff, W.H. Walker, L. Wang, R.R. Seethala et al. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287(5). – P. 3581–3590.
132. Mittal D. TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells / D. Mittal et al. // *EMBO J.* – 2010. – V. 29. – P. 2242–2252.

133. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation / R. Medzhitov // Nature. – 2008. – V. 454. – P. 428–435.
134. Merrell M. Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity / M. Merrell et al. // Molecular cancer research: MCR. – 2006. – V. 4. – P. 437–447.
135. Mishra P. Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy / P. Mishra, D. Banerjee, A. Ben-Baruch // J Leukoc Biol. – 2011. – V. 89. – P. 31–39.
136. Moazzeni S.M. Synergistic effect of Toll-like receptor 4 and 7/8 agonists is necessary to generate potent blast-derived dendritic cells in acute myeloid leukemia / S.M. Moazzeni, J. Hadjati // Leuk Res. – 2012. – V. 36(9). – P. 1193–1199
137. Möhle R. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1 / R. Möhle, F. Bautz, S. Rafii, M.A. Moore, W. Brugger, L. Kanz // Blood. – 1998. – V. 91(12). – P. 4523–4530.
138. Monteagudo C. CXCR3 chemokine receptor immunoreactivity in primary cutaneous malignant melanoma: correlation with clinicopathological prognostic factors / C. Monteagudo, J.M. Martin, E. Jorda, A. Llombart-Bosch // J. Clin. Pathol. – 2007. – V. 60(6). – P. 596–599.
139. Müller A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis / A. Müller, B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M.E. Buchanan et al. // Nature. – 2001. – V. 410. – P. 50–56.
140. Muller A. Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy / A. Muller, E. Sonkoly, C. Eulert, P.A. Gerber, R. Kubitza et al. // Int. J. Cancer. – 2006. – V. 118(9) – P. 2147–2157.

141. Murakami T. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells / T. Murakami, W. Maki, A.R. Cardones, H. Fang, A. Tun Kyi et al. // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62(24). – P. 7328–7334.
142. Murakami T. The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis / T. Murakami, K. Kawada, M. Iwamoto, M. Akagami, K. Hida et al. // *Int. J. Cancer.* – 2013. – V. 132(2). – P. 276–287.
143. Naik E. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production / E. Naik, V.M. Dixit // *J Exp Med.* – 2011. – V. 208. – P. 417–420.
144. Naugler W.E. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production / W.E. Naugler et al. // *Science.* – 2007. – V. 317. – P. 121–124.
145. Ngo V.N. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma / V.N. Ngo et al. // *Nature.* – 2011. – V. 470. – P. 115–119.
146. Nguyen D.X. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization / D.X. Nguyen, P.D. Bos, J. Massagué // *Nat Rev Cancer.* – 2009. – V. 9. – P. 274–84.
147. Nourizadeh M. In vitro induction of potent tumor-specific cytotoxic T lymphocytes using TLR agonist-activated AML-DC / M. Nourizadeh, F. Masoumi, A. Memarian, K. Alimoghaddam, S.M. Moazzeni et al. // *Target Oncol.* – 2014. – V. 9(3). – P. 225–237.
148. Ochi A. Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans / A. Ochi et al. // *J Clin Invest.* – 2012. – V. 122. – P. 4118–4129.
149. Ochi A. MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells / A. Ochi et al. // *J Exp Med.* – 2012. – V. 209. – P. 1671–1687.
150. Oda Y. CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom

- developed lung metastasis / Y. Oda, H. Yamamoto, S. Tamiya, S. Matsuda, K. Tanaka et al. // *Mod. Pathol.* – 2006. – V. 19(5). – P. 738–745.
151. Oliveira J.G. Profiles of Gene Polymorphisms in Cytokines and Toll-Like Receptors with Higher Risk for Gastric Cancer / J.G. Oliveira, A.F. Rossi, D.M. Nizato, K Miyasaki, A.E. Silva // *Dig Dis Sci.* – 2013
 152. Okada T. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches / T. Okada, V.N. Ngo, E.H. Ekland, R. Forster, M. Lipp et al. // *J. Exp. Med.* – 2002. – V. 196(1). – P. 65–75.
 153. Olkhanud P.B. Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells / P.B. Olkhanud, D. Baatar, M. Bodogai, F. Hakim, R. Gress et al. // *Cancer Res.* – 2009. – V. 69. – P. 5996–6004.
 154. Owen J.D. Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins / J.D. Owen, R. Strieter, M. Burdick, H. Haghnegahdar, L. Nanney et al. // *Int. J. Cancer.* – 1997. – V. 73(1). – P. 94–103.
 155. Pandey S. Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (–196 to –174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women / S. Pandey et al. // *Gynecologic oncology.* – 2009. – V. 114. – P. 501–505.
 156. Park E.J. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression / E.J. Park et al. // *Cell.* – 2010. – V. 140. – P. 197–208.
 157. Parkin D.M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002 / D.M. Parkin // *Int J Cancer.* – 2006. – V. 118. – P. 3030–3044.
 158. Payne A.S. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis / A.S. Payne, L.A. Cornelius // *J Invest Dermatol.* – 2002. – V. 118(6). – P. 915–922.
 159. Peng G. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function / G. Peng et al. // *Science.* – 2005. – V. 309. – P. 1380–1384.

160. Peng W. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN- γ inducible chemokines / W. Peng, C. Liu, C. Xu, Y. Lou, J. Chen et al. // *Cancer Res.* – 2012. – V. 72. – P. 5209–5218.
161. Phillips R.J. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases / R.J. Phillips, M.D. Burdick, M. Lutz, J.A. Belperio, M.P. Keane, R.M. Strieter // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2003. – V. 167(12). – P. 1676–1686.
162. Popivanova B.K. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis / B.K. Popivanova et al. // *J Clin Invest.* – 2008. – V. 118. – P. 560–570.
163. Pradelli E. Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs / E. Pradelli, B. Karimjee-Soilihi, J.F. Michiels, J.E. Ricci, M.A. Millet et al. // *Int. J. Cancer.* – 2009. – V. 125(11). – P. 2586–2594.
164. Rakoff-Nahoum S. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88 / S. Rakoff-Nahoum, R. Medzhitov // *Science.* – 2007. – V. 317. – P. 124–127.
165. Reddy B.S. Effect of intestinal microflora on 2,2' -dimethyl-4-aminobiphenyl-induced carcinogenesis in F344 rats / B.S. Reddy, K. Watanabe // *J Natl Cancer Inst.* – 1978. – V. 61. – P. 1269–1271.
166. Ren T. Functional expression of TLR9 is associated to the metastatic potential of human lung cancer cell: functional active role of TLR9 on tumor metastasis / T. Ren et al. // *Cancer biology & therapy.* – 2007. – V. 6. – P. 1704–1709.
167. Rhee S.H. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer / S.H. Rhee, E. Im, C. Pothoulakis // *Gastroenterology.* – 2008. – V. 135. – P. 518–528.
168. Rhyasen G.W. Differential IRAK signaling in hematologic malignancies / G.W. Rhyasen, L. Bolanos, D.T. Starczynowski // *Exp Hematol.* – 2013. – V. 41(12). – P. 1005–1007.

169. Rigo A. Macrophages may promote cancer growth via a GM-CSF/HB-EGF paracrine loop that is enhanced by CXCL12 / A. Rigo, M. Gottardi, A. Zamò, P. Mauri, M. Bonifacio, M. Krampera et al. // *Mol Cancer*. – 2010. – V. 9. – P. 273.
170. Russell H.V. CXCR4 expression in neuroblastoma primary tumors is associated with clinical presentation of bone and bone marrow metastases / H.V. Russell, J. Hicks, M.F. Okcu, J.G. Nuchtern // *J. Pediatr. Surg.* – 2004. – V. 39(10). – P. 1506–1511.
171. Sakurai T. Hepatocyte Necrosis Induced by Oxidative Stress and IL-1alpha Release Mediate Carcinogen-Induced Compensatory Proliferation and Liver Tumorigenesis / T. Sakurai et al. // *Cancer Cell*. – 2008. – V. 14. – P. 156–165.
172. Salcedo R. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF - 1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses / R. Salcedo, J.J. Oppenheim // *Microcirculation*. – 2003. – V. 10. – P. 359–370.
173. Savarin-Vuailat C. Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? / C. Savarin-Vuailat, R.M. Ransohoff // *Neurotherapeutics*. – 2007. – V. 4(4). – P. 590–601.
174. Scala S. Human melanoma metastases express functional CXCR4 / S. Scala, P. Giuliano, P.A. Ascierto, C. Ierano, R. Franco et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – V. 12(8). – P. 2427–2433.
175. Schimanski C.C. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer / C.C. Schimanski, S. Schwald, N. Simiantonaki, C. Jayasinghe, U. Gönner, V. Wilsberg et al. // *Clin Cancer Res.* – 2005. – V. 11. – P. 1743–1750.
176. Schon M.P. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy / M.P. Schon, M. Schon // *Oncogene*. – 2008. – V. 27. – P. 190–199.
177. Schreiber R.D. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion / R.D. Schreiber, L.J. Old, M.J. Smyth // *Science*. – 2011. – V. 331. – P. 1565–1570.

178. Sidky Y.A. Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine / Y.A. Sidky et al. // *Cancer research*. – 1992. – V. 52. – P. 3528–3533.
179. Simonetti O. Potential role of CCL27 and CCR10 expression in melanoma progression and immune escape / O. Simonetti, G. Goteri, G. Lucarini, A. Filosa, T. Pieramici et al. // *Eur. J. Cancer*. – 2006. – V. 42(8). – P. 1181–1187
180. Singh R. Expression and histopathological correlation of CCR9 and CCL25 in ovarian cancer / R. Singh, C.R. Stockard, W.E. Grizzle, J.W. Lillard, S. Singh // *Int. J. Oncol.* – 2011. – V. 39(2). – P. 373–381.
181. Singh S. CXCR1 and CXCR2 silencing modulates CXCL8-dependent endothelial cell proliferation, migration and capillary-like structure formation / S. Singh, S. Wu, M. Varney, A.P. Singh, R.K. Singh // *Microvasc. Res.* – 2011. – V. 82(3). – P. 318–325.
182. Smith M.C. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer / M.C. Smith, K.E. Luker, J.R. Garbow, J.L. Prior, E. Jackson et al. // *Cancer Res.* – 2004. – V. 64(23). – P. 8604-8612.
183. So E.Y. The application of Toll like receptors for cancer therapy / E.Y. So, T. Ouchi // *International journal of biological sciences*. – 2010. – V. 6. – P. 675–681.
184. Sobrino Najul E.J. Chemokine receptor CXCR4-mediated transformation of mammary epithelial cells by enhancing multiple RTKs expression and deregulation of the p53/MDM2 axis / E.J. Sobrino Najul, T.A. Toth, C.M. Ng, S.A. Lelievre, M. Fred, C.K. Tang // *Cancer Lett.* – 2011. – V. 307(2). – P. 132-140.
185. Song J.K. Deficiency of C-C chemokine receptor 5 suppresses tumor development via inactivation of NF- κ B and upregulation of IL-1Ra in melanoma model / J.K. Song, M.H. Park, D.Y. Choi, H.S. Yoo, S.B. Han et al. // *PLoS One*. – 2012. – V. 7(5). – P. e33747

186. Speetjens F.M. Nuclear localization of CXCR4 determines prognosis for colorectal cancer patients / Liefers G.J., Korbee C.J., Mesker W.E., van de Velde C.J., van Vlierberghe R.L., Morreau H, Tollenaar R.A., Kuppen P.J. // *Cancer Microenviron* – 2009 – V 2(1) – P.1–7.
187. Starnes CO. Coley's toxins in perspective // *Nature* – 1992– V357– P.11–12.
188. Steinman R.M. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs / Steinman R.M Pack M, Inaba K // *Immunol. Rev* – 1997 – V 156 – P.25–37
189. Strieter R.M. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis / Strieter R.M, Polverini P.J., Kunkel S.L., Arenberg D.A., Burdick M.D., Kasper J., Dzuiba J., Van Damme J., Walz A., Marriott D., et al. // *J. Biol. Chem.* – 1995 – V 270(45):27348–27357.
190. Su L. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells / Su L, Zhang J, Xu H, Wang Y, Chu Y, Liu R, Xiong S // *Clin. Cancer Res*– 2005– V11(23) – P.8273–8280.
191. Sun Y.X. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo / Sun Y., Wang J., Shelburne C.E., Lopatin D.E., Chinnaiyan A.M., Rubin M.A., Pienta K.J., Taichman R.S. // *J. Cell. Biochem* – 2003 – V 89(3) – P.462–473.
192. Swann J, et al. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2008 – 105 – P.652–656.
193. Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis // *Int. J. Cancer* – 2003 – V105(2) – P.186–189.
194. Takeuchi H. CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells / Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E, Hoon D.S. // *Clin. Cancer Res* – 2004 – V.10(7) – P.2351–2358.

195. Teng M.W. Conditional regulatory T-cell depletion releases adaptive immunity preventing carcinogenesis and suppressing established tumor growth/ Teng M.W, Ngiow S.F., von Scheidt B., McLaughlin N., Sparwasser T., Smyth M.J.// *Cancer Res.* – 2010 – V.70 – P.7800–9.
196. Terasaki M. CXCL12/CXCR4 signaling in malignant brain tumors: a potential pharmacological therapeutic target/ Terasaki M., Sugita Y., Arakawa F., Okada Y., Ohshima K., Shigemori M // *Brain Tumor Pathol.* – 2011 – V.28(2) – P.89–97.
197. Treon SP, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia // *The New England journal of medicine.* – 2012 – V. 367 – P. 826–833.
198. Trinchieri G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts // *Annu Rev Immunol.* – 2012 – V.30 – P. 677–706.
199. Tu S, et al. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice // *Cancer Cell.* - 2008 – V. 14 – P. 408–419.
200. Tye H, et al. STAT3-driven upregulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation // *Cancer cell.* – 2012 – V. 22 – P. 466–478
201. Vacchelli E, et al. Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy // *Oncoimmunology.* – 2012 – V. 1 – P. 894–907.
202. Vesely M.D. Natural innate and adaptive immunity to cancer / Vesely M.D, Kershaw M.H., Schreiber R.D., Smyth M.J. // *Annu Rev Immunol.* - 2011 - V.29 – P. 235–71.
203. Villablanca E.J. Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses / Villablanca E.J., Raccosta L., Zhou D., Fontana R., Maggioni D., Negro A., Sanvito F., Ponzoni M., Valentinis B., Bregni M., Prinetti A.,

- Steffensen K.R., Sonnino S., Gustafsson J.A., Doglioni C., Bordignon C., et al // Nat. Med. - 2010 V. - 16(1) – P. 98–105.
204. Viola, A. T cells and their partners: the chemokine dating agency / Viola, A. Contento R.L., Molon B. // Trends Immunol – 2006 – V. 27 – P. 421–427.
 205. Volk A. Co-inhibition of NF- κ B and JNK is synergistic in TNF-expressing human AML / Volk A., Li J., Xin J., You D., Zhang J., Liu X., Xiao Y., Breslin P., Li Z., Wei W., Schmidt R., Li X., Zhang Z., Kuo P.C., Nand S., Zhang J., Chen J., Zhang J // J Exp Med - 2014 – V. 211(6) – P. 1093–1108
 206. Wald D, et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling // Nat Immunol. - 2003 – V. 4 – P. 920–927.
 207. Walser T.C. Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer / Walser T.C., Rifat S., Ma X., Kundu N., Ward C., Goloubeva O., Johnson M.G., Medina J.C., Collins T.L., Fulton A.M // Cancer Res. – 2006 – V. 66(15) – P. 7701–7707.
 208. Wang J. Chemokine receptor 7 activates phosphoinositide-3 kinase-mediated invasive and prosurvival pathways in head and neck cancer cells independent of EGFR / Wang J., Zhang X., Thomas S.M., Grandis J.R., Wells A., Chen Z.G., Ferris R.L // Oncogene. – 2005 – V. 24(38) – P. 5897–5904.
 209. Wani N. C-X-C motif chemokine 12/C-X-C chemokine receptor type 7 signaling regulates breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment / Wani N., Nasser M.W., Ahirwar D.K., Zhao H., Miao Z., Shilo K., Ganju R.K // Breast Cancer Res. - 2014 May 29 – V.16(3)
 210. Weber K. Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium / Weber K., Nelson P.J., Grone H.J., Weber C // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1999 – V.19(9) – P.2085–2093.

211. Wendel M. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN- γ and CXCR3 ligands / Wendel M., Galani I.E., Suri-Payer E, Cerwenka A // *Cancer Res.* – 2008 – V.68 – P. 8437–45.
212. Wendt M.K. Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis / Wendt M.K., Johanesen P.A., Kang-Decker N., Binion D.G., Shah V., Dwinell M.B // *Oncogene.* – 2006 – V.25(36) – P.4986–4997.
213. Wendt M.K. Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells / Wendt M.K., Cooper A.N., Dwinell M.B // *Oncogene.* - 2008 – V.27(10) – P. 1461–1471.
214. West XZ, et al. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands // *Nature.* - 2010 – V. 467 – P. 972–976.
215. Wiley H.E. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma / Wiley H.E., Gonzalez E.B., Maki W., Wu M.T., Hwang S.T // *J. Natl. Cancer Inst.* - 2001 – V.93(21) – P. 1638–1643.
216. Wu S. Chemokine IL-8 and chemokine receptor CXCR3 and CXCR4 gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia at first relapse / Wu S., Gessner R., Taube T., Korte A., von Stackelberg A., Kirchner R., Henze G., Seeger K. J // *Pediatr. Hematol. Oncol.* – 2006 – V.28(4) – P.216–220.
217. Wurbel M.A. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9 / Wurbel M.A., Philippe J.M., Nguyen C., Victorero G., Freeman T., Wooding P., Miazek A., Mattei M.G., Malissen M., Jordan B.R., Malissen B., Carrier A., Naquet P // *Eur. J. Immunol* – 2000 – V.30(1) – P. 262–271
218. Xiao H, et al. The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis / *Immunity.* - 2007 – V.26 – P.461–475.

219. Yang J. Effect of chemokine receptors CCR7 on disseminated behavior of human T cell lymphoma: clinical and experimental study. Yang J., Wang S., Zhao G., Sun B // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2011 – V. 30 – P.51.
220. Yasumoto K. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer / Yasumoto K., Koizumi K., Kawashima A., Saitoh Y., Arita Y., Shinohara K., Minami T., Nakayama T., Sakurai H., Takahashi Y., Yoshie O., Saiki I // Cancer Res. - 2006 – V. 66(4) – P. 2181–2187.
221. Ying J. The expression of CXCL12 and CXCR4 in gastric cancer and their correlation to lymph node metastasis / Ying J., Xu Q., Zhang G., Liu B., Zhu L // Med Oncol. - 2012 – V. 29(3) – P. 1716–1722.
222. Yu P, et al. Nucleic acid-sensing Toll-like receptors are essential for the control of endogenous retrovirus viremia and ERV-induced tumors // Immunity. - 2012 – V.37 – P. 867–879.
223. Yusuf N, et al. Protective role of Toll-like receptor 4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis // Cancer research. – 2008 – V.68 – P. 615–622.
224. Zabel B.A. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis/ Zabel B.A., Agace W.W., Campbell J.J., Heath H.M., Parent D., Roberts A.I., Ebert E.C., Kassam N., Qin S., Zovko M., LaRosa G.J., Yang L.L., Soler D., Butcher E.C., Ponath P.D., Parker C.M., et al. // J. Exp. Med. – 1999 V. 190(9) – P. 1241–1256.
225. Zhang X. Attenuated A20 expression of acute myeloid leukemia-derived dendritic cells increased the anti-leukemia immune response of autologous cytolytic T cells / Zhang X., Su Y., Song H., Yu Z., Zhang B., Chen H // Leuk Res - 2014 – V.38(6) – P.673–681

226. Zhao B.C. CXCR4/SDF-1 axis is involved in lymph node metastasis of gastric carcinoma / Zhao B.C. ,Wang Z.J., Mao W.Z., Ma H.C., Han J.G., Zhao B., Xu H.M // World J Gastroenterol. – 2011 – V.17(19) – P. 2389–2396.
227. Zlotnik A. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis/ 227. Zlotnik A .,Burkhardt A.M., Homey B. // Nat Rev Immunol – 2011 – V.11 – P.597–606.