

На правах рукописи

Филина Александра Борисовна

**РОЛЬ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПРОЦЕССЕ
ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЯ**

14.03.09 - Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва — 2019

Работа выполнена в ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

академик РАН, доктор биологических наук, профессор **Зверев Виталий Васильевич**
член – корр. РАН, доктор медицинских наук **Свитич Оксана Анатольевна**

Официальные оппоненты:

Тотолян Арег Артёмович, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, лаборатория молекулярной иммунологии, заведующий, директор.

Топтыгина Анна Павловна, доктор медицинских наук, ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, лаборатория цитокинов, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России.

Защита диссертации состоится « » _____ 2019 г. в ___ на заседании Диссертационного Совета Д.208.040.08 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru
Автореферат разослан « _____ » _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Калюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В связи с новыми достижениями в области иммунологии в последние годы активно исследуются факторы врожденного иммунитета, в частности хемокины, их рецепторы и Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors – TLRs) [Семенов Б.Ф., 2006; Ганковская Л.В., 2010; Афанасьев С.С., 2009; Зверев В.В., 2013; Muhammad A.A., 2019; Свитич О.А., 2017]. TLRs относятся к распознающим рецепторам врожденного иммунитета (PPRs – pattern recognition receptors), играют важную роль в реакциях врожденного иммунитета и экспрессируются практически всеми клетками организма. TLRs распознают определенные консервативные последовательности: PAMPs – pathogen-associated molecular pattern, – представлены антигенами чужеродных патогенов, и DAMPS – damage-associated molecular patterns, которые являются компонентами разрушенных клеток [Ярилин, А.А., 2010; Зверев В.В., 2011, Караулов А.В., 2002]. При активации TLRs запускается ряд сигнальных путей, приводящих к продукции провоспалительных цитокинов, хемокинов и других факторов. Относительно недавно стали появляться работы о влиянии TLRs и хемокиновых рецепторов на развитие иммунопатологий (аутоиммунных, онкологических и других заболеваний) [Ковальчук Л.В., 2010; Braunstein M.J, 2018; Patra, 2019; Lu Y., 2018].

Известно, что TLRs могут как активировать, так и ингибировать рост опухолей. К примеру, активация TLR4 и TLR2 [Tye H., 2012; Kim S., 2009; Fukata M., 2009] приводит к активному прогрессированию опухоли, в то время как активация TLR3, TLR5, TLR7, TLR9 [Rakoff-Nahoum S., 2007; Cai Z., 2011; Schön M.P., 2008; Krieg A.M., 2008] в большинстве случаев – к ингибированию роста опухоли. Однако, следует отметить, что роль TLRs в опухолеобразовании до конца не исследована и требует более тщательного изучения.

На сегодняшний день известно, что хемотаксис связан с инвазией, ангиогенезом и диссеминацией опухолевых клеток [Тотолян А.А., 2010]. В

иммунной инвазии задействованы такие хемокины, как CCL2, CCL5, CL2, CCL4, CCL17, CCL22 и CXCL12; в ангиогенезе – CXCL1, CXCL2, CXCL8; в метастазировании – CXCL12, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8. [Evanthia T. R., 2011].

Несмотря на актуальность проблемы, исследования в основном проводятся относительно хемокинов или TLRs. В научной литературе немного данных о возможности активации хемотаксиса опухолевых клеток, опосредованно через сигнальные пути с TLRs или экспрессию гетерологичных рецепторов, например, таких как EGFR или CCR4 [Seebacher N. A., 2019; Urs B. H., 2014], которые является мишенью при таргетной терапии различных типов онкологических заболеваний.

Таким образом, актуальным является исследование влияния факторов врожденного иммунитета на хемотаксис опухолевых клеток, в связи с чем необходимо изучить возможность TLRs – опосредованного хемотаксиса, CXCL12 – опосредованного хемотаксиса, CXCL12 – опосредованную экспрессию TLRs и гетерологичных хемокиновых рецепторов, что может менять ответ на один и тот же хемокин в различных условиях.

Цель работы: 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 мононуклеарных клеток (МНК) здоровых доноров.
3. Исследовать хемотаксис мононуклеарных клеток, выделенных от пациентов с острым миелоидным лейкозом (М4) до химиотерапии и после окончания первого курса химиотерапии по направлению к CXCL12 и лиганду TLR9.
4. Изучить экспрессию генов *CXCL12*, *CCR4*, *EGFR* и *TLR9* в интактных и мигрировавших клетках.

Научная новизна исследования

Впервые показано, что миграция клеток острого миелоидного лейкоза к CXCL12 зависит от уровня экспрессии гена *CXCL12* в опухолевой клетке.

Выявлено, что применение химиотерапии снижает уровень экспрессии гена *CXCL12* опухолевыми клетками.

Впервые показано, что воздействие CXCL12 увеличивает экспрессию гетерологичного гена *CCR4*.

Впервые определено, что CXCL12 на мононуклеарные клетки, выделенных от пациентов с острым миелоидным лейкозом, снижает экспрессию гена *EGFR*.

Впервые исследована миграция клеток клеточных линий K562, Reh, мононуклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров, пациентов с острым миелоидным лейкозом до и после химиотерапии по направлению к лиганду TLR9.

Теоретическая и практическая значимость

Разработаны диагностические системы на основе ПЦР-РВ для количественного определения экспрессии генов.

Отработана схема исследования хемотаксиса опухолевых клеточных линий K562, Reh, мононуклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров и пациентов с острым миелоидным лейкозом. А также подобраны оптимальные концентрации хемокина CXCL12 и лиганда TLR9 для изучения хемотаксиса на клеточных линиях, мононуклеарных клетках, 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, а также оценки успешности химиотерапии.

Основные 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 моноклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров и от пациентов с острым миелонобластным 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, продемонстрирован 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.

Личный вклад автора

Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе Филиной А.Б., получены ею самостоятельно на базе 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 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.

Степень достоверности и апробация результатов

Материалы диссертации представлены, доложены и обсуждены на всероссийской XVI конференции иммунологов Урала с международным участием (27-29 августа 2017 г., Челябинск) с присуждением диплома II степени в конкурсе молодых ученых; всемирном конгрессе по иммунопатологии и респираторной аллергии при поддержке WIPO – World Immunopathology Organization с присуждением I места в конкурсе молодых ученых в номинации «иммунология» (18-21 октября 2018 г., Москва); научной конференции с международным участием «Вакцинология как ответ биологическим угрозам», посвященная 100-летию основания НИИВС им. И.И. Мечникова (18-20 апреля 2019 г., Москва); IV Объединенном иммунологическом форуме (24 - 29 июня 2019 г, Новосибирск).

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

Внедрение результатов работы в практику

Полученные данные внедрены в курс обучения по направлению «Иммунология» на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова и на кафедре иммунологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Разработанные системы ПЦР-РВ используются в выполнении НИР ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

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 7 научных работ, в том числе 6 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ и 3 - в журналах, индексируемых в базе Scopus.

Структура и объем 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа была проведена при сотрудничестве с лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, экспериментальной иммунологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова и отделением клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского.

На первом этапе был исследован хемотаксис клеток опухолевых линий; мононуклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров, пациентов с острым миелоидным лейкозом до и после химиотерапии. На втором этапе производилось выделение РНК из клеток, реакция обратной транскрипции, ПЦР-РВ для исследования экспрессии генов факторов врожденного иммунитета. На третьем этапе была проведена статистическая обработка данных.

Клеточные линии K562 (ATCC® CCL-243™) и Reh (ATCC® CRL-8286™) были предоставлены лабораторией экспериментальной иммунологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Клеточная линия K562 – эритроидно-миелоидные

предшественники, выделенные из плевральной жидкости женщины 53 лет с хроническим миелоидным лейкозом. Клеточная линия Reh – клетки, выделенные от пациента с пре – В острым лимфобластным лейкозом.

Клиническим материалом служила кровь от пациентов с острым миелоидным лейкозом (по FAB классификации миеломонобластный лейкоз, M4) до и после химиотерапии, который 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 острым миелоидным лейкозом (M4) (n=10). Материал у пациентов основной группы забирали дважды: до проведения химиотерапии и через три недели после окончания первого курса химиотерапии.

2. Контрольная группа пациентов, соответствующая критериям включения/исключения пациентов в исследование и исключения пациентов группы контроля из исследования (n=25).

В качестве хемоаттрактанта использовался CXCL12 (ThermoFisher, США). В качестве TLRs лиганда использовался лиганд TLR9 (DNA_lig), (синтезирован на фирме Синтол, РФ). Клеточные культуры K562 и Reh культивировали суспензионным методом в среде RPMI (ПанЭко, РФ) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США) и 1% раствора гентамицина (Sigma-Aldrich, США) в культуральных флаконах (Corning, США). Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере CO₂. При достижении оптимальной плотности 1.0x10⁵ – 1.0x10⁶ клеток/мл проводили пересев культуры и дальнейшее культивирование. Подсчет клеток проводили с помощью камеры Горяева (МиниМед, РФ).

Сотрудниками отделения клинической гематологии и иммунотерапии проводился забор крови пациентов в вакуумные гепаринизированные пробирки (BD, США) в количестве 10 мл, затем в течение часа кровь доставлялась в

лабораторию, после чего проводилось выделение моноклеарных клеток с использованием фиколла (ПанЭко, РФ) по стандартной методике [Boyum A. 1968].

Для определения жизнеспособности клеток использовали 0,2% раствор трипанового синего (Sigma-Aldrich, США). Окрашивание клеток красителем осуществляли согласно стандартному протоколу [Черкасова Е.И., 2015]. Подсчет клеток проводили с помощью камеры Горяева.

Для исследования хемотаксиса использовалась камера Бойдена фирмы MultiScreen Migration Invasion and Chemotaxis Filter Plate (MERCK, Германия) двух видов: с размерами пор 5 и 8 мкм. 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 10 минут, 60 минут и 24 часа. Для каждой временной точки использовалась отдельная камера. Подсчет мигрировавших клеток проводили с помощью камеры Горяева.

После подсчета мигрировавших клеток проводилось выделение РНК, которая служит матрицей для кДНК, которая используется в ПЦР-РВ для исследования экспрессии генов. Для выделения РНК из клеток методом сорбции на силикагеле использовали набор “Рибо-сорб” (АмплиСенс, РФ). Выделение РНК проводили согласно инструкции производителя. Выделенные образцы РНК хранили при температуре минус 70С°. Для получения кДНК исследуемых генов на матрице выделенной РНК была проведена реакция обратной транскрипции («ОТ-1», Синтол, РФ). 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, используемые в работе, были синтезированы на фирме Синтол (РФ). (Таб.1)

Для статистической обработки полученных результатов рассчитывали медиану и процентилю. 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 [Гланц, 1999]. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной статистической программой BioStat, а также программы Excel.

Таблица 1

Последовательности используемых в работе праймеров

Название праймера	Последовательность праймера
CXCL12 _{sen}	aga-gcc-aac-gtc-aag-cat-ct
CXCL12 _{an_sen}	agg-gtc-taa-atg-ctggcaaa
EGFR _{sen}	gag-tcg-ggc-tct-gga-gga-aa
EGFR _{an_sen}	gac-tgc-taa-ggc-ata-gga-att
CCR4 _{sen}	att-gcc-tca-cag-acc-ttc-ctc-a
CCR4 _{an_sen}	cca-aat-gcc-ttg-atg-cct-tct-t
TLR9 _{sen}	tgg-tgt-tga-agg-aca-gtt-ctc-tc
TLR9 _{an_sen}	cac-tcg-gag-gtt-tcc-cag-c

Результаты исследований

Для исследования хемотаксиса опухолевых клеток *in vitro* в качестве исследуемого объекта были подобраны две клеточные линии, которые относятся к разным типам лейкозов: K562 и Reh. Эксперименты проводили на камерах Бойдена фирмы MultiScreen Migration Invasion and Chemotaxis Filter Plate (MERCCK, Германия) с различными размерами пор: 5 и 8 мкм. Был исследован индуцированный хемотаксис: с использованием лиганда TLR9 – DNA_{lig} и с использованием CXCL12. Также была исследована спонтанная миграция клеток опухолевых линий. Эксперимент проводился с целью подбора оптимальных

условий для дальнейших исследований хемотаксиса опухолевых клеток, полученных из клинического материала. Также была поставлена задача выявить влияние лиганда TLR9 (DNA_lig) на возможную миграцию опухолевых клеток.

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 (с использованием камеры Бойдена с размерами пор 8 мкм хемотаксис достоверно ниже контроля через 10 и 60 минут в 2 и 1,6 раз соответственно; с использованием камеры Бойдена с размерами пор 5 мкм достоверно ниже контроля через 10 и 60 минут в 3,5 и 4 раза соответственно) ($p \leq 0,05$). Показано, что для исследования хемотаксиса клеток линии Reh по направлению к DNA_lig количество мигрировавших клеток было достоверно только при использовании камеры с порами 5 мкм. Выявлено, что DNA_lig подавляет хемотаксис опухолевых клеток линии Reh через 10 и 60 минут (достоверно ниже относительно контроля через 10 и 60 минут в 1,75 и 2,5 раз соответственно) ($p \leq 0,05$). 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.

Также была произведена серия экспериментов с использованием хемоаттрактанта CXCL12 и камер Бойдена с разными размерами пор. Так же как и в случае с предыдущим лигандом, оптимальной для исследования оказалась камера с порами 5 мкм. Таким образом, исследования с использованием пор 5 мкм показали высокую достоверность в миграции обеих линий, а также, что CXCL12 положительно влияет на миграцию клеток K562 (достоверно выше относительно контроля через 10 минут, 60 минут и 24 часа в 2, 2,8 и 1,5 раз) ($p \leq 0,05$). Динамика хемотаксиса клеток линии Reh под действием хемокина также растет и количество мигрировавших клеток достоверно выше контроля (выше контроля через 60 минут и 24 часа в 1,75 и 5,7 раз) ($p \leq 0,05$).

Таким образом, CXCL12 положительно влияет на хемотаксис клеточных линий K562 и Reh, усиливая хемотаксис, в то время как DNA_lig приводит к

снижению миграционной активности опухолевых клеток. Нами было показано, что хемотаксис клеток K562 под действием CXCL12 значительно выше, чем миграция в контроле, в связи с чем 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 достоверно ниже и через 24 часа в 5 раз достоверно выше экспрессии в спонтанно мигрировавших образцах ($p \leq 0,05$).

Показано, что динамика спонтанной миграции опухолевых клеток в контроле клеточной линии K562 также является положительной. 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 заключить, что клетки лейкоза потенциально самостоятельно вырабатывают CXCL12 для активации рецепторов, что приводит к миграции клеток.

На втором этапе научной работы проводилось исследование миграции мононуклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров, от пациентов с острым миелоидным лейкозом до и после химиотерапии, а также экспрессия факторов врожденного иммунитета в миграции клеток. Миграция МНК, выделенных от здоровых доноров, по направлению к DNA_lig достоверно выше контроля через 10 минут и 24 часа в 1,3 и 1,8 раз соответственно ($p \leq 0,05$). Миграция МНК, выделенных от здоровых доноров, относительно DNA_lig достоверно ниже в 6 раз через 60 минут ($p \leq 0,05$). 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.1)

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 было показано, что хемотаксис клеточной линии K562 значительно снижается под воздействием лиганда. Нами предполагается, что 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. При этом 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.

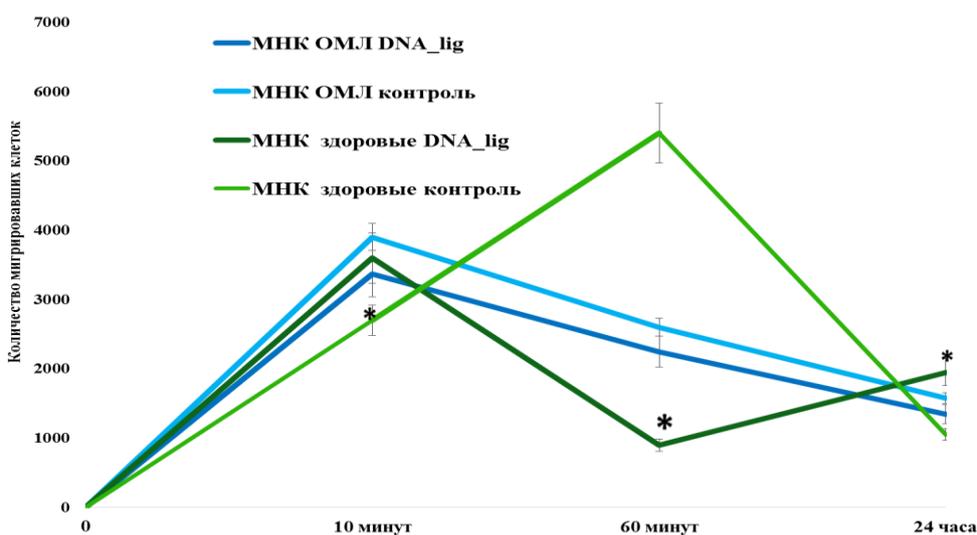


Рисунок 1. Динамика миграции мононуклеарных клеток, выделенных от здоровых доноров и от пациентов с острым миелоидным лейкозом до начала химиотерапии по направлению к лиганду TLR9

По оси абсцисс – время, 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество мигрировавших клеток

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

Было показано, что количество мигрировавших МНК здоровых доноров относительно CXCL12 статистически значимо превышает количество мигрировавших клеток в контроле на протяжении всего эксперимента (выше через 10 минут, 60 минут и 24 часа в 1,5, 1,8 и 2,7 раз соответственно) ($p \leq 0,05$). В то же

время влияние CXCL12 на МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ до химиотерапии выражается в ингибировании хемотаксиса как относительно контроля (достоверно ниже контроля через 60 минут и 24 часа в 1,8 и 1,4 раза соответственно) ($p \leq 0,05$), так и относительно индуцированного хемотаксиса здоровых клеток (через 10 минут, 60 минут и 24 часа ниже в 2,6, 7,1 и 1,1 раз соответственно) ($p \leq 0,05$). После воздействия химиотерапии миграционная активность частично возвращается, но также не достигает уровней значения хемотаксиса МНК здоровых пациентов (достоверно ниже относительно индуцированной миграции клеток здоровых доноров через 60 минут и 24 часа в 3,4 и 2,7 раз соответственно) ($p \leq 0,05$). (Рис.2)

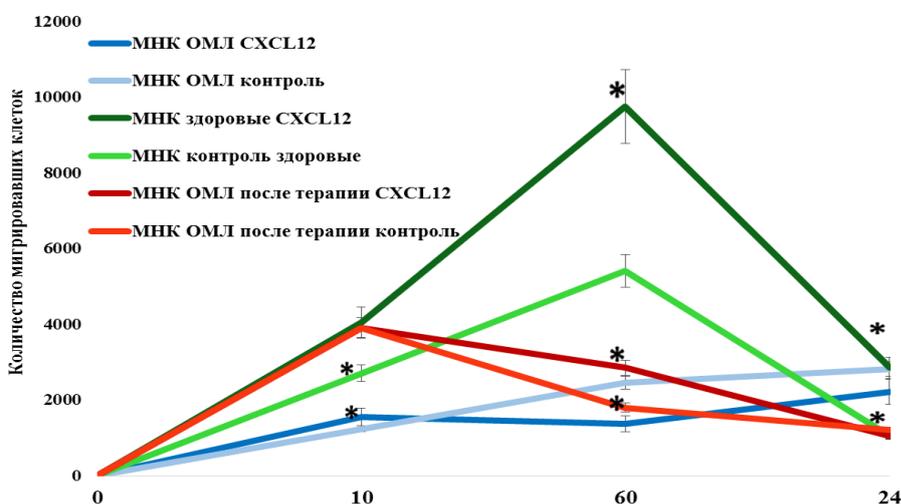


Рисунок 2. Сравнение хемотаксиса МНК, выделенных от здоровых доноров и от пациентов с острым миелоидным лейкозом до начала и после химиотерапии по направлению к CXCL12.

По оси абсцисс – время, 0 – 0 мин; 1 – 10 мин; 2 – 60 мин; 3 – 24 часа

По оси ординат – количество мигрировавших клеток

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

В отличие от исследований других авторов, работы которых были сфокусированы в основном на усилении хемотаксиса злокачественных клеток хемокином CXCL12, в данной работе было продемонстрировано противоположный эффект вышеназванного хемокина. Также в работах Luke J. Drury и соавт. Было

показано, что CXCL12 может иметь антиметастатический эффект. В его исследовании представлены результаты о том, что экзогенный CXCL12 является мощным ингибитором метастазирования при онкологических заболеваниях, таких как рак ободочной кишки и рак молочной железы. В связи с этим далее проводилось исследование экспрессии факторов врожденного иммунитета, которые могут влиять на хемотаксис, а также могут способствовать прогрессии опухолевых клеток.

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. На настоящий момент известно, что очень активно используются ингибиторы рецептора EGFR для лечения немелкоклеточного рака легких и поджелудочной железы и есть сообщения и попытки использования препаратов при ОМЛ, однако, исследования Daniel J. DeAngelo и соавт. показали низкую эффективность этих препаратов. В связи с этим дальнейшие исследования были направлены на оценку экспрессии гена *EGFR* после воздействия CXCL12. Также нами была исследована экспрессия гена *CCR4* под воздействием CXCL12, так как в исследовании, проведенном Yan Zhang и 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.

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 ($p \leq 0,05$). 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 сутки в 16, 3,9 и 24,4 раз соответственно ($p \leq 0,05$). Была выявлена

высокая отрицательная корреляционная зависимость хемотаксиса МНК от пациентов с ОМЛ до химиотерапии с экспрессией гена *CXCL12* через 60 минут и сутки ($r_s = 0,75$). 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 ($p \leq 0,05$). Достоверных отличий экспрессии *CXCL12* в клетках ОМЛ под воздействием *CXCL12* от контроля через 10 минут не было. (Рис.3)

Экспрессия гена *CCR4* в мигрировавших МНК здоровых пациентов *CCR4* под действием *CXCL12* достоверно выше контроля через 10 минут и ниже через сутки в 900 и 427 раз соответственно ($p \leq 0,05$), через 60 минут эксперимента экспрессия достоверно не отличалась. 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 ($p \leq 0,05$). 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 ($p \leq 0,05$). Через 60 минут данные между экспрессией гена *CCR4* в клетках, мигрировавших по направлению к *CXCL12* и контролем недостоверны.

Экспрессия гена *EGFR* в МНК, выделенных от здоровых пациентов достоверно выше контроля через 60 минут в 23 раза ($p \leq 0,05$). 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 ($p \leq 0,05$). 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 минут в

5 раз ($p \leq 0,05$). Через 24 часа минут данные между экспрессией *EGFR* в клетках, мигрировавших по направлению к CXCL12 и контролем недостоверны. (Рис.4)

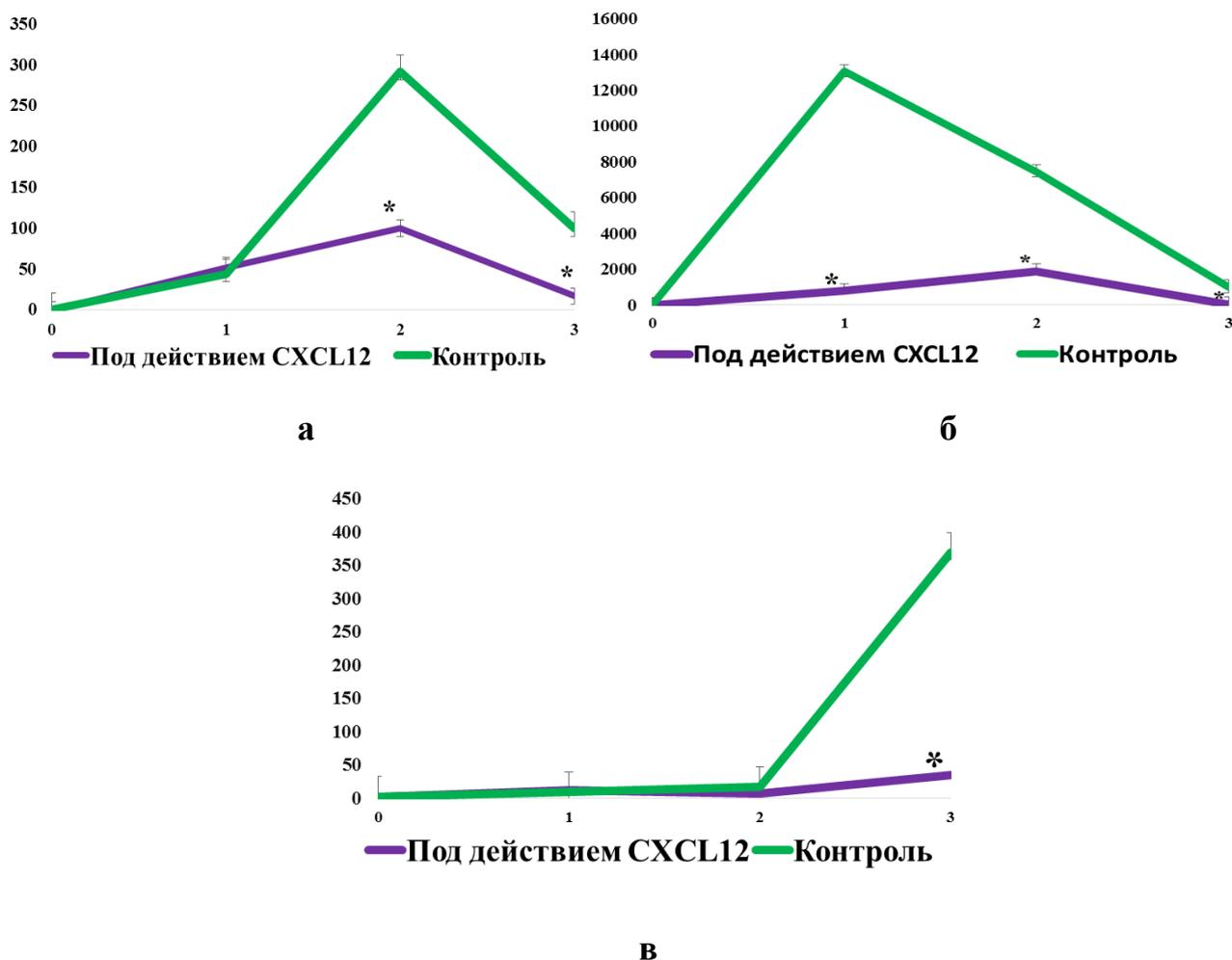
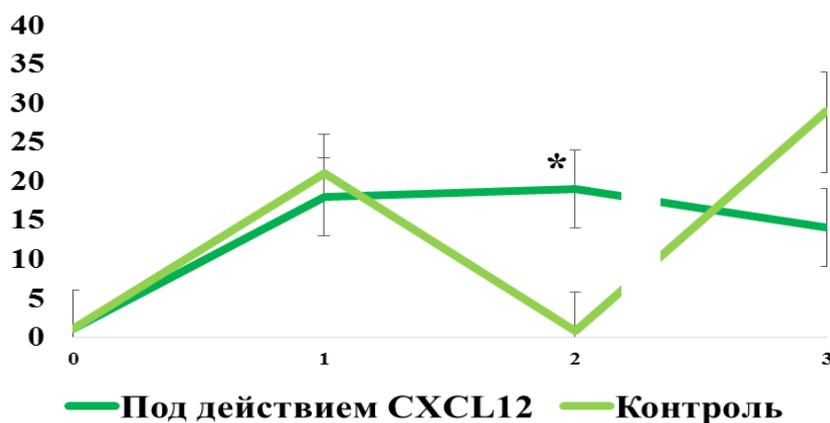


Рисунок 3. Динамика экспрессии CXCL12 под действием CXCL12 в МНК пациентов с ОМЛ до химиотерапии (а), после химиотерапии (б) и здоровых пациентов (в)

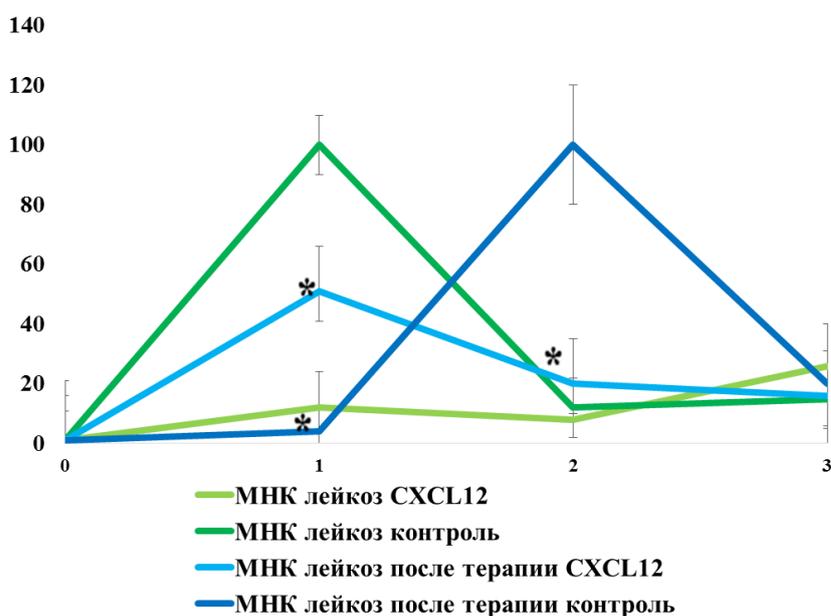
По оси абсцисс – время

По оси ординат – количество копий

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



а



б

Рисунок 4. Динамика экспрессии *EGFR* под действием CXCL12 в МНК здоровых пациентов(а) и пациентов с ОМЛ до и после химиотерапии (б)

По оси абсцисс – время

По оси ординат – количество копий

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

Экспрессия гена *TLR9* в МНК, выделенных от здоровых пациентов достоверно выше контроля через 24 часа в 7 раз ($p \leq 0,05$). Через 10 и 60 минут экспрессия гена *TLR9* статистически не достоверна. 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 ($p \leq 0,05$). 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.

Заключение

На сегодняшний день очень актуальна тема разработки подходов к лечению онкологических заболеваний, в том числе и лейкозов. 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. Также немаловажную роль в миграции опухолевых клеток играют хемокины. Можно предположить, что TLRs и хемокины, а так же их рецепторы, активно участвуют в онкогенезе. Касаясь особой группы онкологических заболеваний, таких как лейкозы, при анализе исследований последних десятилетий, было выявлено, что относительно них роль факторов врожденного иммунитета изучена недостаточно. 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 генов *CXCL12*, *EGFR*, *TLR9*, *CCR4*, так как указанные факторы предположительно могут влиять на хемотаксис опухолевых клеток и на метастазирование.

На первом этапе изучался хемотаксис опухолевых линий K562 и Reh по направлению к DNA_lig, который является лигандом TLR9, и по направлению к

CXCL12. 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 *in vitro* CXCL12 снижает хемотаксис МНК, выделенных от пациентов с ОМЛ (M4) до химиотерапии. После воздействия химиотерапии хемотаксис частично восстанавливается, однако не до значений хемотаксиса МНК, выделенных от здоровых доноров. При оценке экспрессии *CCR4*, *CXCL12*, *TLR9*, *EGFR* в мигрировавших клетках МНК от пациентов с ОМЛ до химиотерапии, после химиотерапии и здоровых доноров по направлению к CXCL12 получен ряд результатов. Выявлено, что в МНК пациентов в ОМЛ экспрессия *CXCL12* конститутивно высокая, что объясняет низкую миграционную активность при введении *in vitro* CXCL12 в связи с десенсбилизацией рецепторов и низкой отвечаемостью на хемокин. После воздействия химиотерапии уровень конститутивной экспрессии гена *CXCL12* значительно снижался, что указывает на высокую значимость проведенной химиотерапии в хемотаксисе опухолевых клеток. Также было выявлено, что экспрессия гена *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 этого 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 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 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. Так показано, что CXCL12 снижает экспрессию представленного рецептора. Также выявлено ингибирование хемотаксиса опосредованного через лиганда TLR9 в клеточных опухолевых линиях, что также может использоваться как дополнительная мишень воздействия.

Из вышесказанного следует, что хемотаксис клеток лейкоза не так однозначен. Существуют дополнительные пути регулирования данного процесса, такие как перекрестная десенситизация рецепторов, что может приводить к нечувствительности данных клеток такими методами лечения как применение ингибиторов рецепторов различных факторов врожденного иммунитета, 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 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 миелонобластным лейкозом практически не отличалась от показателей в группе здоровых доноров.

5. В спонтанно мигрировавших мононуклеарных клеток, выделенных от пациентов с ОМЛ (M4) 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 (M4) до химиотерапии под воздействием CXCL12, при этом следует отметить, что после проводимой терапии экспрессионные профили меняют свое направление, что коррелировало с эффективностью проводимого лечения.

Публикации по теме диссертации

1. **Филина А.Б.,** Свитич О.А., Ганковская Л.В., Лабжинов П.А., Парфенова Т.М., Зверев В.В. Изучение лиганд-опосредованного хемотаксиса клеток макрофагальной линии U937 // **Медицинская иммунология.** 2014 – Т.16 – №5 – С. 443 – 448.

2. **Филина А.Б.,** Аммур Ю.И., Свитич О.А. Миграция мононуклеарных и опухолевых клеток относительно TLRs лигандов // **Российский иммунологический журнал.** – 2018. – Т.12(21) – №4 – С.771 – 773.

3. **Филина А.Б.,** Свитич О.А., Аммур Ю.И., Голенков А.К., Клинушкина Е.Ф., Зверев В.В. Изучение миграционной способности мононуклеарных и опухолевых клеток относительно TLRs лигандов и CXCL12 // **Российский иммунологический журнал.** – 2017 – Т.11(20) – №3. – С.545 – 547.

4. Свитич О.А., **Филина А.Б.**, Давыдова Н.В., Ганковская Л.В.З, Зверев В.В. Роль факторов врожденного иммунитета в процессе опухолеобразования // **Медицинская иммунология.** – 2018 – Т.20 – №2 – С. 151-162

5. **А.Б. Филина**, О.А.Свитич, Ю.И. Аммур, А.К. Голенков, Е.Ф. Клинушкина, В.В. Зверев. Изучение влияния CXCL12 на хемотаксис клеток миеломонобластного лейкоза и экспрессию гена TLR4 // **Аллергология и иммунология.** - 2018 – Т. 19. №3. – С.140 – 144.

6. **А. Б. Филина**, О. А. Свитич, А. К. Голенков, Е. Ф. Клинушкина, В. В. Зверев. Альтернативные пути активации хемотаксиса клеток острого миелоидного лейкоза // **Российский иммунологический журнал** – 2019 – Т.13 (22) – № 2– С. 596 – 598.

7. **Filina A.B.**, Svitich O.A., Ammour Y.I., Gankovskaya L.V., Davidova N.V., Zverev V.V. TLRs ligands and chemokines role in tumor cells migration and expression of innate immunity factors // *Allergy* – V. 73 – № S105 – 2018 – P. 584 – 585.

Список сокращений

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

DAMPs – damage-associated molecular patterns

EGFR – epidermal growth factor receptor

PAMPs – pathogen-associated molecular pattern

TLRs – Toll-like receptors