

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
имени Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**ПОДЛЕСНАЯ ПОЛИНА АЛЕКСЕЕВНА**

**РОЛЬ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ В УХОДЕ ИЗ-ПОД  
ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА КЛЕТОК ОПУХОЛИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ  
ЖЕЛЕЗЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

Доктор биологических наук,  
профессор РАН

**Грачев Алексей Николаевич**

Москва – 2024 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Рак предстательной железы.....	12
1.2 Микроокружение опухоли и его роль в прогрессии заболевания.....	13
1.3 Макрофаги и их биологические функции.....	16
1.4 Фенотипы макрофагов.....	18
1.5 Цитотоксическая активность макрофагов.....	19
1.6 Фагоцитоз.....	21
1.7 Роль цитотоксической активности макрофагов в онкогенезе.....	23
1.8 Макрофаги, ассоциированные с опухолью.....	24
1.9 Макрофаги, ассоциированные с опухолью как мишень противоопухолевой терапии.....	26
1.9.1 Ингибирование инфильтрации моноцитов .....	29
1.9.2 Элиминация макрофагов, ассоциированных с опухолью .....	30
1.9.3 Реполаризация макрофагов, ассоциированных с опухолью.....	31
1.10 Заключение.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	36
2.1 Материалы.....	36
2.1.1 Клеточные линии.....	36
2.1.2 Реагенты и среды.....	37
2.1.3 Список используемых растворов.....	39
2.2 Клеточная модель для получения опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов.....	40
2.2.1 Подбор рабочих концентраций факторов дифференцировки миелоидных клеток линии ТНР-1, HL-60, U937 и K562.....	41
2.2.2 Оценка уровня продукции провоспалительных цитокинов макрофагов в модели.....	41
2.2.3 Оценка устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов.....	42
2.3 Функциональный анализ устойчивых сублиний опухолевых клеток <i>in vitro</i> .....	42
2.3.1 Анализ пролиферативной активности.....	42
2.3.2 Тест на образование колоний в условиях разреженной популяции.....	43

2.3.3 Тест на миграционную способность по градиенту ростовых факторов.....	43
2.3.4 Анализ чувствительности опухолевых клеток к действию цитостатиков .....	43
2.4 Анализ ферментативной активности желатиназ.....	44
2.5 Приготовление белковых лизатов клеток.....	44
2.6 Вестерн-блот анализ.....	45
2.7 Оценка роста опухоли <i>in vivo</i> .....	46
2.8 Гистология и иммуногистохимия.....	46
2.8.1 Приготовление срезов.....	46
2.8.2 Гистологическое окрашивание.....	46
2.8.3 Иммуногистохимическое окрашивание.....	47
2.9 Иммуноцитохимия.....	48
2.9.1 Подготовка клеточной культуры.....	48
2.9.2 Процедура исследования .....	48
2.9 Выделение тотальной РНК.....	49
2.10 Обратная транскрипция.....	49
2.11 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.....	50
2.12 Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	51
2.13 Секвенирование транскриптома.....	51
2.13.1 Приготовление библиотек кДНК.....	51
2.13.2 Анализ данных секвенирования.....	51
2.14 Статистическая обработка результатов.....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	53
3.1 Оценка цитотоксической активности макрофагоподобных клеток, полученных в результате дифференцировки ТНР-1, HL-60, K562 и U937.....	53
3.2 Оценка цитотоксической активности макрофагоподобных клеток, полученных в результате дифференцировки ТНР-1 и HL-60 в модели.....	54
3.3 Получение опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов.....	55
3.4 Сравнение устойчивости исходных и сублиний опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов.....	56
3.5 Исследования <i>in vivo</i> .....	57
3.6 Анализ транскриптома.....	60
3.7 Функциональный анализ сублиний опухолевых клеток,	

устойчивых к цитотоксической активности макрофагов <i>in vitro</i> .....	74
3.7.1 Исследование способности клеток формировать колонии в условиях разреженной популяции.....	74
3.7.2 Исследование динамики роста.....	73
3.7.3 Анализ миграционной активности.....	75
3.7.4 Анализ уровня секреции матриксных металлопротеиназ .....	77
3.7.5 Исследование активности белков, потенциально вовлеченных в формирование устойчивости.....	78
3.7.6 Анализ чувствительности опухолевых клеток к действию цитостатиков.....	80
3.7.7 Результаты иммуноцитохимического анализа.....	80
3.8 Исследование фенотипа стромальных иммунокомпетентных клеток рака предстательной железы.....	85
3.8.1 Экспрессия AMACR, p63 и Ki-67.....	87
3.8.2 Экспрессия маркеров Т-клеток в строме опухоли рака предстательной железы.....	87
3.8.3 Экспрессия маркеров макрофагов в строме опухоли рака предстательной железы.....	90
3.8.4 Экспрессия маркеров нейтрофилов и В-лимфоцитов в ткани рака предстательной железы.....	95
3.8.5 Экспрессия PD-L1, IDO1 и TNF в опухоли предстательной железы.....	96
3.8.6 Корреляционный анализ клеточного состава стромы опухолей рака предстательной железы.....	100
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	102
4.1 Получение опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов <i>in vitro</i> .....	102
4.2 Функциональные характеристики опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов.....	104
4.3 Характеристики транскриптома опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов.....	108
4.4. Особенности фенотипа клеток воспалительного инфильтрата опухолевой стромы рака предстательной железы и их клиническая значимость.....	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114
ВЫВОДЫ.....	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

На сегодняшний день препараты, используемые для лекарственной терапии опухолей, можно разделить на такие основные группы, как химиотерапевтические, препараты таргетного действия, гормональные и иммунопрепараты, а также гормональные препараты. Основным недостатком химиотерапевтических цитотоксических агентов является неизбирательность их действия, что увеличивает их токсичность, приводит к увеличению длительности лечения, которое значительно понижает качество жизни. Также многие химиотерапевтические препараты являются мутагенами, способствующими повышению генетической нестабильности опухолей и, как следствие, к возникновению приобретенной резистентности опухоли, что также препятствует успешному лечению.

Открытие сигнальных путей, обеспечивающих конкурентные преимущества опухолевых клеток перед здоровыми клетками организма, позволило создавать таргетные препараты, регулирующие определенные сигнальные каскады. Использование препаратов с подобным механизмом действия (трастузумаб, бевацизумаб, сунитиниб, сорафениб и др.) привело к новым успехам лекарственного лечения опухолей. Однако на данный момент стало понятно, что даже такого подхода к терапии онкозаболеваний недостаточно. Несмотря на избирательную активность таргетных препаратов, их побочное системное действие оказывается достаточно сильным. Также таргетная терапия часто сталкивается с проблемой приобретения опухолевыми клетками устойчивости к используемым препаратам [6, 7].

Одним из наиболее современных и перспективных методов лечения злокачественных новообразований является иммунотерапия. Последние достижения в этой области демонстрируют хорошие результаты: наблюдается увеличение общей выживаемости и частоты объективных ответов у пациентов с различными типами опухолей. Также как и в случае таргетных препаратов одной из основных проблем иммунотерапии опухолей является формирование их устойчивости к лечению, обусловленное как отбором опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности клеток иммунитета, так и снижением или потерей цитотоксической активности последних. Для разработки высокоэффективных иммунопрепаратов необходимо понимание механизмов опухолевой прогрессии под давлением цитотоксического воздействия клеток иммунитета.

Первичный ответ на опухоль осуществляется клетками врожденного иммунитета естественными киллерами (NK-клетки) и нейтрофилами. Благодаря адаптивному иммунному ответу осуществляется таргетное действие против злокачественно трансформированных клеток.

Адаптивный иммунитет осуществляется, преимущественно, цитотоксическими Т-лимфоцитами. Данные клетки посредством поверхностных Т-клеточных рецепторов способны распознавать опухолевые антигены на поверхности клеток посредством с последующей продукцией цитотоксических молекул, таких как перфорин и гранзимы, которые вызывают апоптоз (программированную клеточную гибель) в опухолевых клетках. Кроме того, В-лимфоциты могут играть роль в адаптивном иммунном ответе против опухолевых клеток путем продуцирования антител. Антитела помогают клеткам врожденной иммунной системы, таких как НК-клетки, макрофаги, распознавать опухолевые клетки и элиминировать их. Макрофаги обладают как эффекторными, так и регуляторными свойствами. Данная работа посвящена изучению эффекторной функции макрофагов в контексте выработки опухолевыми клетками механизмов ухода из-под иммунологического надзора.

Макрофаги способны не только активировать адаптивный иммунный ответ, опосредованный активацией Т-клеток, но также обладают собственной цитотоксической активностью. Современные литературные данные свидетельствуют о том, что макрофаги могут формировать множество функциональных фенотипов в ответ на действие цитокинов и других факторов микроокружения. Наиболее изученными на сегодняшний день являются два из них: цитотоксический, провоспалительный (M1) и иммуномодуляторный, супрессорный (M2), характерные для разных стадий воспалительной реакции. M1-макрофаги участвуют в инициации воспаления и деструкции патогена, в то время как M2-макрофаги регулируют стадию супрессии воспаления и завершения иммунного ответа [1, 8, 9].

Макрофаги способны спонтанно уничтожать опухолевые клетки, однако их цитотоксичность может быть значительно увеличена посредством соответствующей стимуляции (M1) в процессе дифференцировки или активации. Основными активаторами цитотоксической активности макрофагов традиционно считаются интерферон гамма (IFN $\gamma$ ), а также бактериальные продукты - липополисахарид (LPS) и мурамиловый дипептид (MDP). Уничтожение неопластических клеток осуществляется посредством индукции макрофагами некроза и апоптоза опухолевых клеток, а также посредством фагоцитоза с последующим лизисом [10].

Механизм цитотоксичности макрофагов не изучен в полной мере. Известно, что этот процесс может протекать как зависимо от непосредственного контакта с опухолевыми клетками, так и независимо от контакта. Контакт-зависимый механизм в свою очередь подразделяется на антитело-зависимый (ADCC) и антитело-независимый. Механизм ADCC является ключевым механизмом уничтожения опухолевых клеток и изучен довольно хорошо. Цитотоксическая активность макрофагов в этом случае индуцируется В-клетками, которые продуцируют антитела к опухолевым антигенам. Макрофаги распознают и связываются с

трансформированными клетками посредством представленных на их поверхности антител. Связь с антителами устанавливается через Fc рецепторы, расположенные на мембране макрофагов. Антитело-зависимый механизм может быть усилен цитокинами IL-15, IL-21, IL-18, IL-2 [11, 12]. Антитело-независимый механизм практически не изучен. Известно, что распознавание в этом случае происходит посредством некоторых гликопротеинов, расположенных на поверхности опухолевых клеток. Гликозилирование, процесс добавления углеводных групп к белкам и другим молекулам, играет важную роль в клеточной сигнализации и межклеточных взаимодействиях. В опухолевых клетках часто происходит изменение профиля гликозилирования мембранных белков и липидов. С злокачественной трансформацией связаны в основном два типа нарушений гликозилирования белков: усечение коротких олигосахаридных структур и модификация периферических структур — антигенов Льюиса и групповых антигенов крови ABO [13]. Макрофаги могут распознавать изменения в гликозилированных молекулах с помощью определенных рецепторов (например, CD62L – L-селектин, маннозный рецептор и Dectin-1). Данное взаимодействие приводит к активации цитотоксической активности макрофагов и уничтожению злокачественно трансформированной клетки. Механизм распознавания опухолевых клеток на основе гликозилирования макрофагами может быть использован в иммуноонкологии для разработки новых стратегий иммунотерапии. Исследования в этой области находятся в стадии разработки, и требуются дальнейшие исследования для определения эффективности и безопасности такого подхода.

Контакт-независимый механизм цитотоксичности осуществляется посредством растворимых факторов, продуцируемых макрофагами. Одним из первых цитокинов, описанных как важнейший регулятор роста опухолевых клеток является TNF (фактор некроза опухоли). Он в свою очередь действует синергически с другими цитокинами: IL-1 или IFN $\gamma$  [10].

Учитывая такие характерные признаки опухолевых клеток, как пониженная чувствительность к рост ингибирующим сигналам, ослабление индукции апоптоза и генетическая нестабильность, можно предположить наличие у них способности к приобретению устойчивости к цитотоксической активности макрофагов.

### **Цель исследования**

Целью данного исследования является изучение механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов.

### Задачи исследования

1. Получить сублинии рака предстательной железы, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов.
2. Провести функциональный анализ полученных сублиний клеточных линий *in vitro* и *in vivo*.
3. Исследовать влияние приобретенной устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов на экспрессию и функциональную активность белков, вовлеченных в процесс опухолевой прогрессии.
4. Охарактеризовать механизмы устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов и потенциальные способы их регулирования.
5. Определить клиническую значимость фенотипа клеток воспалительного инфильтрата опухолевой стромы рака предстательной железы.

### Научная новизна

В данном исследовании впервые на модели рака предстательной железы рассмотрено взаимодействие опухолевых клеток с цитотоксическими макрофагами (M1) посредством как контакт-зависимого, так и контакт-независимого антитело-независимого механизма. Для этого в лаборатории разработана уникальная клеточная модель сокультивирования *in vitro* цитотоксических макрофагов с неопластическими клетками, позволяющая как изучать механизмы цитотоксичности, так и получать опухолевые клетки, устойчивые к данному воздействию.

В данном исследовании разработана экспериментальная система для изучения цитотоксической активности макрофагов. Впервые получены и сублинии клеток рака предстательной железы, устойчивые к их цитотоксическому воздействию. Выявлены механизмы приобретения устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета.

Результаты проведенного исследования позволят разрабатывать новые иммунотерапевтические стратегии, которые помогут преодолеть проблему резистентности опухолевых клеток к терапии.



## Теоретическая и практическая значимость

В данной работе показан принципиально новый механизм взаимодействия опухолевых клеток с макрофагами, что представляет большой интерес для фундаментальной науки. А именно, под воздействием цитотоксических клеток врожденного иммунитета происходит отбор опухолевых клеток более злокачественного фенотипа, что приводит к опухолевой прогрессии. Практическая значимость данной работы обусловлена тем, что одним из направлений разработки иммунотерапевтических противоопухолевых препаратов является поиск возможностей преодолеть развитие устойчивости опухолевых клеток к их воздействию и результаты, полученные в представленном исследовании, могут помочь в решении данной проблемы.

## Методология и методы исследования

В работе использованы современные молекулярно-биологические и иммунологические методы, а также клеточные технологии. В качестве модельной системы *in vitro* были использованы клетки линии промиелоцитарного лейкоза ТНР-1 и рака предстательной железы РС3 и Du145. Для оценки характеристик полученных сублиний клеточных линий использовали различные культуральные методы: анализ динамики роста клеток, тест на образование колоний в условиях разреженной популяции, тест на миграцию клеток по градиенту концентраций факторов роста, получение и характеристика ксенографтов *in vivo* на лабораторных животных. Использованные молекулярно-биологические методы включали в себя полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени и высокопроизводительное секвенирование с использованием геномных технологий (RNAseq). Для фенотипирования полученных клеток и образцов опухолей использовали иммуноцитохимию, иммуногистохимию, а также вестерн-блот и иммуноферментный анализ. Статистическая обработка результатов включала в себя непараметрические критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, коэффициент ранговой корреляции Спирмена. В случае нормального распределения и примерно равных дисперсий для сравнения двух выборок использовался критерий Стьюдента; для трех и более выборок использовался одномерный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим использованием критерия Даннета для сравнения с контрольной выборкой. Для сравнения долей применяли точный критерий Фишера.

### **Положения, выносимые на защиту**

- 1) Разработана клеточная модель для изучения механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов *in vitro*, позволяющая получать клоны опухолевых клеток, устойчивые к данному воздействию;
- 2) Клетки, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, обладали более злокачественным фенотипом по сравнению с исходными клетками *in vitro* и *in vivo*;
- 3) Выявлены механизмы, участвующие в приобретении опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагов;
- 4) Определена клиническая значимость клеточного состава воспалительного инфильтрата опухолей предстательной железы.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия («Биологические науки»), направлению исследований: п. 2 Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.).

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, воспроизводимостью результатов, использованием современных методов исследования, корректным применением статистических методов, критическим анализом результатов исследования и сопоставлении их с актуальными литературными данными.

Результаты исследования были представлены на 12 научных конференциях: XXVIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Научные лабораторные технологии для клинической медицины» (Москва, Россия, 2022 г.), IV Всероссийская конференция с международным участием «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» (Республика Алтай, Майминский район, с. Майма, 2022 г.), VII, VIII Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, Россия, 2021 г., 2022 г.), XVI Международный конгресс РООУ (Москва, Россия, 2021 г.), Международный форум инновационная онкология (Москва, Россия, 2021 г.), V-VII

Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 2019 г., 2021 г., 2022 г.), XXIII, XXV, XXVI Российский Онкологический Конгресс (Москва, Россия, 2019 г., 2021 г., 2022 г.).

Апробация диссертации состоялась 15.09.2023 года на объединенной научной конференции отдела молекулярной биологии опухолей, отдела экспериментальной биологии опухолей, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории вирусного канцерогенеза, лаборатории молекулярной биологии вирусов, лаборатории онкогеномики, отдела иммунохимии, Лаборатории механизмов регуляции иммунитета, лаборатории биологии стромальных клеток опухолей, лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток, лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов, отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза, лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликована 31 публикация, в том числе - 7 статей в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов исследований.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Рак предстательной железы

Рак предстательной железы (РПЖ) – один из наиболее распространённых видов онкологических заболеваний, на долю которого приходится порядка 7,3% всех случаев злокачественных новообразований (ЗНО) (по данным МАИР за 2020 год) [14]. РПЖ у мужчин является наиболее часто диагностируемым видом злокачественных опухолей. Показатели заболеваемости варьируют в разных регионах. По данным МАИР за 2020 год самая высокая заболеваемость раком предстательной железы зарегистрирована в странах Северной и Западной Европы, а показатели смертности от данного заболевания наиболее высоки в странах Карибского бассейна. Факторами риска развития рака предстательной железы принято считать пожилой возраст, семейный анамнез и некоторые генетические изменения (мутации генов *BRCA1* и *BRCA2*, синдром Линча), а также этническую принадлежность. Так, эпидемиологические данные указывают на то, что риску развития РПЖ наиболее подвержены мужчины западноафриканского происхождения [15]. Среди факторов образа жизни и окружающей среды, влияющих на возникновение РПЖ, выделяют, прежде всего, канцерогены табачного дыма, избыточную массу тела и повышенное содержание молочных продуктов в рационе [16].

Современная международная гистологическая классификация выделяет несколько типов опухолей предстательной железы в зависимости от происхождения. Подавляющее большинство этих злокачественных новообразований имеют эпителиальное происхождение и представляют собой карциномы [17].

Рак предстательной железы представляет собой гетерогенное заболевание по клиническим, морфологическим и молекулярно-биологическим параметрам. Различные виды РПЖ отличаются темпами роста и прогнозом. Так, гормонрезистентный рак предстательной железы характеризуется быстрым развитием и худшим прогнозом, в отличие от андрогензависимых форм заболевания [18]. Перинеуральная инвазия после хирургического вмешательства повышает риск прогрессирования заболевания в два раза [2].

Определение уровня простатического специфического антигена (ПСА) и биопсия с последующей гистологической верификацией является «золотым стандартом» диагностики ЗНО данной локализации [19]. Также клинически значимым фактором является оценка опухоли по шкале Глисона. Индекс Глисона отражает степень дифференцировки опухолевых клеток: более высокому значению соответствует ЗНО большей степени злокачественности [20]. Для

пациентов с РПЖ генетическое тестирование не получило широкого распространения, ввиду отсутствия на сегодняшний день общепринятых прогностических и диагностических маркеров.

Выбор тактики лечения РПЖ зависит от совокупных морфологических, клинических, биохимических и молекулярно-биологических характеристик пациента. Рак предстательной железы низкой степени злокачественности может нуждаться только в активном наблюдении. Гормончувствительный тип РПЖ лечится, преимущественно, при помощи андрогенной депривации. Однако литературные данные свидетельствуют о том, что длительная гормонотерапия может вести к развитию более злокачественного, гормонрезистентного фенотипа опухоли, характеризующегося плохим прогнозом [21]. Радикальная простатэктомия является наиболее эффективным методом лечения локализованного РПЖ и иногда используется для лечения распространенной формы заболевания в сочетании с другими методами лечения. Вторым наиболее распространенным методом лечения РПЖ является лучевая терапия. Химиотерапевтические препараты в случае РПЖ применяются, в основном, в комбинации с гормонотерапией и представлены преимущественно алкалоидами [21].

РПЖ является одним из первых типов опухолей, для лечения которого была одобрена иммунотерапия с использованием препарата Sipuleucel-T (дендритно-клеточная вакцина), однако данный препарат имеет ограниченное признание медицинского сообщества и не одобрен Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) [21]. Результаты использования современных иммунотерапевтических препаратов, направленных на иммунные контрольные точки, на сегодняшний день также неубедительны [21].

Эффективность терапии РПЖ во многом зависит от природы микроокружения опухоли [22]. В литературе представлены данные, свидетельствующие о том, что в случаях рака предстательной железы клетки воспалительного инфильтрата, в особенности макрофаги и Т-лимфоциты вносят вклад в прогрессию заболевания и влияют на ответ опухоли на лечение [23]. Известно, что в контексте РПЖ микроокружение имеет иммуносупрессорный характер, что может опосредовать плохой ответ на применение иммунотерапевтических препаратов [24]. В таком случае более глубокое понимание механизмов взаимодействия макрофагов с опухолевыми клетками позволит предложить новую терапевтическую стратегию для повышения эффективности иммунотерапии и преодоления формирующейся резистентности.

## **1.2 Микроокружение опухоли и его роль в прогрессии заболевания**

На сегодняшний день известно, что опухолевая строма является неотъемлемой частью злокачественного новообразования и играет важную роль в развитии заболевания. Строма опухоли преимущественно состоит из различных типов мезенхимальных клеток, таких как

фибробласты, эндотелиоциты, иммунных клеток и др. [25]. На первом этапе формирования новообразования иммунные клетки опухолевой стромы могут выполнять противоопухолевые функции, но по мере развития заболевания их фенотип изменяется в сторону иммуносупрессорного, что, в итоге, способствует опухолевой прогрессии.

Иммунный инфильтрат опухоли состоит из Т-клеток, нейтрофилов, макрофагов, миелоидных клеток, НК- и дендритных клеток. По отношению к опухоли эти клетки выполняют различные функции. Первоначальная функция иммунного окружения – элиминация злокачественно трансформированных клеток. Однако опухолевые клетки способны оказывать влияние на цитотоксические клетки микроокружения, «перепрограммируя» их на выполнение иммуносупрессорной функции. Описание этапов развития опухоли на примере взаимодействия с иммунными клетками хорошо отражено в теории иммуноредактирования, сформулированной Робертом Шрайбером. Согласно данной теории, взаимодействие злокачественного новообразования с иммунной системой протекает в три стадии: “элиминация” (elimination), “равновесие” (equilibrium) и “избегание” (escape) [26].

На начальном этапе канцерогенеза развивается активный иммунный ответ, направленный на злокачественно трансформированные клетки. Макрофаги играют ключевую роль в данном процессе. На данном этапе развития опухолевые клетки экспрессируют широкий спектр антигенов, которые могут быть распознаны макрофагами. К наиболее известным опухолеассоциированными антигенами относятся белки семейства MAGE, GAGE и BAGE, а также гликопротеины 100 (gp100), NY-ESO-1, ER-2/neu, MUC1, WT-1 и многие другие [27]. Привлеченные в зону опухоли иммунные клетки осуществляют элиминацию злокачественно трансформированных клеток. Однако популяция опухолевых клеток гетерогенна уже на ранних этапах развития и не все злокачественные клетки обладают высокой иммуногенностью. Таким образом на данном этапе происходит отбор опухолевых клеток, характеризующихся низкой экспрессией антигенов, что позволяет им ускользать от иммунологического надзора. Тем самым опухоль может продолжать существовать, однако в условиях нормального функционирования иммунной системы, без активного развития. Согласно теории Шрайбера такое состояние является второй стадией формирования опухоли – «равновесие».

Стадия “равновесия” (equilibrium) зачастую может протекать годами, не влияя на качество жизни больного, и, тем самым, не диагностироваться. За это время в условиях иммунного ответа происходит естественный отбор клонов злокачественных клеток, обладающих адаптационными механизмами, возникшими в результате мутагенеза. Так, например, опухолевые клетки, гиперэкспрессирующие поверхностный рецептор CD47, уходят из-под иммунологического надзора путем ингибирования фагоцитоза макрофагов, опосредованного связыванием CD47 с сигнальным регуляторным белком SIRP $\alpha$  на поверхности

макрофагов [28]. Гиперэкспрессия рецептора Her2/neu на поверхности опухолевых клеток способствует повышению скорости пролиферации, выживанию и инвазии [29]. В результате мутагенеза опухолевые клетки способны экспрессировать поверхностные и растворимые молекулы, оказывающие влияние на активацию клеток иммунной системы. Так, например, экспрессия цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена 4 (CTLA-4) на поверхности опухолевой клетки ведет к ингибированию цитотоксической активности Т-клеток [30]. Продукция злокачественно трансформированными клетками IL-6, IL-13, IL-2 и IL-12 способствует реполяризации цитотоксических макрофагов в сторону иммунорегуляторных [31]. Такие макрофаги, в свою очередь, начинают вырабатывать факторы, способствующие прогрессии опухоли, например трансформирующий фактор роста бета (TGF $\beta$ ) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [32]. Таким образом, в микроокружении опухоли появляются клетки иммуносупрессорного фенотипа, способствующие прогрессии заболевания, что служит отправной точкой стадии “избегания” (escape). На данной стадии злокачественное новообразование начинает активно развиваться и метастазировать.

Таким образом клетки опухолевого микроокружения по своим функциям можно условно разделить на две группы. К первой группе относят цитотоксические клетки (дендритные клетки, провоспалительные макрофаги (M1), CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, В-лимфоциты и NK-клетки), способствующие подавлению прогрессии опухоли. Напротив, регуляторные Т-клетки (Treg) и иммуносупрессорные макрофаги (M2) снижают эффективность иммунного ответа за счет ограничения активации лимфоцитов и специфических иммунных реакций. Миелоидные супрессорные клетки также определяют злокачественность опухоли путем подавления функций NK- и Т-клеток, участия в активации Treg, а также поддержания ангиогенеза и метастазирования [33]. Макрофаги представляют собой многофункциональные клетки, фенотип которых развивается под воздействием окружающей цитокиновой среды. В контексте опухоли, в результате действия продуцируемых ее клетками цитокинов и ростовых факторов, формируется иммуносупрессорный фенотип макрофагов – M2. Данные клетки способствуют прогрессии опухоли и увеличению ее злокачественного потенциала [34]. Результаты многочисленных исследований показывают, что макрофаги являются преобладающей популяцией опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток [35]. Более того, известно, что повышенная инфильтрация данных клеток в строме опухоли является маркером неблагоприятного прогноза для большинства солидных опухолей, включая рак предстательной железы [36].

### 1.3 Макрофаги и их биологические функции

Термин «макрофаги» был предложен И.И. Мечниковым в 1892 году при описании фагоцитоза. Сегодня макрофаги относят к клеткам мононуклеарной фагоцитарной системы. Изучение происхождения и функций этих клеток до сих пор актуально ввиду их значительного влияния на поддержание гомеостаза и патогенез различных заболеваний.

Долгое время считалось, что макрофаги, присутствующие в тканях взрослых млекопитающих, дифференцируются из моноцитов крови. За последнее десятилетие произошла смена парадигмы о происхождении тканевых макрофагов. На животных моделях было показано, что большинство тканевых макрофагов образуется во время эмбрионального развития, однако в ответ на воспаление и с течением возраста доминирующей популяцией становятся макрофаги, дифференцированные из циркулирующих моноцитов [37, 38]. Макрофаги происходят из гематопозитических клеток-предшественников, расположенных в желточном мешке, фетальной печени и костном мозге. В зависимости от локализации под влиянием тканеспецифического микроокружения фенотип и функции резидентных макрофагов могут отличаться. Некоторые резидентные макрофаги имеют определенное название в зависимости от локализации: остеокласты (кости), клетки Купфера (печень), альвеолярные макрофаги (легкие), микроглия (центральная нервная система) [39]. Нерезидентные макрофаги происходят из миелоидных предшественников, которые развиваются до стадии промоноцитов и дальше дифференцируются в моноциты, которые попадают в кровь. В циркулирующей крови моноциты сталкиваются с многочисленными факторами (цитокины, хемокины, гормоны, иммуноглобулины, жирные кислоты и др.), которые определяют их фенотипические и функциональные характеристики [40]. Поляризация макрофагов носит обратимый характер.

Благодаря фенотипической пластичности функции макрофагов в организме чрезвычайно разнообразны. Данные клетки играют ключевую роль в поддержании гомеостаза, регуляции воспаления (регуляторная функция), элиминации чужеродных агентов (вирусов, бактерий), а также мутировавших, злокачественно трансформированных клеток организма (эффекторная функция).

Основная функция резидентных макрофагов заключается в поддержании целостности и нормального функционирования ткани. Исследования функций микроглии показали, что данные клетки способствуют нейрогенезу, передаче нервного импульса, миграции и дифференцировке нейронных клеток-предшественников, элиминации злокачественно трансформированных клеток, а также секретируют факторы, необходимые для обучения и памяти [41]. Клетки Купфера вносят вклад во все виды обмена веществ, осуществляемых в печени, необходимы для образования билирубина, обладают бактерицидной активностью,



регулируют репаративную регенерацию печени [42]. Остеокласты необходимы для формирования кости: костная ткань непрерывно ремоделируется за счет резорбции остеокластами и образования новой ткани остеобластами [43]. Гомеостатические функции альвеолярных макрофагов выражены, в первую очередь, в поддержании нормального уровня сурфактанта [44]. Данный белковый комплекс в норме выстилает альвеолы изнутри, способствуя их стабилизации. Нарушение метаболизма сурфактанта и его накопление ведет к формированию патологических состояний, таких как легочный альвеолярный протеиноз [45].

Резидентные макрофаги осуществляют иммунологический надзор. Экспрессируя широкий спектр рецепторов для распознавания антигенов (Toll-подобные рецепторы (от англ. Toll-like receptor (TLRs)), NOD-подобные рецепторы, семейство RIG-I, лектины и рецепторы-мусорщики), резидентные макрофаги запускают иммунный ответ, привлекая лимфоциты, нейтрофилы и моноциты [46]. Во время воспалительного процесса уровень резидентных макрофагов поддерживается благодаря их способности к пролиферации [47]. Данные клетки участвуют в контракции воспаления посредством фагоцитоза, за счет которого осуществляется элиминация продуктов распада, а также способствуют ремоделированию ткани благодаря секреции ростовых факторов. Параллельно в очаге воспаления формируется популяция привлеченных макрофагов моноцитарного происхождения [48]. Было показано, что данная популяция превалирует на стадии разрешения воспаления [49].

Существуют данные о том, что макрофаги моноцитарного происхождения способствуют формированию патологических состояний. Так, было показано, что макрофаги, происходящие из моноцитов, способствуют развитию сердечно-сосудистых заболеваний, в то время как резидентные макрофаги данной локализации способствуют пролиферации кардиомиоцитов и регенерации поврежденных тканей [50, 51]. Макрофаги моноцитарного происхождения участвуют в прогрессировании различных заболеваний печени [52]. Данный эффект во многом обусловлен цитотоксической активностью макрофагов моноцитарного происхождения, что способствует формированию очага хронического воспаления.

Секретируемые макрофагами молекулы выполняют большое количество разнообразных функций в организме: регулируют рост клеток, стимулируют ангиогенез, запускают и подавляют различные иммунные реакции. Факторы свертывания крови, компоненты внеклеточного матрикса и ферменты для его перестройки участвуют в процессах регенерации поврежденных тканей [53]. Аллергические реакции и хроническое воспаление – зачастую результат нарушения процессов секреции макрофагами факторов инициации и подавления воспаления [54]. Аномально высокая продукция факторов, отвечающих за восстановление ткани после завершения воспаления, может приводить к фиброзу различных органов, саркоидозу и развитию онкологических процессов [55].

#### 1.4 Фенотипы макрофагов

Плюрипотентная природа функций макрофагов в организме обусловлена их фенотипической гетерогенностью и пластичностью. Существует по меньшей мере два типа активации макрофагов: классическая (M1) и альтернативная (M2). Классический или провоспалительный фенотип формируется в ответ на действие цитокинов, секретируемых Т-клетками Th1 типа (IFN $\gamma$  и TNF), компонентов клеточной стенки бактерий (LPS, MDP) и других патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMP). M1 макрофаги участвуют в воспалении, обладают цитотоксической и противоопухолевой активностью. Данные клетки выступают основными продуцентами эффекторных молекул и провоспалительных цитокинов, в то время как экспрессия иммуносупрессорного IL-10 данными клетками осуществляется на низком уровне. Классическая активация цитотоксических макрофагов осуществляется преимущественно под действием IFN $\gamma$  и лигандов TLRs. M1 макрофаги характеризуются повышенной экспрессией рецепторов главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) [56, 57]. Маркерами M1 макрофагов также принято считать CD11c, CD86 и фосфорилированную форму STAT1 (pSTAT1). pSTAT1 сужит транскрипционным фактором генов, регулирующих основные функции цитотоксических макрофагов [57].

В ответ на действие цитокинов, секретируемых Т-клетками Th2 типа (IL-4, IL-13, IL-33, IL-10, IL-21), TGF $\beta$ , витамина D3, глюкокортикоидов формируется иммуносупрессорный M2 фенотип макрофагов. Данные клетки обладают противовоспалительными функциями, способствуют регенерации тканей и оказывают проопухолевое действие. Формирование M2 фенотипа макрофагов преимущественно осуществляется посредством активации транскрипционного фактора STAT6 [58]. M2 макрофаги характеризуются повышенной продукцией противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGF- $\beta$ ), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и низкой секрецией IL-12. Маркерами M2 макрофагов принято считать повышенную экспрессию маннозного рецептора-1 (CD206) и рецепторы-мусорщики макрофагов (CD204 и CD163) [59, 60].

Следует отметить, что в литературе M2 макрофаги дополнительно подразделяют на подтипы M2a, M2b, M2c и M2d в зависимости от стимулирующего их агента и профиля экспрессии маркеров [61]. Так, M2a фенотип формируется в ответ на действие IL-4 и IL-13. Данные клетки характеризуются повышенной экспрессией CD206, фибронектина, инсулиноподобного фактора роста (IGF) и TGF- $\beta$ . Основной функцией M2a макрофагов принято считать регенерацию тканей. M2b макрофаги формируются под действием иммунных комплексов и лигандов TLRs или агонистов рецептора IL-1. Данные клетки способны

продуцировать такие провоспалительные цитокины, как IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF. Фенотип M2c индуцируется IL-10. M2b и M2c макрофаги, в основном, выполняют регуляторные функции. Данные типы клеток характеризуются повышенным уровнем экспрессии рецептора протоонкогенной тирозинпротеинкиназы Mer, что обеспечивает им высокую способность к эффероцитозу [62]. Фенотип M2d формируется в ответ на действие агонистов TLR через аденозиновый рецептор. Макрофаги M2d характеризуются высоким уровнем экспрессии IL-10 и VEGF на фоне низкой продукции TNF и IL-12. Основными функциями данных клеток принято считать участие в ангиогенезе. Интересно, что для M2d фенотипа не характерна высокая экспрессия CD206, являющимся маркером всех остальных подтипов макрофагов M2.

Известно, что помимо внешних факторов, на поляризацию макрофагов могут влиять и внутриклеточные молекулы. В последнее время стало известно, что некоторые микроРНК (miRNA) участвуют в процессе поляризации макрофагов. Так, miR-720 способствует реполяризации M2 макрофагов в сторону M1 и подавляет активность фагоцитоза [60]. miR-127 повышает экспрессию провоспалительных цитокинов (IL-6 и IL-1 $\beta$ ), что может свидетельствовать об участии данной микроРНК в формировании M1 фенотипа макрофагов [64]. Имеются данные о том, что miR-23a/27a/24-2 участвуют в поляризации макрофагов в сторону M1 и способствуют регрессии опухоли [65]. Так, связываясь с A20, ингибитором NF $\kappa$ B, miR-23a стимулирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов. Данная микроРНК также подавляет передачу сигнала по JAK1/STAT6 пути, снижая тем самым выработку цитокинов, характерных для M2 макрофагов. Тот же эффект оказывает miR-27a через регуляторный фактор интерферона 4 (IRF4) и гамма-рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами (PPAR $\gamma$ ).

Помимо микроРНК, в поляризации макрофагов также могут принимать участие длинные некодирующие РНК (днРНК). Так, было обнаружено, что днРНК MM2P регулирует цитокин-зависимую поляризацию макрофагов в сторону M2 фенотипа [66]. Подавление экспрессии MM2P приводил к снижению концентрации pSTAT6 и, как следствие, к нарушению процесса поляризации.

### **1.5 Цитотоксическая активность макрофагов**

Цитотоксическая активность макрофагов позволяет данным клеткам уничтожать опухолевые клетки как прямым, так и опосредованными способами. Основными механизмами прямой цитотоксической активности макрофагов является фагоцитоз, продукция провоспалительных цитокинов и таких медиаторов воспаления, как монооксид азота, активные формы кислорода, под действием которых в клетке-мишени запускаются процессы

программируемой клеточной гибели (ПКГ) [67]. Также макрофаги привлекают в зону воспаления клетки адаптивного иммунитета (например, Т-лимфоциты).

Цитотоксическая активность характерна для классически активированных М1 макрофагов. М2 макрофаги способны к фагоцитозу лишь в некоторых случаях активации. Так, М2b макрофаги, активированные посредством TLRs, продуцируют TNF и IL-1 $\beta$ . Цитотоксическая активность макрофагов может быть значительно увеличена в ответ на действие IFN $\gamma$  и LPS, что опосредовано повышением экспрессии ко-стимулирующих молекул (CD80 и CD86), продукцией провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-27 и TNF, реактивных форм азота и кислорода [68].

По способу взаимодействия с клеткой-мишенью механизм цитотоксической активности макрофагов можно классифицировать на контакт-зависимый и протекающий не зависимо от прямого контакта.

Запуск контакт-независимой цитотоксической активности макрофагов, в основном, осуществляется в ответ на растворимые факторы (цитокины), продуцируемые Т-лимфоцитами (лимфокины) в результате взаимодействия Т-клеток с антигенпрезентирующими клетками или митогенами, такими как фитогемагглютинин (ФГА) и конканавалин А (Con A) [69]. К наиболее известным лимфокинам относят фактор активации макрофагов (MAF), фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF), продуцируемые Т-клетками не зависимо от контакта с опухолевой клеткой и специфический фактор активации макрофагов (SMAF), продуцируемый Т-лимфоцитами после взаимодействия с опухолевой клеткой [70]. В результате взаимодействия с лимфокинами происходит активация макрофагов. Цитотоксическая активность осуществляется без прямого физического контакта посредством секретлируемых макрофагами растворимых факторов, таких как цитокины, хемокины, а также активные формы кислорода и азота, которые приводят к гибели клеток-мишеней [68].

Контакт-зависимый механизм может протекать с посредством антител на поверхности таргетной клетки (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), а также без участия антител.

В контексте противоопухолевого иммунного ответа центральную роль занимает опосредованный макрофагами ADCC механизм цитотоксической активности. Более того, данный механизм опосредует действие многих иммунотерапевтических препаратов на основе моноклональных антител (mAbs) [29, 71]. Реализация ADCC макрофагами преимущественно осуществляется посредством фагоцитоза. Данный процесс запускается в результате связывания Fc-рецепторов на поверхности макрофагов с антителами на поверхности злокачественно трансформированных клеток. Данный механизм может быть усилен путем действия некоторых цитокинов и mAbs. Так, известно, что данной активностью обладают IL-15, IL-21, IL-18, IL-2; антитела к CD137, CD96, TIGIT, KIR, PD-1 [11]. Имеются данные и о том, что цитокины и

mAbs действуют синергетически в контексте противоопухолевой терапии. Так, IL-15 повышает эффективность применения mAb против CD20 и CD52 [72]. Известно, что количество задействованных Fc-рецептов на поверхности макрофагов прямо коррелирует с эффективностью ADCC в контексте опухолевых клеток [12].

Представленные в научной литературе данные о механизме антителонезависимой цитотоксической активности макрофагов фрагментарны. Известно, что данный процесс также требует опсонизации клетки-мишени. В данном случае в качестве опсоинов выступают факторы комплемента. Опсонизация опухолевых клеток C3-компонентом комплемента наряду с генерацией провоспалительных медиаторов C3a и C5a активируют цитотоксическую активность макрофагов. C3-компоненты комплемента на поверхности опухолевой клетки распознаются макрофагами посредством рецепторов комплемента CR3 и CR4 (CRs), в результате чего увеличивается Fc $\gamma$ R-опосредованная фагоцитарная активность [73]. Имеются данные о том, что фактор C9 играет критическую роль в опосредованной комплементом цитотоксической активности макрофагов в контексте немелкоклеточного рака легкого [74].

Антителонезависимая цитотоксическая активность макрофагов может быть усилена путем действия IFN $\gamma$ , продуктов бактериального происхождения LPS, MDP и других патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular patterns, PAMP). Действие IFN $\gamma$  опосредовано фосфорилированием транскрипционного фактора STAT1 с последующим запуском транскрипции порядка 200 генов, большая часть которых ассоциирована с воспалением [75]. В ответ на взаимодействие TLRs на поверхности макрофагов с PAMP запускается каскад реакций, приводящий к повышению цитотоксической активности иммунной клетки. Так, LPS, связываясь с TLR4, запускает каскад реакций, приводящий к активации транскрипционного фактора NF $\kappa$ B, в результате чего активируется транскрипция генов таких провоспалительных цитокинов, как TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-27, а также синтазы азота (NOS2) и др. [76]. Компонент клеточной стенки бактерий MDP активирует макрофаги посредством соединения с другим рецептором, NOD2. Данное взаимодействие также активирует NF $\kappa$ B с последующим повышением цитотоксического потенциала эффекторной клетки.

## 1.6 Фагоцитоз

Ключевым механизмом, с помощью которого макрофаги выполняют защитные функции в организме, является фагоцитоз. В результате данного процесса макрофаги захватывают и уничтожают апоптотические клетки, микроорганизмы и чужеродные вещества. Основными этапами фагоцитоза принято считать обнаружение патогена, его интернализация, образование

фагосомы, ее созревание и превращение в фаголизосому. Идентификация потенциальных мишеней фагоцитами осуществляется посредством связывания их поверхностных рецепторов с PAMP. В данном процессе участвуют такие рецепторы фагоцитов, как лектины С-типа, рецепторы-мусорщики, рецепторы Fc-gamma и CRs. Лигирование данных рецепторов запускает каскад реакций, приводящих к перестройкам актинового цитоскелета, в результате чего происходит захват чужеродной частицы [77, 78]. Toll-подобные рецепторы (TLRs) не являются фагоцитарными, однако обладают способностью обнаружения PAMP, повышая эффективность фагоцитоза [79]. Известно, что существуют различия в молекулярных механизмах фагоцитоза в зависимости от задействованного рецептора. Так, фагоцитоз апоптотических клеток осуществляется посредством рецепторов TIM-1, TIM-4, стабиллина-2 и VAI-1, интегрина  $\alpha_v\beta_5$ , CD36, CD14 на поверхности эффекторной клетки [80]. Фагоцитоз микроорганизмов осуществляется путем связывания лектинов С-типа фагоцитов с молекулами PAMP на поверхности клеток-мишеней. Рецепторы комплемента связываются с PAMP, активированными молекулами комплемента.

Антителозависимый фагоцитоз (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) осуществляется посредством Fc $\gamma$ -рецепторов. Данный механизм задействует как врожденный, так и адаптивный иммунитет. Все классы Fc $\gamma$ -рецепторов экспрессируются макрофагами, что обуславливает их высокую способность к ADCP. Для запуска ADCP необходимо лигирование рецепторов Fc $\gamma$  на поверхности макрофагов с Fc-фрагментами антител, расположенных на поверхности клетки-мишени. В семействе человеческих Fc $\gamma$ R все, кроме Fc $\gamma$ RIIb (CD32b), представляют собой активирующие рецепторы. Активирующие рецепторы состоят из  $\alpha$ - и  $\gamma$ -цепей, в то время как ингибирующие содержат только  $\alpha$ -цепь. За связывание с лигандом отвечает  $\alpha$ -цепь, в то время как  $\gamma$ -цепь участвует в передаче сигнала [81, 82]. К активирующим рецепторам относятся Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIa (CD32a), Fc $\gamma$ RIIc (CD32c), Fc $\gamma$ RIIIa (CD16), Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b) и Fc $\gamma$ RI (CD89). Связывание данных рецепторов с антителами на поверхности патогена стимулируют фагоцитоз. Каскад реакций, запускаемый лигированием FcRs, сложен и зависит от рецептора Fc, типа эффекторных клеток и механизма стимуляции. Общими чертами данных реакций считается увеличение внутриклеточной концентрации катионов кальция, активации протеинкиназы C или RAS [82].

Связывание Fc фрагмента антител с рецепторами Fc $\gamma$  на поверхности макрофагов запускает ADCP посредством фосфорилирования иммунорецепторного мотива активации (ITAM) в составе Fc $\gamma$ R, который активирует нижестоящую передачу сигналов через Ras-GEF [81, 82]. Fc $\gamma$ RIIb является единственным Fc $\gamma$ R с иммунорецепторным мотивом ингибирования на основе тирозина (ITIM), фосфорилирование которого вызывает отрицательный сигнальный каскад для ингибирования фагоцитоза [81, 82].

Чтобы избежать обнаружения и элиминации системой врожденного иммунитета, опухолевые клетки используют различные способы. Так, показано, что экспрессия опухолевыми клетками PD-L1, CD47,  $\beta 2$  и лигандов LILRB2 ингибирует их фагоцитоз [83, 84]. В настоящее время CD47-SIRP $\alpha$  является наиболее востребованной контрольной точкой иммунитета при разработке противоопухолевых терапевтических средств. Индукция ADCP, опосредованная макрофагами, продемонстрировала клиническую эффективность и, по-видимому, является одним из механизмов противоопухолевого действия многих терапевтических антител. Было показано, что ADCP является механизмом действия таких препаратов, как трастузумаб, ритуксимаб и даратумумаб [85, 86]. Таким образом, изучение ADCP, опосредованного макрофагами, является актуальным научным направлением для разработки новых эффективных иммунотерапевтических препаратов.

### **1.7 Роль цитотоксической активности макрофагов в онкогенезе**

Первичная функция макрофагов в очаге злокачественного новообразования - противоопухолевая. Рекрутированные моноциты в первую очередь дифференцируются в M1-макрофаги и продуцируют ряд медиаторов воспаления, активирующий иммунный ответ. Некоторые из них запускают петли обратной связи. Так, например, продуцируемый M1 макрофагами IL-12 стимулирует естественные киллеры и дендритные клетки к секреции IFN $\gamma$ , который повышает цитотоксический потенциал макрофагов, выраженный, в том числе, в повышении уровня продукции активных форм кислорода и NO. Данные соединения приводят к активации апоптоза в клетке-мишени. Одними из основных мишеней активных форм кислорода в клетке (в том числе и злокачественно трансформированной) являются лизосомы. Окисление вызывает дестабилизацию мембраны лизосомы, что приводит к выходу лизосомальных ферментов и повреждению клетки. С целью защиты в клетке активируется процесс аутофагии, однако длительный оксидативный стресс приводит к так называемой аутофагической гибели клетки, которая классифицируется на сегодня как вид программируемой клеточной гибели [87]. Процессы программируемой клеточной гибели в опухолевой клетке запускаются и в ответ на другие воспалительные цитокины: TNF, IL-1 $\beta$ , MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) и др. ADCP сопровождается презентацией опухолевых антигенов Т-клеткам и активацией адаптивного противоопухолевого иммунного ответа. Активированные лимфоциты пролиферируют с образованием опухолеспецифических клонов и инфильтрируют опухоль, формируя противоопухолевый адаптивный иммунитет [88]. M1 макрофаги способны препятствовать развитию опухоли во многом за счет фагоцитоза и презентации антигенов на своей поверхности с привлечением CD8 $^{+}$  Т-клеток и цитотоксических NK-клеток [89].

Однако цитотоксическая активность макрофагов может оказывать и проопухолевый эффект. Реактивные формы кислорода, NO, а также ряд провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF, IFN $\gamma$ ) могут оказывать мутагенный эффект на клетки опухоли и их микроокружения [90-92]. Ряд хемокинов, продуцируемых цитотоксическими макрофагами, выступают хемоаттрактантами для регуляторных Т клеток, способствующих прогрессии опухоли [93]. Имеются данные о том, что TNF стимулирует ангиогенез, пролиферацию, инвазию и метастазирование некоторых типов опухолевых клеток [94]. Данный эффект обусловлен активацией сигнального пути NF $\kappa$ B в опухолевых клетках. Было показано, что под действием TNF утрачивается экспрессия белка gp100 клетками меланомы, в то время как уровень экспрессии рецептора фактора нейротрофинов (NGFR) повышается [95]. Белок gp100 является антигеном, распознаваемым цитотоксическими Т-лимфоцитами и макрофагами. Известно, что NGFR инактивирует опухолевый супрессор p53 и его повышенная экспрессия коррелирует с более злокачественным фенотипом опухоли [96]. TNF участвует в формировании опухолевого микроокружения, выступая хемоаттрактантом для эндотелиальных клеток, фибробластов и перицитов. Матриксные металлопротеиназы, продуцируемые цитотоксическими макрофагами на высоком уровне, способствуют инвазии и метастазированию опухоли [97]. Под действием IFN $\gamma$  макрофаги экспрессируют индоламин 2,3 – диоксигеназу (IDO), способствующую подавлению цитотоксической активности Т-лимфоцитов [98, 99].

### **1.8 Макрофаги, ассоциированные с опухолью**

Макрофаги, входящие в состав микроокружения опухоли, называют макрофагами, ассоциированными с опухолью (MAO). MAO представлены макрофагами цитотоксического (M1), регуляторного (M2) и смешанного (M1/M2) фенотипа. Считается, что M1 макрофаги подавляют прогрессию злокачественного новообразования, в то время как M2 являются иммуносупрессорами и способствуют опухолевой прогрессии. Соотношение M1/M2 макрофагов значительно меняется с развитием опухоли и зависит от ее стадии. Для ранних стадий преобладающей популяцией являются M1 макрофаги. При прогрессии новообразования, сопровождающейся секрецией биологически активных медиаторов, обладающих иммуносупрессорными свойствами, таких как IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, PGE $_2$ , TGF- $\beta$ 1, происходит поляризация макрофагов в сторону M2 фенотипа [100, 101]. На сегодняшний день взаимодействие макрофагов и опухолевых клеток изучается прежде всего в контексте MAO, обладающих иммуносупрессорными свойствами (M2-MAO). Известно, что повышенное содержание MAO в строме большинства солидных опухолей является маркером плохого



прогноза. Однако популяция MAO не является однородной. Гистологические исследования указывают на то, что фенотип MAO зависит от того, в какой части опухоли они находятся. MAO обладают свойствами M2 прежде всего в центральных областях опухоли, в то время как на периферии у макрофагов часто наблюдаются маркеры и свойства, характерные для цитотоксических M1 [102]. Изучение M1-MAO особенно важно в настоящее время, так как многие препараты на основе антител, используемые для иммунотерапии опухолей, формируют антитело-опосредованную цитотоксическую активность макрофагов 1 типа [103]. Известно, что M1 макрофаги в строме опухоли участвуют в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) опухолевых клеток, создают в микроокружении условия повышенной мутагенности и стимулируют ангиогенез [104].

Известно, что для поддержания численности MAO опухолевые клетки продуцируют такие хемоаттрактанты, как CCL2 и колониестимулирующий фактор-1 (CSF1) [93]. Ингибирование CSF1-R представляется перспективным терапевтическим подходом в лечении онкологических заболеваний [105, 106]. Результаты клинических испытаний демонстрируют, что наибольшей эффективностью в терапии ЗНО различных локализаций обладают комбинированные подходы применения антител против CSF1-R с моноклональными антителами (mAbs), направленными на другие контрольные точки, включая PD-1/PD-L1 и CD40 [107]. Была описана роль рецептора фактора активации тромбоцитов (PAFR) в формировании микроокружения и прогрессии опухоли [108]. Авторы заключили, что связывание эндогенных PAF-подобных молекул, секретируемых опухолевыми клетками, с PAFR на поверхности макрофагов способствует формированию иммуносупрессорного фенотипа M2.

Немаловажной является роль экзосомальных РНК при поляризации ассоциированных с опухолью макрофагов. Имеются данные о том, что днРНК RPPH1 в составе экзосом способствует формированию M2 фенотипа макрофагов микроокружения колоректального рака, тем самым способствуя прогрессии заболевания [109]. Экзосомальная miR-301a-3p стимулирует поляризацию макрофагов в M2 фенотип через PTEN/PI3K $\gamma$  сигнальный путь. Более высокий уровень циркулирующей miR-301a-3p ассоциирован с более поздней стадией заболевания, стадией TNM и худшим прогнозом в случае рака поджелудочной железы [110]. Было обнаружено, что экзосомальная miR-138-5p способствует формированию M2 фенотипа макрофагов и блокаде M1 поляризации [111]. Более того, уровень циркулирующей экзосомальной miR-138-5p положительно коррелировал с прогрессированием рака молочной железы. Авторы выявили, что ингибирование поляризации M1 осуществляется посредством связывания miR-138-5p с эпигенетическим фактором лизиндеметиلاзы 6B (KDM6B) [111].

MAO, в свою очередь, также могут оказывать влияние на функции опухолевых клеток прямым или опосредованным способом. Высвобождаемый M2-MAO CCL2 способствует

реполяризации цитотоксических Т-клеток в сторону регуляторных с формированием иммунного ответа Th2 типа [112]. Посредством масс-спектрометрического анализа было показано, что в случае рака желудка экзосомы, происходящие из M2 MAO, содержат высокое количество аполипротеина E (ApoE), который может активировать путь PI3K-Akt в опухолевых клетках и индуцировать ЭМП, тем самым увеличивая их метастатический потенциал [113]. Было показано, что экзосомальная miR-365, происходящая из MAO, опосредует снижение чувствительности аденокарциномы поджелудочной железы к действию гемцитабина [114]. Было показано, что в случае рака поджелудочной железы, miR-501-3p, выделенная из экзосом, секретированных M2-MAO, способствует прогрессии опухоли [115]. Имеются данные о том, что экзосомальная miR-223 M2 макрофагов может способствовать прогрессии опухолей разных локализаций [116-118]. Была выявлена роль miR-155-5p и miR-21-5p в патогенезе колоректального рака [119]. Авторы показали, что данные микроРНК передаются опухолевым клеткам от M2-MAO посредством экзосом, в результате чего наблюдается падение уровня экспрессии опухолевого супрессора BRG1 (Brahma-related gene-1), что ведет к повышению метастатической активности опухолевых клеток.

Таким образом, взаимодействие MAO и опухолевых клеток имеет двунаправленный характер: последние стимулируют формирование M2 фенотипа макрофагов, в то время как M2-макрофаги, в свою очередь, продуцируют ряд факторов, способствующих прогрессии опухоли. С точки зрения лечения онкологических заболеваний одинаково важным представляется как разработка методов, блокирующих формирование M2-MAO, так и способов реполяризации фенотипа макрофагов в сторону M1.

### **1.9 Макрофаги, ассоциированные с опухолью как мишень противоопухолевой терапии**

Известно, что повышенное содержание макрофагов в строме опухоли часто ассоциировано с неблагоприятным прогнозом и клинико-морфологическими характеристиками заболевания для злокачественных опухолей различных локализаций. Например, известно, что высокая плотность MAO является маркером неблагоприятного прогноза для больных раком молочной железы (РМЖ) [120]. Более того, авторами была выявлена ассоциация высокого содержания MAO с более злокачественным фенотипом клеток РМЖ. Результаты метаанализа прогностической значимости MAO в случаях рака яичников показали, что повышенное содержание M2-MAO является маркером худшего прогноза и характерно для более поздней стадии заболевания, в то время как повышенное содержание M1-MAO было ассоциировано с лучшим прогнозом заболевания [121]. Повышенное содержание M2-MAO в строме опухоли

является фактором неблагоприятного прогноза и в случае меланомы [122]. Повышенное содержание MAO в строме рака мочевого пузыря вне зависимости от фенотипа макрофагов являлось маркером неблагоприятного прогноза и было ассоциировано с худшими клинико-морфологическими характеристиками заболевания [123].

В результате метаанализа, посвященного роли макрофагов, ассоциированных с опухолью в случае рака предстательной железы, было выявлено, что более высокая плотность MAO связана с худшей выживаемостью, более высокой оценкой опухоли по шкале Глисона, наличием как отдаленных, так и регионарных метастазов [124]. Авторы заключили, что плотность MAO увеличивается по мере прогрессирования РПЖ. Следует отметить, что в данный метаанализ были включены исследования с использованием CD68 и CD204 в качестве маркеров. В исследовании когорты из 81 пациента с РПЖ, проведенном в США, была обнаружена обратная связь между количеством CD68+ MAO в ткани опухоли и клинической стадией, в то время как плотность MAO прямо коррелировала с оценкой Глисона [125]. Результаты исследований, проведенных в контексте РПЖ, свидетельствуют о том, что повышенная плотность M2 макрофагов, идентифицированных при помощи маркера CD163, ассоциирована с худшим прогнозом, экстракапсулярным распространением, более высокими показателями шкалы Глисона и частотой метастазирования [126-128].

Тот факт, что макрофаги являются наиболее многочисленной популяцией опухоле-инфильтрирующих иммунных клеток, понимание механизмов их цитотоксической активности, а также роли в опухолевой прогрессии сделали данные клетки перспективной мишенью для противоопухолевой терапии.

На сегодняшний день активно исследуются три основные стратегии лечения онкологических заболеваний, направленные на MAO: ингибирование инфильтрации опухолей макрофагами, активация их цитотоксической активности или реполяризация в M1 фенотип и элиминация MAO в целом [35]. В таблице 1 представлены примеры таргетных препаратов, многие из которых осуществляют сразу несколько функций.

**Таблица 1** – Противоопухолевые препараты, направленные на макрофаги, ассоциированные с опухолью

Название препарата	Тип молекулы	Мишень	Стратегия
Карлумаб	Моноклональное антитело	CCL2	Ингибирование инфильтрации
PF04136309	Малая молекула	CCR2	Ингибирование инфильтрации
PLX3397	Малая молекула	CSF1R	Ингибирование ильтрации

PLX7486	Малая молекула	CSF1R	Ингибирование инфильтрации, элиминация
JNJ-40346527	Малая молекула	CSF1R	Ингибирование инфильтрации, элиминация
ARRY-382	Малая молекула	CSF1R	Ингибирование инфильтрации, элиминация
BLZ945	Малая молекула	CSF1R	Ингибирование инфильтрации, элиминация, реполяризация
IMC-CS4	Моноклональное антитело	CSF1R	Ингибирование инфильтрации, элиминация
R05509554	Моноклональное антитело	CSF1R	Ингибирование инфильтрации, элиминация
RG7155	Моноклональное антитело	CSF1R	Ингибирование инфильтрации, элиминация
FPA008	Моноклональное антитело	CSF1R	Ингибирование инфильтрации, элиминация
Клодронат	Малая молекула	Нет данных	Элиминация
Золедроновая кислота	Малая молекула	Нет данных	Элиминация
Трабектин	Малая молекула	Каспаза 8	Элиминация
Hu5F9-G4	Моноклональное антитело	CD47	Реполяризация
CC-90002	Моноклональное антитело	CD47	Реполяризация
TTI-621	Гибридный белок	SIRP $\alpha$	Реполяризация
CP-870.893	Агонистическое	CD40	Реполяризация

	антитело		
RO7009789	Агонистическое антитело	CD40	Реполяризация
BCG	Ослабленный штамм <i>Mycobacterium bovis</i>	TLR2 и TLR4	Реполяризация
Имихимод	Малая молекула	TLR7	Реполяризация
852A	Малая молекула	TLR7	Реполяризация
ИМО-2055	Малая молекула	TLR9	Реполяризация

### 1.9.1 Ингибирование инфильтрации моноцитов

Привлечение моноцитов в зону опухоли осуществляется посредством множества хемоаттрактантов, секретируемых опухолевыми клетками, такими как CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8 и CXCL12 [129]. По литературным данным путь CCL2-CCR2 играет значимую роль в увеличении числа MAO в строме опухоли. Секретируемый опухолевыми клетками CCL2 привлекает классические моноциты, которые экспрессируют рецептор CCR2. Далее осуществляется поляризация моноцитов в про- или противовоспалительные макрофаги в зависимости от факторов окружающей среды. В микроокружении солидной опухоли данное взаимодействие в большей степени ведет к формированию иммуносупрессорного M2 фенотипа MAO, способствующего прогрессии новообразования. Известно, что ингибирование CCL2 способствует снижению опухолевой массы и метастазирования в различных экспериментальных моделях рака предстательной и молочной желез, легких и печени, а также меланомы [130]. Введение антител к CCL2 в сочетании с химиотерапией улучшало терапевтическую эффективность при лечении опухолей данных локализаций. Однако стоит отметить, что в случае РМЖ прекращение лечения антителом к CCL2 стимулировало рекрутинг моноцитов костного мозга в зону опухоли, ускоряя метастазирование в легкие [131]. Тем не менее высокие уровни CCL2 в сыворотке крови и строме опухоли ассоциированы с неблагоприятным прогнозом пациентов с различными солидными опухолями и в настоящий момент препараты, нацеленные на ингибирование оси CCL2-CCR2, проходят клинические испытания. Продемонстрирована терапевтическая эффективность применения селективного ингибитора CCR2 (PF04136309) в сочетании с химиотерапией в случаях неоперабельного рака поджелудочной железы [132]. Применение антитела к CCL2 (карлумаба) в случаях РПЖ на мышинной модели вело к снижению ангиогенеза и инфильтрации опухоли CD68+ макрофагами

[133, 134]. По результатам клинических испытаний фазы II монотерапии карлумаба у пациентов с метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (мКРРПЖ) терапевтическая эффективность не была достигнута (исследование NCT00992186). В результате проведенного клинического испытания фазы Ib применения карлумаба в сочетании с химиотерапией для пациентов с солидными опухолями не наблюдалось долгосрочного подавления SCL2 или значительных терапевтических ответов [135].

Противоречивые результаты клинических испытаний данных препаратов указывают на то, что для избирательного ингибирования рекрутинга моноцитов требуется гораздо более глубокое понимание механизмов данного процесса и, вероятно, использование других мишеней [136].

### 1.9.2 Элиминация макрофагов, ассоциированных с опухолью

Одним из механизмов элиминация MAO может являться использование препаратов из группы бисфосфонатов (золедроновая кислота, клодронат). Токсический эффект данных соединений опосредован расщеплением мембран макрофагов фосфолипазами [137]. Доставка бисфосфонатов в зону новообразования наиболее эффективно осуществляется посредством их упаковки в липосомы. Помимо элиминации бисфосфонаты способны ингибировать рекрутинг новых моноцитов. Так, на мышинной модели меланомы было показано, что доставка в составе липосом клодроната приводила как к сокращению роста опухоли более чем на 50% по сравнению с контролем, так и к ингибированию повторного рекрутинга моноцитов [138]. Однако исследования, в результате которых была показана терапевтическая эффективность бисфосфонатов в случае солидных опухолей, проведены на животных моделях, в то время как результаты клинических испытаний носят противоречивый характер [139].

Литературные данные свидетельствуют о том, что CSF1R является перспективной мишенью для элиминации и реполяризации макрофагов. Повышенное содержание CSF1R+ макрофагов в строме опухоли является фактором неблагоприятного прогноза для пациентов с солидными опухолями разных локализаций [36, 140]. Известными лигандами CSF1R являются хемокины CSF-1 и IL-34. Интересно, что IL-34 не обнаружен в циркуляции. Следовательно, действие данного интерлейкина ограничивается локальным микроокружением, в котором он экспрессируется [141]. Показано также, что макрофаги фенотипа M2, в отличие от M1 зависят от передачи сигналов CSF1R [107]. Накопленные данные о роли CSF1R в формировании и функциях макрофагов сделали его привлекательной мишенью не только для элиминации, но и реполяризации M2-MAO в сторону цитотоксического фенотипа. В настоящее время различные антитела и малые молекулы, направленные на CSF1R, проходят клинические испытания,

результаты которых отражают их терапевтическую пользу. Так, например, применение JNJ-40346527 в случаях лимфомы Ходжкина привело к полной ремиссии или стабилизации заболевания (исследование NCT01572519) (Таблица 1). Подобные результаты применения различных агентов, направленных на ингибирование CSF1R, наблюдались и в случаях РМЖ, рака шейки матки и глиом [142, 143]. Ингибирование CSF1R также может вызвать реполяризацию M2 макрофагов в сторону цитотоксического фенотипа. Так, например, имеются данные о том, что применение BLZ945 в сочетании с ингибиторами IGF1R и PI3K в случае глиомы вызывает реполяризацию MAO и увеличивает общую выживаемость (Таблица 1) [144].

### 1.9.3 Реполяризация макрофагов, ассоциированных с опухолью

Фенотипически-функциональная пластичность макрофагов интересна с точки зрения восстановления противоопухолевых свойств MAO. Активация цитотоксической активности MAO или их реполяризация в провоспалительный M1 фенотип на сегодняшний день является наиболее активно развивающейся стратегией. Данный метод позволяет действовать синергически с ингибиторами контрольных точек иммунитета и, тем самым, комплексно перепрограммировать проопухолевый иммунный инфильтрат в сторону цитотоксического, задействуя как макрофаги, так и Т-клетки. Механизм реполяризации макрофагов также обладает преимуществом по отношению к другим стратегиям, направленным на MAO, с точки зрения токсичности.

На сегодняшний день в терапевтической практике солидных опухолей широко распространена стратегия изменения функционального статуса Т-лимфоцитов при помощи блокады иммуносупрессорных рецепторов PD-1 и CTLA-4, а также лиганда PD-L1. Данная тактика приводит к повышению цитотоксического потенциала Т-клеток. Макрофаги составляют более многочисленную популяцию опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток и также могут быть использованы для перепрограммирования иммунного микроокружения опухоли. Для осуществления реполяризации MAO могут быть использованы препараты, нацеленные на CD47, SIRP $\alpha$ , CD40, TLRs, гистоновые деацетилазы (histone deacetylase, HDAC).

CD47 выполняет роль ингибирующего рецептора. Его связывание с SIRP $\alpha$  на поверхности макрофагов ведет к инактивации их способности к фагоцитозу. Это так называемый сигнал «не ешь меня», который в норме позволяет поддерживать гомеостаз иммунных клеток в организме. В контексте опухоли данный механизм позволяет злокачественным клеткам уходить от иммунологического надзора. Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что белок CD47 гиперэкспрессирован в различных типах солидных опухолях и выступает маркером плохого прогноза [145].

Взаимодействие CD47-SIRP $\alpha$  является известным механизмом ингибирования фагоцитоза, опосредованного макрофагами. SIRP $\alpha$  представляет собой мембранный белок, экспрессируемый, в основном, на поверхности макрофагов и формирующий иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM). Взаимодействие между концевым доменом NH<sub>2</sub> мотива ITIM и доменом CD47 приводит к активации вследствие фосфорилирования цитозольных тирозинфосфатаз SHP-1 или SHP-2, что запускает каскад реакций, ингибирующих фагоцитоз. Повышенная экспрессия CD47 на поверхности опухолевых клеток является одним из известных механизмов ухода опухоли из-под иммунологического надзора [146]. Был обнаружен еще один механизм ускользания опухоли от фагоцитоза макрофагов посредством взаимодействия главного комплекса гистосовместимости класса I (major histocompatibility complex class I, MHC I) злокачественных клеток с ингибирующим рецептором LILRB1 фагоцитов [147]. Авторы выявили, что при блокировке компонента MHC I  $\beta$ 2-микроглобулина усиливается фагоцитоз, опосредованный макрофагами, и увеличивается время выживания экспериментальных животных до 70%. Более того, подавление экспрессии гена, кодирующего LILRB1 в макрофагах, приводило к реполяризации от клеток, выполняющих проопухолевые функции, к формированию цитотоксической активности фагоцитов. Авторы указывают на то, что одновременное ингибирование LILRB1 и CD47 может стать перспективной терапевтической тактикой в лечении злокачественных новообразований [147].

На сегодняшний день существует два препарата моноклональных антител против CD47 - Hu5F9-G4 и CC-90002. Hu5F9-G4 продемонстрировал многообещающие результаты в доклинических и клинических испытаниях у пациентов с различными формами злокачественных новообразований [148]. CC-90002 продемонстрировал потенциальную активность на доклинических испытаниях на животных моделях злокачественных опухолей гемобластозов и в настоящее время проходит стадию клинических испытаний [149]. TTI-621 (SIRP $\alpha$ Fc) представляет собой растворимый рекомбинантный слитый белок, созданный прямым связыванием последовательностей, кодирующих N-концевой CD47-связывающий домен человеческого SIRP $\alpha$ , с Fc-доменом иммуноглобулина человека (IgG1). Взаимодействие TTI-621 с CD47 помогает преодолеть ингибирование фагоцитоза. Данный препарат показал эффективность на животных моделях многих солидных опухолей человека, а также успешно прошел первую фазу клинических испытаний для гематологических злокачественных новообразований [150, 151]. Примечательно, что TTI-621 оказался эффективным в случае монотерапии.

Взаимодействие CD40-CD40L повышает экспрессию молекул MHC, синтез и секрецию провоспалительных цитокинов макрофагами, которые активируют Т-клетки. Таким образом,



агонисты CD40 стали перспективным инструментом для терапевтической практики ЗНО и показали эффективность в клинических испытаниях для многих солидных опухолей (NCT02588443, NCT02665416, NCT02304393) [152-154].

TLR рецепторы играют ключевую роль в активации провоспалительной функции макрофагов. Их связывание с PAMP и вирусными нуклеиновыми кислотами ведет к поляризации макрофагов в M1 фенотип. Таким образом, агонисты TLRs стали перспективным механизмом для реполяризации MAO. В онкологической практике данный подход был успешно применен еще в конце XIX века Вильмом Б. Коли, создавшим вакцину на основе бактерий *Streptococcus pyogenes* группы A и *Serratia marcescens* для лечения злокачественных опухолей [155]. Стоит заметить, что эффективность данного препарата была отмечена многими специалистами той эпохи, в особенности для лечения сарком костей и мягких тканей. Позднее Вильям Б. Коли был признан «отцом иммунотерапии». Принципы Коли используются в современной иммуноонкологии. Первым препаратом схожего действия, который был одобрен управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) является BCG вакцина, которая используется для лечения неинвазивного рака мочевого пузыря [156]. В результате доклинических и клинических испытаний многие другие агонисты TLRs также показали свою эффективность [157-159].

CD24-Siglec-10 сигнальный путь также был представлен в качестве мишени для иммунотерапии онкологических заболеваний разных локализаций [160]. Было показано, что связывание CD24 на поверхности злокачественной клетки с Ig-подобным лектином 10 (Siglec-10) MAO ведет к ускользанию опухоли от иммунологического надзора. В свою очередь, блокировка данного взаимодействия посредством mAb или подавления экспрессии генов усиливает фагоцитарную активность MAO, что ведет к регрессии ЗНО.

Перепрограммирование макрофагов может осуществляться и на эпигенетическом уровне. Было показано, что ингибирование HDAC вело к изменению эпигеномного профиля моноцитов в сторону провоспалительного фенотипа [161]. Имеются данные об эффективности селективного ингибитора HDAC класса IIa (TMR195) в животной модели РМЖ [162]. Было показано, что применение TMR195 способствовало повышению числа фагоцитирующих цитотоксических макрофагов в опухолевом микроокружении. В целом, применение TMR195 вело к регрессии заболевания.

Механизмы направленной реполяризации макрофагов в контексте лечения ЗНО активно исследуются.

### 1.10 Заключение

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о критической роли макрофагов на стадии формирования и прогрессии злокачественных новообразований. Более того, данные клетки составляют преобладающую популяцию опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток. Макрофаги в опухолевом микроокружении могут существовать в двух функциональных состояниях, известных как M1 и M2. Макрофаги M1 активно участвуют в воспалительном процессе. Данные клетки обладают цитотоксической активностью, а также, привлекают другие иммунные клетки в опухолевое микроокружение и активируют их цитотоксическую активность посредством растворимых факторов. Иммуносупрессорные макрофаги (M2), напротив, продуцируют цитокины и факторы роста, которые подавляют воспаление и способствуют ремоделированию тканей в опухолевом микроокружении. Более того, M2 макрофаги снижают цитотоксическую противоопухолевую активность других иммунных клеток, а также секретируют факторы роста и цитокины, которые стимулируют пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, способствуя образованию новых кровеносных сосудов, что необходимо для опухолевой прогрессии. Считается, что в контексте опухоли M2 макрофаги являются фактором неблагоприятного прогноза, способствуя прогрессии злокачественного новообразования в то время, как M1 макрофаги способствуют элиминации опухолевых клеток и регрессии заболевания. В связи с этим было разработано большое количество препаратов, направленных на регулирование функций макрофагов в строме опухоли с иммуносупрессорных (M2) в сторону цитотоксических (M1). К сожалению, лишь немногие из препаратов такого действия продемонстрировали терапевтическую пользу. Это говорит о том, что механизмы взаимодействия M1 макрофагов и опухолевых клеток не изучены в полной мере.

M1 макрофаги играют бифазную роль в канцерогенезе. Изначально, M1 макрофаги оказывают противоопухолевое действие, однако позднее они могут стимулировать прогрессирование заболевания. По статистическим данным, более 15% злокачественных новообразований возникают на фоне хронических воспалений [163]. В состоянии хронического воспаления M1 макрофаги не получают ингибирующего сигнала достаточной силы и пребывают в активированном состоянии, при котором данные клетки продуцируют активные формы кислорода и азота [90-92]. Взаимодействия данных соединений ведет к образованию мутагена пероксонитрита, способствующего повреждению ДНК клеток и повышению мутационной активности генов, что в итоге может приводить к активации онкогенов и потере функции опухолевых супрессоров [164]. Кроме того, некоторые секретируемые M1

макрофагами цитокины могут подавлять активность опухолевых супрессоров. Так, продуцируемый макрофагами MIF подавляет активность онкосупрессора p53 [165].

В совокупности, цитотоксическая активность макрофагов может способствовать инициации и прогрессии опухоли. Разработка универсальных моделей для изучения функций макрофагов в опухолевой прогрессии позволят расширить понимание механизмов ухода опухоли от иммунологического надзора, что крайне актуально для улучшения имеющихся и разработке новых иммунотерапевтических препаратов для лечения онкологических заболеваний.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы

#### 2.1.1 Клеточные линии

В качестве экспериментальной модели для данного исследования использовались клеточные линии рака предстательной железы человека PC3 и Du145. Для получения макрофагоподобных клеток использовались клеточные линии THP-1, HL-60, K562, U937. Все клеточные линии были получены из коллекции ATCC (American Type Culture Collection) Описание клеточных линий представлено в таблице 2.

**Таблица 2** – Характеристика клеточных линий, используемых в работе

<b>Клеточная линия</b>	<b>Описание</b>	<b>Свойства роста</b>
PC3	Клетки рака предстательной железы, полученные из метастатического очага в кости	Адгезионная культура
Du145	Клетки рака предстательной железы, полученные из метастатического очага в головном мозге	Адгезионная культура
THP-1	Моноциты, выделенные из периферической крови больного острым моноцитарным лейкозом	Суспензионная культура
HL-60	Промиелобласты, выделенные из периферической крови больного острым промиелоцитарным лейкозом	Суспензионная культура
K562	Лимфобластные клетки, выделенные из костного мозга больного хроническим миелогенным лейкозом	Суспензионная культура
U937	Моноциты, полученную из плеврального выпота больного гистиоцитарной лимфомой	Суспензионная культура

Все клетки культивировались в питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 50 мкг/мл стрептомицина, 50 ед./мл пенициллина и 0,3 мг/мл L-глутамина при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.1.2 Реагенты и среды

Использованные в работе реагенты и среды указаны в таблице 3.

**Таблица 3** – Список используемых реагентов и сред

Наименование	Производитель	Страна изготовления
Питательная среда RPMI-1640	ПанЭко	Россия
Раствор Версена	ПанЭко	Россия
Эмбриональная бычья сыворотка	Capricorn scientific GmbH	Германия
Таблетки фосфатно-солевого буфера (PBS)	ПанЭко	Россия
L-глутамин	ПанЭко	Россия
Пенициллин-стрептомицин 100X	ПанЭко	Россия
Форболовый диэфир (PMA)	Sigma-Aldrich	США
Мурамиловый дипептид (MDP)	Sigma-Aldrich	США
Интерферон-гамма (IFN $\gamma$ )	Sigma-Aldrich	США
Изопропиловый спирт	Химмед	Россия
Этиловый спирт	Химмед	Россия
Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (EDTA)	Sigma-Aldrich	США
Гематоксилин-эозин	BioVitrum	Россия
Хлороформ	Химмед	Россия
Формалин 10% забуференный	BioVitrum	Россия
Тритон-X100	Sigma-Aldrich	США
Твин 20	Sigma-Aldrich	США
Реагент Brij 35	Sigma-Aldrich	США
Реагент TEMED	Sigma-Aldrich	США
Натрий хлорид	Химмед	Россия
Натрий додецилсульфат (SDS)	Химмед	Россия
Натрий гидроксид	Химмед	Россия
Натрий дезоксихолат	Химмед	Россия

Набор реактивов для проведения иммуноферментного анализа интерлейкин 1-бета (IL-1 $\beta$ ), фактора некроза опухоли (TNF)	Вектор-Бест-Европа	Россия
Набор реактивов для проведения реакции обратной транскрипции (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit)	Invitrogen	США
Маркеры молекулярного веса нуклеиновых кислот (НК): маркер 100bp, маркер 1000bp	NEB	Великобритания
Маркер молекулярного веса белков Page Ruler Plus, 10-250 kDa	ThermoFischer Scientific	США
Коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз	Sigma-Aldrich	США
Ксилол	Химмед	Россия
Краситель флуоресцентный Hoechst Stain	Sigma-Aldrich	США
Бромфенол синий	Biotech	Великобритания
Ронсеау S	Sigma-Aldrich	США
Coomassie G-250	Sigma-Aldrich	США
Кислота фосфорная	Химмед	Россия
Кислота уксусная	Химмед	Россия
Кислота соляная	Химмед	Россия
Кислота серная	Химмед	Россия
Желатин	ПанЭко	Россия
Диметилсульфоксид (ДМСО)	ПанЭко	Россия
Глицерин	Serva	Германия
Гематоксиллин	BioVitrum	Россия
Бычий сывороточный альбумин (BSA)	ПанЭко	Россия
Бромистый этидий	Sigma-Aldrich	США
Бис-акриламид	Хеликон	Россия
Акриламид	Хеликон	Россия
Агароза	Хеликон	Россия
Трис гидрохлорид, pH 8 (Tris-HCl)	Диаэм	Россия
Трис(гидроксиметил)аминометан, 99,9% (Tris-base)	Диаэм	Россия

Параформальдегид (PFA)	Sigma-Aldrich	США
Матригель	Corning	США
Обезжиренное сухое молоко	Bio-Rad Laboratories	Германия
Цитратный буфер, pH 6.0	ПраймБиоМед	Россия
Трис-ЭДТА буфер, pH 9.0	ПраймБиоМед	Россия
Перекись водорода 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Химмед	Россия
Универсальная двухкомпонентная система детекции PrimeVision	ПраймБиоМед	Россия
Витрогель	ЛидерМед Групп	Россия
SYBR Green Master Mix (5x)	Евроген	Россия
Меркаптоэтанол-2 (β) (b-MeEtOH)	Диаэм	Россия
Реагент TRIzol	Life Technologies	США
3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ)	ПанЭко	Россия

### 2.1.3 Список используемых растворов

- Буфер Laemmly для электрофореза белков (10x) pH 8,5 (0,25 М Tris-HCl, 1,92 М глицин, 1% SDS);
- Буфер RIPA для приготовления белковых лизатов (100 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.8, 10 мМ ЭДТА, 1% Triton X-100, 10% глицерин, 0.1% SDS, 0.5% деоксихолат натрия, коктейль ингибиторов протеаз);
- Буфер для нанесения белков для ПААГ электрофореза (4x) (200 мМ Tris-HCl, 400 мМ b-MeEtOH, 4% SDS, 40% глицерол, 0.05% бромфенол синий);
- Буфер для ренатурации (2,5% Triton X-100 в воде);
- Буфер для нанесения белков для зимографии (2x) (0,125 М Tris-HCL, 20% глицерин, 4% SDS, 0,05% бромфеноловый синий);
- Буфер для желатиназной реакции 10x (1,2% Tris-base, 6,3% Tris-HCl, 11,7% NaCl, 0,74% CaCl<sub>2</sub>, 0,2 % Brij 35);
- Коллоидный кумасси G-250 (8% сульфат аммония, 1,6% фосфорная кислота, 0,08% Coomassie G-250, 20% этиловый спирт);
- Буфер TAE (50x) pH 7,6 (2 М Tris-base, 0,05 М ЭДТА, 1,56 М уксусная кислота);
- Буфер для переноса белков на PVDF (поливинилиденфторид) мембрану (10x) (3,1% Tris-base, 14,4% глицин, 20% этилового спирта);

- Раствор красителя Понсо S для блоттинга (Ponceau S solution): 0,1% Понсо S, 5% уксусной кислоты в воде);
- Блокирующий раствор 5% обезжиренное молоко или 5% BSA, 0,1% TWEEN в 1X PBS
- 3,7% раствор параформальдагида (PFA) pH 7 (3,7% PFA, 5% 20X PBS, в воде);
- PBS-T (на 1000 мл: 10 таблеток фосфатно-солевого буфера, 2,5 мл 20% Tween-20);
- Буфер для нанесения ДНК в агарозный гель (6x) (0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксилолцианола, 30% глицерина).

## **2.2 Клеточная модель для получения опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов**

Для изучения взаимодействия цитотоксических макрофагов и опухолевых клеток была разработана клеточная модель. В рамках данного исследования было изучено два принципиально разных механизма цитотоксической активности макрофагов: контакт-зависимый и независимый от прямого взаимодействия с таргетной клеткой. С этой целью в первом случае опухолевые клетки сокультивировали с макрофагоподобными клетками напрямую в смешанной культуре. Для осуществления контакт-независимого механизма использовались культуральные вставки с полупроницаемой мембраной с размером пор 3 мкм (SPL).

Макрофаги получали методом дифференцировки клеток миелоидного происхождения (THP-1, HL-60) при помощи PMA,  $IFN\gamma$  (в первые сутки) и MDP (на вторые сутки дифференцировки). На следующий день добавляли опухолевые клетки (PC3 или Du145) в соотношении 1:10 к числу макрофагов соответственно. Оптимальное количество клеток для сокультивирования было подобрано на основании собственных экспериментальных данных и составило  $4 \times 10^5$  для миелоидных клеток и  $4 \times 10^4$  для клеток опухоли предстательной железы. Культивирование производили в 6-луночных планшетах в объеме среды 3 мл. По окончании дифференцировки (на третьи сутки) перед добавлением опухолевых клеток макрофаги отмывали от PMA,  $IFN\gamma$  и MDP. Для этого производили отбор всей культуральной среды, затем добавляли 3 мл чистой среды для культивирования, инкубировали 5 минут в  $CO_2$ -инкубаторе и вновь отбирали среду. Далее добавляли опухолевые клетки в суммарном объеме чистой среды для культивирования 3 мл.

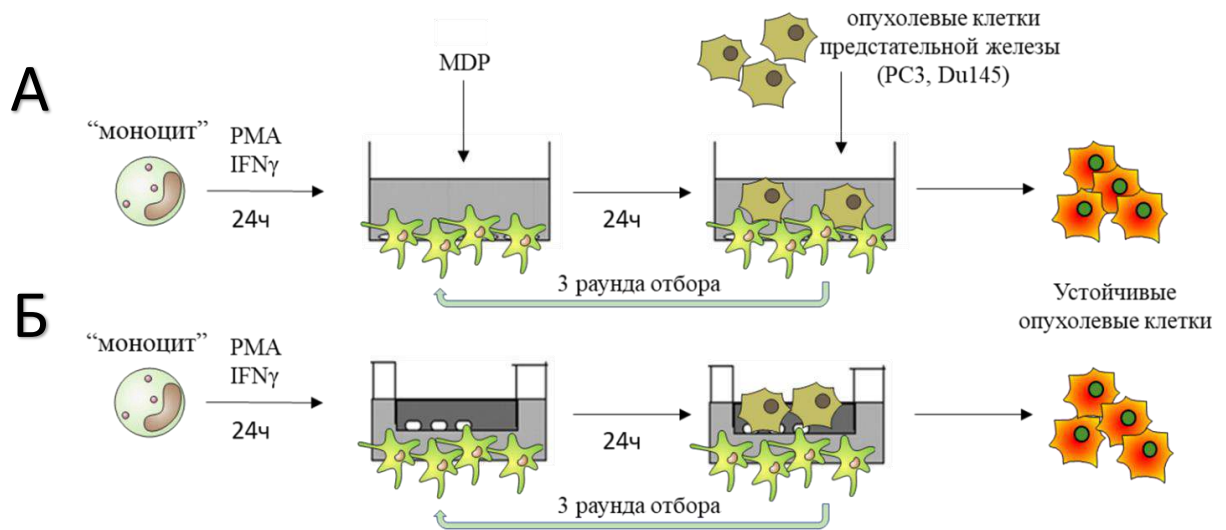
В случае исследования контакт-независимого механизма отбора макрофаги культивировались во вставке, в то время как опухолевые клетки добавляли в лунки.



Один опыт составляет 3 раунда сокультивирования: после первого раунда опухолевые клетки снова сокультивируются с вновь полученными макрофагами. Затем опухолевые клетки проходят еще один цикл сокультивирования с цитотоксическими макрофагами. Один раунд сокультивирования состоит из 5 суток культивирования в смешанной культуре (в случае контакт-зависимого метода исследования) или с присутствием культуральной вставки с активированными макрофагами (в случае контакт-независимого метода исследования) и 2 суток отдыха (культивирования опухолевых клеток без присутствия макрофагов).

Необходимость проведения именно трех раундов сокультивирования для развития устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов была выявлена экспериментальным способом. А именно, результаты оценки устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов (п. 2.2.3) после двух раундов сокультивирования контакт-зависимым методом не показали значимых отличий, в то время как после трех раундов сокультивирования формировалась устойчивость опухолевых клеток.

Схема эксперимента представлена на рисунке 1. Эксперимент проводили в 6-луночном культуральном планшете.



А. при контакт-зависимом механизме действия макрофагов, Б. при контакт-независимом механизме действия макрофагов

**Рисунок 1** – Схема селекции устойчивых опухолевых клеток

### 2.2.1 Подбор рабочих концентраций факторов дифференцировки миелоидных клеток линии ТНР-1, HL-60, U937 и K562

Подбор рабочих концентраций PMA, IFN $\gamma$ , MDP проводился на основании литературных и экспериментальных данных. Был выбран диапазон концентраций PMA от 20 до 200 нМ, IFN $\gamma$ ,

MDP от 0,01 до 0,1 мкг/мл. Далее производили титрование рабочих концентраций с дальнейшим наблюдением фенотипических изменений и жизнеспособности миелоидных клеток. Анализ проводился на основании количества дифференцированных клеток – не менее 80% и отсутствия жизнеспособных клеток через 7 суток.

### **2.2.2 Оценка уровня продукции провоспалительных цитокинов макрофагов в модели**

Оценку продукции провоспалительных цитокинов дифференцированными миелоидными клетками линии ТНР-1, HL-60, U937 и K562 оценивали методом иммуноферментного (ИФА) анализа с применением наборов Вектор-Бест (Россия) в соответствии с инструкцией производителя (Таблица 3). Оценивался уровень продукции фактора некроза опухоли (TNF) и интерлейкина-1-бета (IL-1 $\beta$ ).

### **2.2.3 Оценка устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов**

Устойчивость полученных в результате трехкратного сокультивирования с макрофагами в условиях как контакт-зависимого, так и контакт-независимого метода субкультур опухолевых клеток (PC3, Du145) к цитотоксической активности определяли путем оценки их жизнеспособности в данных условиях относительно контрольных линий опухолевых клеток, не прошедших отбор. Для этого полученные субкультуры и контрольные опухолевые клетки сокультивировали с цитотоксическими макрофагами 1 раз (как описано в п. 2.2). Спустя 7 суток от начала сокультивирования количество жизнеспособных опухолевых клеток оценивали методом прямого подсчета при помощи камеры Горяева (МиниМед) согласно инструкциям производителя.

## **2.3 Функциональный анализ устойчивых субкультур опухолевых клеток *in vitro***

### **2.3.1 Анализ пролиферативной активности**

Сравнительный анализ проводили для контрольных опухолевых клеток (PC3, Du145), не подвергавшихся сокультивированию с макрофагами и их субкультурами, полученными в результате трехкратного сокультивирования с макрофагами в условиях как контакт-зависимого, так и контакт-независимого метода. Для анализа динамики роста на 6-луночные культуральные

планшеты помещали по  $4 \times 10^4$  клеток каждой исследуемой сублинии опухолевых клеток в 2-х повторах (по 2 лунки одной клеточной линии на каждую временную точку подсчета). Клетки культивировались в стандартных условиях. Анализ проводился ежедневно на протяжении трех дней методом прямого подсчета числа клеток при помощи камеры Горяева.

### **2.3.2 Тест на образование колоний в условиях разреженной популяции**

Для исследования способности опухолевых клеток образовывать колонии в условиях сильно разреженной популяции-исследуемые клеточные линии рассаживали до количества 200 клеток на одну 60 мм культуральную чашку (SPL). Эксперимент проводился в двух повторах для каждой исследуемой клеточной линии. Клетки культивировались в стандартных условиях на протяжении 7 дней. Далее чашки промывали раствором PBS от остатков культуральной среды, фиксировали 96% метиловым спиртом и окрашивали водным раствором кристаллического фиолетового. Количество и размер колоний оценивали при помощи программы ImageJ. Сравнительный анализ проводили для контрольных опухолевых клеток (PC3, Du145), не подвергавшихся сокультивированию с макрофагами и их сублиниями, полученными в результате трехкратного сокультивирования с макрофагами в условиях как контакт-зависимого, так и контакт-независимого метода.

### **2.3.3 Тест на миграционную способность по градиенту ростовых факторов**

В качестве источника ростовых факторов использовалась эмбриональная бычья сыворотка. Для проведения анализа  $5 \times 10^4$  клеток ресуспендировали в среде без сыворотки и помещали в камеру Бойдена с размером пор 8 мкм (Millipore, США). Внешняя камера заполнялась средой RPMI с 10% содержанием сыворотки. Анализ результата проводили спустя 24 часа. Оставшиеся на внутренней поверхности камеры клетки удаляли. Мембраны промывали PBS для удаления остатков культуральной среды. Затем мембраны инкубировали в 3,7% PFA 15 минут для фиксации мигрировавших клеток. Далее клетки окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst (25 мкг/мл) и фотографировали 5 независимых полей зрения каждой мембраны с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX-51 (увеличение 100x). Сравнительный анализ проводили для контрольных опухолевых клеток (PC3, Du145), не подвергавшихся сокультивированию с макрофагами и их сублиниями, полученными в результате трехкратного сокультивирования с макрофагами в условиях как контакт-зависимого, так и контакт-независимого метода.

### **2.3.4 Анализ чувствительности опухолевых клеток к действию цитостатиков**

Для проведения анализа в первый день исследуемые опухолевые клетки РС3, Du145 и их устойчивые сублинии, полученные в результате контакт-зависимого метода сокультивирования с макрофагами, рассаживали в 96-луночные культуральные плашки в количестве  $3 \times 10^3$  клеток на лунку в среду для культивирования. На следующие сутки среду для культивирования заменяли на новую с добавлением паклитаксела (Синдаксел®, Actavis Italy S.p.A., Италия) в концентрациях 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 25 нМ, 50 нМ. По истечении 72 часов инкубации с цитостатиком производили оценку жизнеспособности опухолевых клеток при помощи МТТ-теста. Для этого культуральную среду отбирали и добавляли 200 мкл в каждую лунку МТТ 5 мг/мл в культуральной среде и инкубировали 2 ч при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе до образования формазана (фиолетовые кристаллы). Затем культуральную среду аккуратно отбирали, не задевая кристаллы и растворяли их в 200 мкл ДМСО и инкубировали при комнатной температуре 5 минут на шейкере при 600 об/мин. Оптическую плотность измеряли при помощи автоматического анализатора автоматическим анализатором Awareness Technology ChemWell 2910 (Combi) при длине волны 600 нм.

### **2.4 Анализ ферментативной активности желатиназ**

Для анализа активности белков в кондиционной среде на 6-ти луночные планшеты рассаживали  $5 \times 10^5$  опухолевых клеток линии РС3 и Du145 и их сублиний, полученных в результате трех раундов отбора в условиях контакт-зависимого и контакт-независимого сокультивирования с цитотоксическими макрофагами. На следующий день меняли среду на бессывороточную, через 24 часа собирали кондиционированную среду и центрифугировали ее 5 мин при 1000×g. Для нанесения на SDS-ПААГ электрофорез среды разбавляли буфером для нанесения белков для зимографии в соотношении 4:1 соответственно. Нормализацию проводили по количеству клеток.

SDS-ПААГ электрофорез в 8% полиакриламидном геле с содержанием 0,2% желатина проводился в буфере для электрофореза белков при 6 В/см геля. После проведения электрофореза гель инкубировали при аккуратном помешивании при комнатной температуре в буфере для ренатурации 30 мин, затем в тех же условиях в буфере для прохождения желатиназной реакции 30 мин. После этого гель помещали в свежий буфер для прохождения желатиназной реакции на 12 часов при аккуратном покачивании при +37°C. Затем гель

окрашивали в течение 6 часов в растворе коллоидного Кумасси G-250. Избыток краски отмывали дистиллированной водой и фотографировали при помощи цифровой фотокамеры.

## 2.5 Приготовление белковых лизатов клеток

Лизаты опухолевых клеток линии PC3 и Du145 и их сублиний, полученных в результате трех раундов отбора в условиях контакт-зависимого и контакт-независимого сокультивирования с цитотоксическими макрофагами, получали из 60–70 % конфлюэнтности клеток, растущих на культуральной чашке диаметром 100 мм. Клетки промывали 2 раза PBS, затем лизировали в 100-200 мкл буфера для лизиса клеток (RIPA), содержащем смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз. Лизис проводили в течение 30 мин при температуре +4 °С, затем лизаты центрифугировали 15 мин при 15000xg. Супернатант малыми объемами хранили при -70 °С. Концентрацию белков в надосадочной жидкости определяли методом Бредфорда (Bio-Rad Laboratories GmbH, Germany) согласно рекомендациям производителя.

## 2.6 Вестерн-блот анализ

Для проведения исследования использовали 30 мкл белкового лизата клеток, полученного как описано в п. 2.5. Перед нанесением на гель в каждую пробу добавляли 4x буфер для нанесения белков для ПААГ электрофореза, кипятили 5 мин и охлаждали во льду. Образцы разделяли в 8%-15%-SDS-полиакриламидном геле в буфере для электрофореза белков. Затем белки переносили на PVDF мембрану (Millipore) в буфере для переноса при 100 В и 250 мА в течение 1 часа (прибор Mini Trans-Blot, Bio-Rad Laboratories GmbH). Качество переноса проверяли окраской мембраны красителем Ponceau S.

Мембрану инкубировали в блокирующем растворе (пункт 2.1.3) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали в течение ночи с соответствующими первичными антителами при +4 °С (Таблица 4).  $\beta$ -актин использовался в качестве белка домашнего хозяйства. На следующий день мембрану трижды отмывали PBS-T по 5 мин при комнатной температуре. Далее мембрану инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными пероксидазой хрена, в течение часа при комнатной температуре. После отмывки PBS-T, мембрану проявляли с помощью реагента для хемилюминесцентной реакции ECL (Millipore). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на приборе ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) с программным обеспечением Image Lab (Bio-Rad).

Список использованных первичных антител представлен в таблице 4.

**Таблица 4** – Список используемых антител для вестерн-блот анализа

Наименование	Кат. номер	Производитель, страна
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)	4696	Cell Signaling technology, США
phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E)	4370	Cell Signaling technology, США
p38 MAPK (D13E1)	8690	Cell Signaling technology, США
phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	9216	Cell Signaling technology, США
PD-L1 (E1L3N)	13684	Cell Signaling technology, США
Akt (pan) (C67E7)	4691	Cell Signaling technology, США
Phospho-Akt (Ser473)	9271	Cell Signaling technology, США
Anti- $\beta$ -Actin	A5441	Sigma-Aldrich, США
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	111-035-045	JacksonImmunoResearch, США
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	115-035-062	JacksonImmunoResearch, США

## 2.7 Оценка роста опухолей *in vivo*

В работе использовались самки иммунодефицитных мышей Balb/c nude (коллекция питомника «Пушино») в возрасте 6–8 недель. Размер экспериментальных групп составлял 5 особей. Каждому животному подкожно прививалось по  $5 \times 10^6$  клеток контрольных (PC3 или Du145) или устойчивых сублиний, полученных в результате контакт-зависимого метода сокультивирования с макрофагами, дифференцированными при помощи PMA, IFN $\gamma$  и MDP (PC3 MDP или Du145 MDP), суспендированных в 100 мкл физиологического раствора. Продолжительность эксперимента составляла 3 недели. Размер опухоли оценивался по истечении эксперимента после ее извлечения из животного. Для оценки метастатического потенциала исследуемых клеток из экспериментальных животных также были извлечены легкие, печень и регионарные лимфоузлы. Полученный материал, а также образовавшиеся опухоли использовали для иммуногистохимического анализа. Эксперименты повторяли 3 раза.

## 2.8 Гистология и иммуногистохимия

### 2.8.1 Приготовление срезов

Гистологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследования проводились на операционном материале, фиксированном в течение 24 часов 10% нейтральным формалином в

PBS. После гистологической проводки материал заливали в парафиновые блоки. Затем готовились срезы толщиной 4 мкм, которые монтировались на высокоадгезивные стекла (SuperFrost Plus, ApexLab, Россия). Для фиксации материала на стекле производилось высушивание в течение 15 минут при 70°C.

### **2.8.2 Гистологическое окрашивание**

Перед окрашиванием срезов производилась депарафинизация. С этой целью срезы инкубировались при 60°C 30 минут, а затем обрабатывались в двух сменах ксилола в течение 10 минут в каждой. Далее срезы проводили через серию изопропиловых спиртов с объемной долей изопропанола 100% (I), 100% (II), 70%, 50% по 5 минут в каждом. На последнем этапе срезы промывали в дистиллированной воде. Затем проводили окрашивание-гематоксилин-эозином.

### **2.8.3 Иммуногистохимическое окрашивание**

Перед процессом иммуногистохимического окрашивания производили депарафинизацию срезов, как описано в п. 2.8.2, после чего проводили температурную демаскировку (10 минут при 110°C в трис-ЭДТА, рН 9,0 или цитратном буфере, рН 6,0). Блокировку эндогенной пероксидазы проводили в 3% перекиси водорода 7 минут. Далее срезы инкубировали с первичными антителами в течение 30 минут. Детекцию проводили при помощи универсальной двухкомпонентной системы детекции PrimeVision по инструкции производителя. Затем срезы окрашивали гематоксилином для визуализации ядер. Затем производили дегидратацию путем обработки срезов в серии изопропиловых спиртов с повышением концентрации: 50%, 70%, 100% (II), 100% (I) (по объему) и двух сменах ксилола на последнем этапе. Инкубация срезов в изопропиловых спиртах составляла 2 минуты в каждом, в ксилоле – 3 минуты. Далее срезы заключали под покровное стекло при помощи витрогеля и оставляли на 12 часов для застывания среды для заключения.

Оценку окрашивания проводили при помощи микроскопа OLYMPUS BX53 при 400x увеличении и программного обеспечения IFNINITY ANALYZE (версия 6.2.0.) путем прямого подсчета окрашенных клеток в пяти независимых полях зрения.

Список первичных антител и их разведения, используемые в анализе, указаны в таблице 5.

**Таблица 5** - Список использованных первичных антител для ИГХ

<b>Наименование</b>	<b>Производитель, страна</b>	<b>Разведение</b>
Анти - CD204, поликлональные	Sigma-Aldrich, США	1:2500
Анти - IDO1, клон D5J4E	Cell Signaling, Denvers, США	1:1000
Анти - CD206, поликлональные	Sigma-Aldrich, США	1:2000
Анти - CD68, клон GR021	Genemed, США	1:100
Анти - PD-L1, клон 1A4	ПраймБиоМед, Россия	1:100
Анти - CD163, клон 10D6	BIOCARE, США	1:500
Анти – iNOS, клон SP126	Sigma-Aldrich, США	1:150
Анти - CD8, клон C8/144B	Dako, Англия	1:4
Анти - CD3, поликлональные	Genemed, США	1:200
Анти - FOXP3, клон D2W8E	Cell Signaling, США	1:600
Анти - CD20, клон PBM-4G6	ПраймБиоМед, Россия	1:100
Анти - CD66b, поликлональные	Sigma-Aldrich, США	1:1000
Анти - PU.1, клон PBM-4G6	ПраймБиоМед, Россия	1:200
Анти - HLA-DR, клон TAL.1B5	Dako, Англия	1:250
Анти – p63, клон 3A10	ПраймБиоМед, Россия	1:200
Анти - AMACR, клон G8	ПраймБиоМед, Россия	1:100
Анти - Ki-67, клон GM010	ПраймБиоМед, Россия	1:150
Анти-TNF, клон M1-C4	Sigma-Aldrich, США	1:300

## 2.9 Иммуноцитохимия

### 2.9.1 Подготовка клеточной культуры

В 12-луночный культуральный планшет для адгезионных клеток помещали по 1 стеклу (Микромед) в каждую лунку и добавляли клетки линии PC3 и Du145 и их устойчивых сублиний, полученных в результате контакт-зависимого метода сокультивирования с макрофагами, в таком количестве, чтобы через 24 часа в каждой лунке было не менее  $2 \times 10^4$  клеток. На следующие сутки проводили процедуру иммуноцитохимии (ИЦХ). Клетки культивировались в стандартных условиях.



## 2.9.2 Процедура исследования

Все процедуры выполняли при комнатной температуре. Для этого из каждой лунки аккуратно отбирали культуральную среду, а затем промывали раствором PBS (37°C). Далее в каждую лунку добавляли 500 мкл теплого раствора PFA (37°C) на 15 минут при комнатной температуре для фиксации клеток. Далее после трехкратной промывки PBS осуществляли пермеабиллизацию клеток путем добавления 500 мкл 0,1 % раствора Triton X-100 в PBS на 3 минуты. По прошествии времени инкубации препараты трижды промывали PBS и проводили ИЦХ окрашивание. Далее стекла инкубировали с первичными антителами в течение 30 минут. Детекцию проводили при помощи универсальной двухкомпонентной системы детекции PrimeVision по инструкции производителя. По прошествии окрашивания препараты заключали в эльванол и оставляли на 12 часов для застывания среды для заключения. Оценку окрашивания проводили при помощи микроскопа OLYMPUS BX53 (Япония) при 400x увеличении и программного обеспечения IFNINITY ANALYZE версия 6.2.0. (Lumenera, США).

Список первичных антител и их разведения, используемые в анализе, указаны в таблице 6.

**Таблица 6** - Список использованных первичных антител для ИЦХ

Наименование	Производитель, страна	Разведение
Анти – E-Кадгерин (ECAD), клон PBM-2E1	ПраймБиоМед, Россия	1:100
Анти – Smooth Muscle Actin (SMA), клон 1A4	Genemed, США	1:400
Анти – Beta-Catenin, клон 14	ImmunoLogic, Голландия	1:200
Анти – Vimentin, клон VM52	ScyTek, США	1:200

## 2.9 Выделение тотальной РНК

Тотальную клеточную РНК выделяли при помощи набора для выделения РНК RNeasy kit с использованием реагента TRIzol. Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer® (IMPLEN, Германия). О чистоте образца судили по соотношению значений оптической плотности раствора при длине волны 260 и 280 нм. После выделения РНК для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции. Нуклеиновые кислоты выделяли из опухолевых клеток линии PC3 и Du145 и их устойчивых сублиний, полученных в результате контакт-зависимого метода сокультивирования с макрофагами.

## 2.10 Обратная транскрипция

На первом этапе РНК обрабатывали ДНКазой I согласно протоколу производителя (1 ед. на 1 мкг РНК) (Invitrogen). Затем 1 мкг РНК смешивали с 0,4 мкг случайных гексамерных олигонуклеотидов и денатурировали при 4°C с последующим охлаждением на льду. Состав смеси для обратной транскрипции включал: 2 ед. обратной транскриптазы MMLV, соответствующий буфер, 2 мМ дитиотрейтола, 0,5 ед. ингибитора рибонуклеаз, 0,5 мМ дНТФ, дистиллированную воду до 20 мкл. Реакцию обратной транскрипции проводили при 37°C в течение 1 ч, после чего реакцию останавливали путем инактивации обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 мин. Для получения рабочего раствора кДНК реакционную смесь доводили дистиллированной водой до 100 мкл.

## 2.11 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Полимеразную цепную реакцию проводили в следующем режиме:

- ПЦР программа: 95°C - 5 мин, (95°C - 15 сек, 57-65°C - 30 сек, 72°C - 40 сек) - 40 циклов, 72°C - 8 мин. Температура плавления продукта детектировалась в диапазоне 65°C-95°C с шагом 0,5°C.
- Состав ПЦР-смеси: 1 мкл рабочего раствора кДНК, по 5 пМ прямого и обратного праймеров, 4 мкл SYBR Green Master Mix (5x), дистиллированная вода до 20 мкл.

Анализ проводили с использованием ПЦР-анализатора Bio-Rad CFX (США) и программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.1. (Bio-Rad, США). Относительное изменение экспрессии исследуемых мРНК вычисляли методом  $\Delta\Delta C_t$ , где  $\Delta\Delta C_t$  определяли путем вычитания среднего  $\Delta C_t$  контроля из  $\Delta C_t$  экспериментальных образцов [166]. В качестве контроля использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Праймеры для амплификации кДНК были подобраны по литературным данным или сконструированы с помощью базы данных Primer-Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) и пакета программ Oligo 6 (США). Последовательности праймеров указаны в таблице 7. Для каждого анализируемого гена ПЦР-анализ был проведен в трех повторах.

**Таблица 7** - Последовательность используемых праймеров

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	T(отжига), °C
GAPDH	TCCGAGTCAACGGATTTGGT	TCCCGTTCTCAGCSTTGACG	60

GBP4	GGTGGCCATTGTAGGGCTAT	TTAGAGAGGTGGGGCACACA	60
OLMALINC	CCTGTTGTCCGCTCACTCC	AGGCCTGACACTCCTATCCG	60
CDH11	CAGCAGAAATCCACAATCGG	GATCACTCTCACAGATGAAAC C	57
FLOT-1	AAGACTAAGCAGCAGATTGAG	GCATAATTAGTTGGGACTTCT CTG	57
HPGD	TGAGTAAGCAAAATGGAGGTG AAG	GCTGTGCAACGGGCATG	60
IGFBP3	GTGTCTGATCCCAAGTTCCA	GCAGGGACCATATTCTGTCTC	58
SPINK5	AGAGAACGATCCTATCCAGG	CACTACACAACCTCCTCAAAGG	56
PALMD	TCAGGCTTGAGAAAGAGATCC	GTCCTCAATTGACTCTTCTGC T	58
FMNL3	GAACATCAGTACGGATTCAAC CT	CCAGAAGCTCTAAGACAAGG G	58
LINC02301	TCTGGGCAGAAGGATCTACG	AGCATCTAGGCCATGTGACC	60
LCAL1	TCCAGCTACCTGCCACTTGC	TGCCAACTGCTTGTTACCTG	60
SNHG18	CCTAATGCTAAACATTGGTACA	GCAACACAGCATCACCTGTAC	60
ALDH3A1	TGTTCTCCAGCAACGACAAG	CTGACCTTCAGGCCTTCATC	57
PTN	AGAACTGGAAGTCTGAAGCGA	TAGATTCTGCTTGAGGTTTGG G	58
ZEB1	TTCACAGTGGAGAGAAGCCA	GCCTGGTGATGCTGAAAGAG	58
TERT	ATGCGACAGTTCGTGGCTCA	ATCCCCTGGCACTGGACGTA	62

## 2.12 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез проводили в 2%-ном агарозном геле с содержанием 0,5 мкг/мл бромистого этидия при напряжении 60 В в буфере ТАЕ (1х). Перед нанесением на гель к образцу добавляли буфер для нанесения ДНК в агарозный гель. ДНК в геле регистрировали по флюоресценции в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны от 240 до 360 нм. Для анализа размера ДНК использовались маркеры молекулярного веса (см. Таблицу 3).

## 2.13 Секвенирование транскриптома

### 2.13.1 Приготовление библиотек кДНК

Приготовление кДНК библиотек проведено в соответствии с протоколами Illumina (США) для РНК секвенирования (RNA-seq). Для каждого образца было получено ~30 млн

прочтений (ридов) длиной 57 нуклеотидов. Исследование проводили на клетках линии PC3 и их устойчивой сублинии, полученной в результате контакт-зависимого метода сокультивирования с макрофагами, дифференцированными при помощи PMA, IFN $\gamma$  и MDP (PC3 MDP).

### 2.13.2 Анализ данных секвенирования

Риды фильтровали на предмет наличия последовательностей адаптеров с использованием скрипта `bbduk`, входящего в пакет `BBTools` (<http://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Фильтрованные риды очищали от последовательностей, принадлежащих рибосомальной РНК, с помощью программы `SortMeRNA` [167]. Риды картировали на эталонный геном человека *GRCh38.p12* с помощью программы `Hisat2` (v2.2.1) [168]. Полученные выравнивания преобразовывали в формат BAM с помощью программы `samtools` [169]. Для оценки количества картированных прочтений (ридов) и анализа дифференциальной экспрессии использовали два программных пакета: `Rsubread` и `DESeq` [170, 171]. Функциональная аннотация генов проводилась с использованием пакета R `Homo.sapiens` (Team BC, 2015) и базы данных `Ensembl` (<http://www.ensembl.org/index.html>). Анализ насыщенности метаболических путей проводили для достоверно дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с использованием пакета R `fgsea` [172]. Функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов была проведена с использованием базы данных кластеров ортологичных групп генов (COG) (<http://gerontology-explorer.narod.ru>).

### 2.14 Статистическая обработка результатов

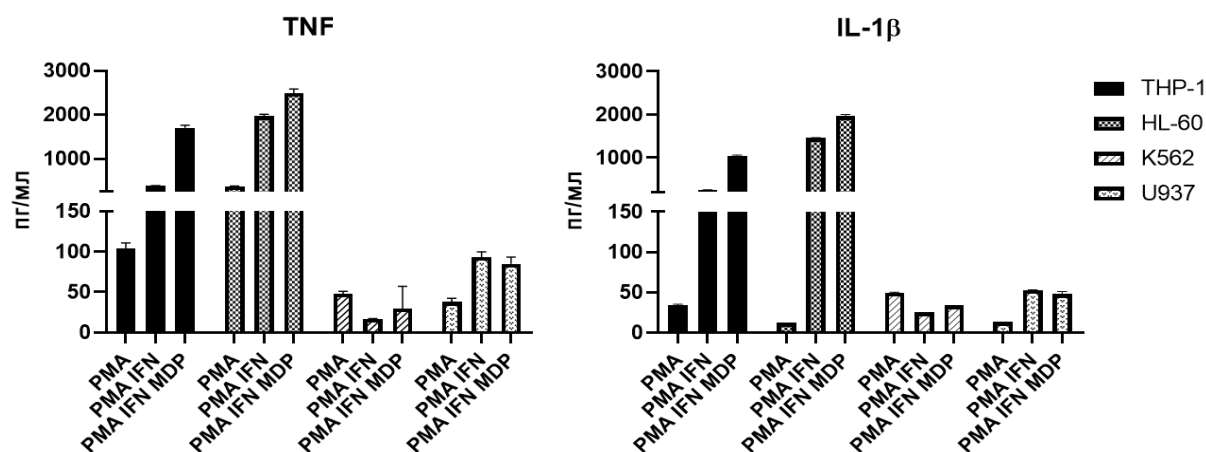
Все эксперименты независимо проводились не менее трех раз. Для статистического анализа полученных данных использовалась программа `GraphPad Prism 8` (GraphPad Software Inc, США). При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, коэффициент ранговой корреляции Спирмена. В случае нормального распределения и примерно равных дисперсий для сравнения двух выборок использовался критерий Стьюдента; для трех и более выборок использовался одномерный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим использованием критерия Даннета для сравнения с контрольной выборкой. Для сравнения долей применяли точный критерий Фишера. Столбчатые диаграммы отражают средние значения, а планки погрешностей на них – стандартные отклонения (SD). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 Оценка цитотоксической активности макрофагоподобных клеток, полученных в результате дифференцировки THP-1, HL-60, K562 и U937

Для оценки цитотоксической активности макрофагоподобных клеток были использованы клетки THP-1, HL-60, K562 и U937. Данные клетки миелоидного происхождения стимулировали PMA, PMA + интерферон гамма (IFN $\gamma$ ) или PMA + интерферон гамма + MDP для получения M1 макрофагов. Рабочие концентрации факторов дифференцировки составляли 0,1 мкг/мл для IFN $\gamma$  и MDP, 67 мкМ для PMA. Оптимальное количество миелоидных клеток составило  $4 \times 10^5$  клеток на лунку 6-луночного культурального планшета.

При помощи иммуноферментного анализа было определено количество продуцируемых провоспалительных цитокинов в культуральной среде на 3 сутки от начала дифференцировки (Рисунок 2).



**Рисунок 2** - Количество продуцируемых макрофагами провоспалительных цитокинов в условиях дифференцировки клеток линии THP-1, HL-60, K562 и U937 при помощи PMA, IFN $\gamma$ , MDP

Результаты проведенного исследования показали, что макрофагоподобные клетки, полученные из миелоидных клеток линий THP-1 и HL-60, продуцируют наибольшее количество исследуемых цитокинов. Следует отметить, что только в случае THP-1 наблюдалась 100% дифференцировка клеток с приобретением адгезионной способности, в то время как в случае K562, HL-60 и U937 в культуре наблюдались жизнеспособные суспензионные клетки спустя 24 часа после добавления факторов дифференцировки.

На основании полученных данных для дальнейших исследований были выбраны клеточные линии ТНР-1 и HL-60.

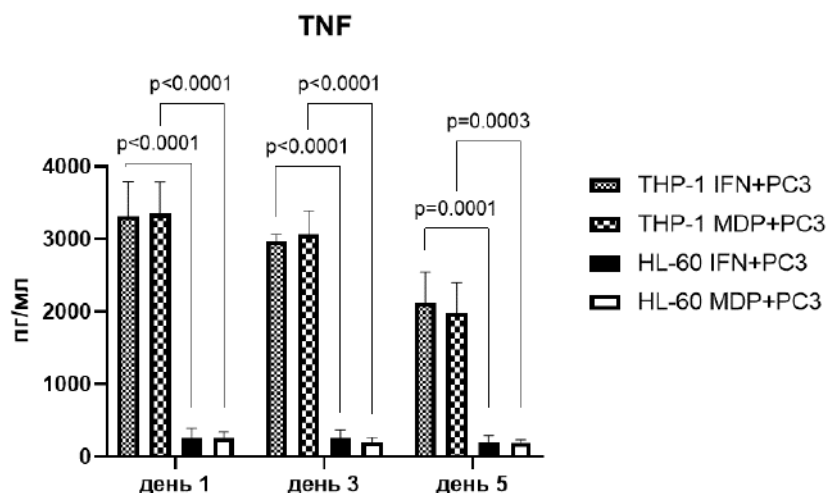
### **3.2 Оценка цитотоксической активности макрофагоподобных клеток, полученных в результате дифференцировки ТНР-1 и HL-60, в модели**

Далее мы оценили цитотоксическую активность макрофагоподобных клеток, полученных из линий ТНР-1 и HL-60, в условиях сокультивирования с опухолевыми клетками предстательной железы линии РС3. С этой целью проводился иммуноферментный анализ количества TNF в культуральной среде на первые, третьи и пятые сутки сокультивирования макрофагоподобных клеток с опухолевыми. Образцы, взятые для анализа, описаны в таблице 8.

**Таблица 8** - Образцы, используемые для ИФА на TNF

Проба (рабочее название)	Описание
HL-60 IFN $\gamma$ +PC3	Среда после сокультивирования PC3 с HL-60, стимулированными IFN $\gamma$ , PMA.
HL-60 MDP+PC3	Среда после сокультивирования PC3 с HL-60, стимулированными IFN $\gamma$ , PMA, MDP.
ТНР-1 IFN $\gamma$ +PC3	Среда после сокультивирования PC3 с ТНР-1, стимулированными IFN $\gamma$ , PMA.
ТНР-1 MDP+PC3	Среда после сокультивирования PC3 с ТНР-1, стимулированными IFN $\gamma$ , PMA, MDP.

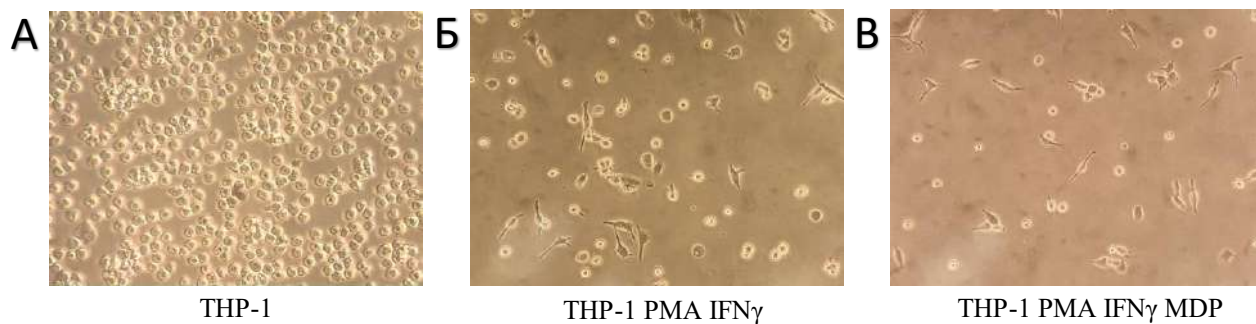
На рисунке 3 показаны концентрации TNF в культуральной среде на 1-е, 3-е и 5-е сутки сокультивирования макрофагоподобных и опухолевых клеток.



**Рисунок 3** – Оценка концентрации TNF методом ИФА в культуральной среде на 1-е, 3-е и 5-е сутки сокультивирования макрофагоподобных и опухолевых клеток

Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрация TNF в культуральной среде во время сокультивирования намного выше в случае использования макрофагоподобных клеток, полученных путем дифференцировки клеток THP-1, в сравнении с HL-60.

На основании полученных данных для дальнейшей работы была выбрана клеточная линия THP-1. На рисунке 4 представлены микрофотографии исходных и дифференцированных клеток THP-1.



А - нативной, Б - дифференцированной при помощи PMA и IFN $\gamma$  и В - дифференцированной при помощи PMA, IFN $\gamma$  и MDP. Увеличение – 100X

**Рисунок 4** - Микрофотография клеток моноцитарной линии THP-1

### 3.3 Получение опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов

В результате отбора опухолевых клеток путем сокультивирования с цитотоксическими макрофагами по протоколу, описанному в п. 2.2, получены следующие сублинии (Таблица 9).

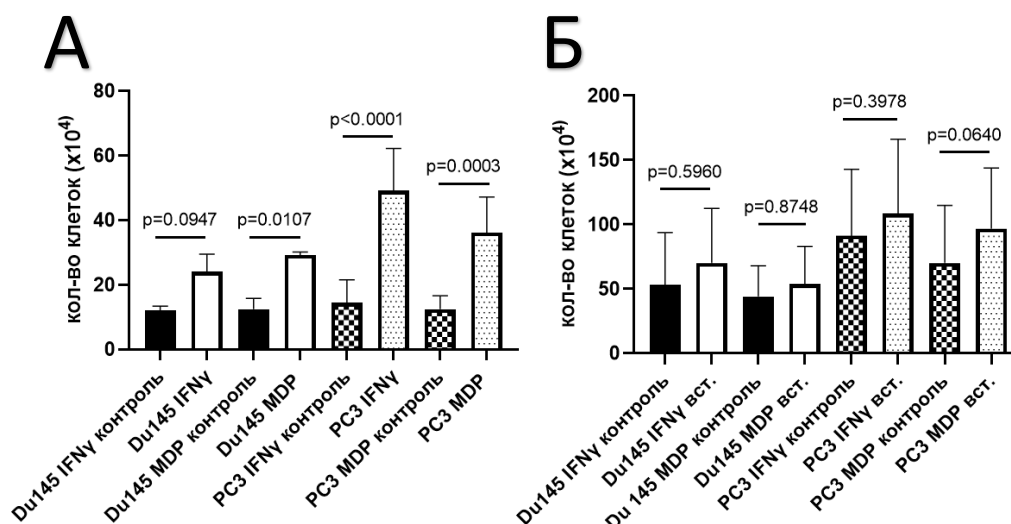
**Таблица 9** – Сублинии опухолевых клеток, полученные в результате отбора под действием цитотоксической активности макрофагов

Клеточная линия (рабочее название)	Описание
PC3 IFN $\gamma$ Du145 IFN $\gamma$	Клеточная линия, полученная в результате сокультивирования в смешанной культуре клеток PC3 или Du145 с макрофагами, полученными в результате дифференцировки клеток линии THP-1 PMA + IFN $\gamma$
PC3 MDP Du145 MDP	Клеточная линия, полученная в результате сокультивирования в смешанной культуре клеток PC3 или Du145 с макрофагами, полученными в результате дифференцировки клеток линии THP-1 PMA + IFN $\gamma$ + MDP
PC3 IFN $\gamma$ вст. Du145 IFN $\gamma$ вст.	Клеточная линия, полученная в результате сокультивирования с применением культуральных вставок клеток PC3 или Du145 с макрофагами, полученными в результате дифференцировки клеток линии THP-1 PMA + IFN $\gamma$
PC3 MDP вст. Du145 MDP вст.	Клеточная линия, полученная в результате сокультивирования с применением культуральных вставок клеток PC3 или Du145 с макрофагами, полученными в результате дифференцировки клеток линии THP-1 PMA + IFN $\gamma$ + MDP

### **3.4 Сравнение устойчивости исходных и сублиний опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов**

В результате сокультивирования опухолевых клеток рака предстательной железы (PC3, Du145) с цитотоксическими макрофагами были получены сублинии опухолевых клеток, обладающие большей жизнеспособностью в данных условиях в сравнении с исходными опухолевыми клетками (Рисунок 5). Эксперимент проводился по протоколу, описанному в п. 2.2 в трех биологических повторах.





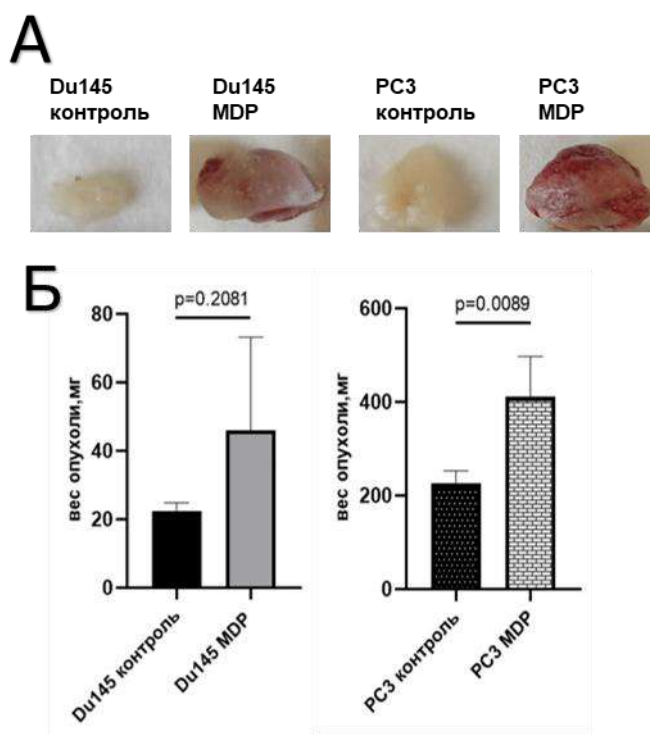
Устойчивость опухолевых клеток, полученных в результате контакт-зависимого сокультивирования с макрофагами (А). Устойчивость опухолевых клеток, полученных в результате контакт-независимого сокультивирования (Б). Контрольные клетки – это исходные клетки, которые не проходили отбор с цитотоксическими макрофагами. Экспериментальные сублинии клеточных линий были получены в результате трех раундов сокультивирования с цитотоксическими макрофагами, особенности получения которых описаны в таблице 9

**Рисунок 5** - Результаты сравнения устойчивости сублиний и исходных опухолевых клеток рака предстательной железы к цитотоксической активности макрофагов

Полученные результаты дают основу полагать, что при контакт-независимом механизме устойчивость опухолевых клеток к цитотоксическому действию макрофагов не развивается. Это предполагает принципиальное значение межклеточных взаимодействий или тесной ко-локализации при сокультивировании макрофага и опухолевой клетки для селекции устойчивых злокачественных клонов.

### 3.5 Исследования *in vivo*

Следующим этапом работы было изучение характеристик полученных сублиний в моделях *in vivo*. Для исследования использовались устойчивые сублинии опухолевых клеток PC3 и Du145, полученные при контактном сокультивировании с макрофагами, дифференцированными при помощи PMA, IFN $\gamma$  и MDP, так как эти сублинии продемонстрировали достоверно значимую разность в устойчивости к цитотоксическому действию макрофагов (Рисунок 5). Продолжительность эксперимента составляла 3 недели. Размер опухолей измерялся по окончании эксперимента. Образовавшиеся опухоли использовали для измерения их терминального веса (Рисунок 6).

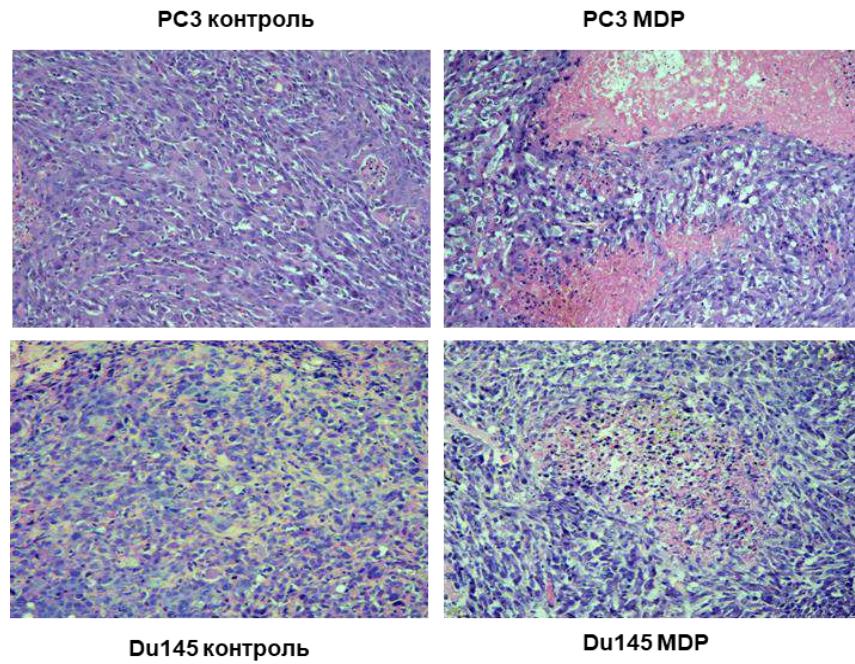


Внешний вид (А) и терминальный вес образовавшихся подкожных ксенографтов (Б). Сравнивали устойчивые сублинии, полученные в условиях активации цитотоксической активности макрофагов при помощи PMA, IFN $\gamma$  и MDP (PC3 MDP и Du145 MDP) с их материнскими линиями (PC3 контроль, Du145 контроль), не подвергавшихся сокультивированию с макрофагами

**Рисунок 6** – Характеристики образовавшихся подкожных ксенографтов

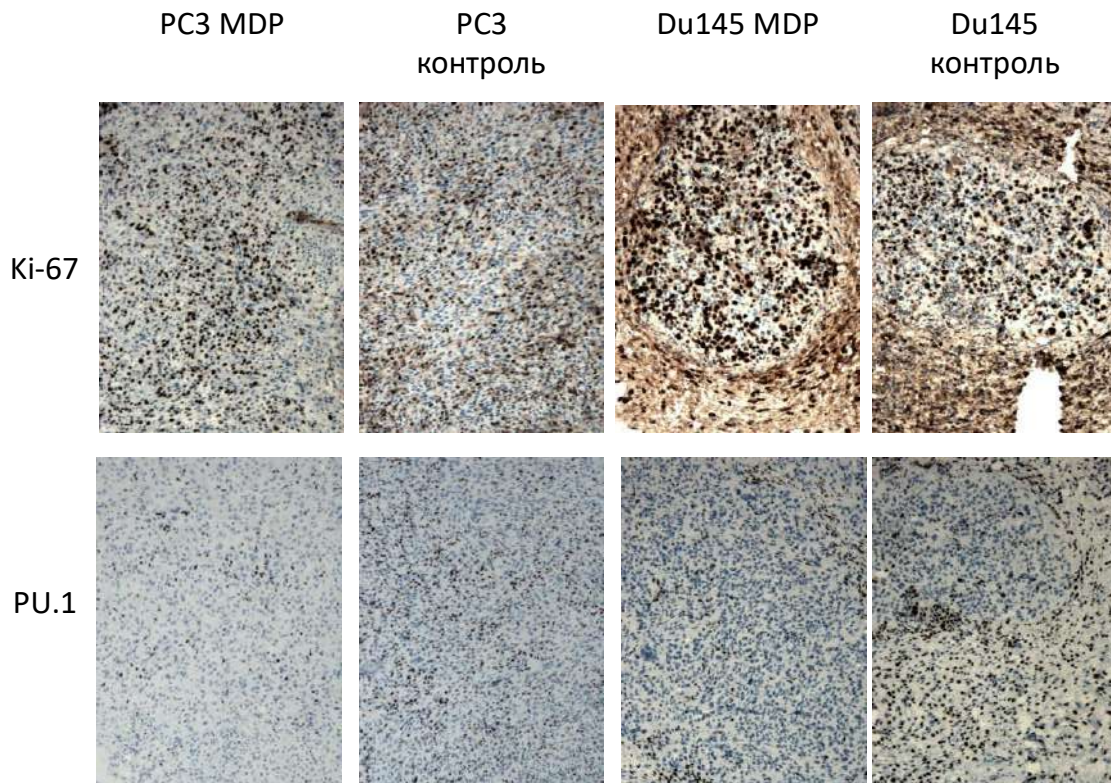
В результате эксперимента было показано, что опухоли, полученные из клеток устойчивых сублиний, обладали значительно большим размером. Далее провели гистологическое и ИГХ исследование полученных ксенографтов *in vivo* (Рисунок 7).

Было выявлено, что опухоли, полученные из устойчивых сублиний, характеризуются более злокачественным фенотипом. А именно, имеют большое количество очагов некроза, кровоизлияний, повышенную васкуляризацию по сравнению с контролем. Опухоли, полученные из клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов, также имели веретенчатое строение, инфильтративный периневральный рост. Все эти характеристики указывают на повышенную степень злокачественности опухоли.



**Рисунок 7** - Примеры гистологического окрашивания опухолей подкожных ксенографтов гематоксилин-эозином (увеличение - 100x)

На следующем этапе было проведено иммуногистохимическое окрашивание опухолей подкожных ксенографтов с применением антител к PU.1 и Ki-67 (Рисунок 8).



**Рисунок 8** – Образцы иммуногистохимического окрашивания опухолей подкожных ксенографтов с антителами к PU.1 и Ki-67 (увеличение - 100x)

Результаты проведенного исследования показали, что для опухолевых клеток всех исследуемых линий (PC3 и Du145) наблюдается одинаковая тенденция. А именно, опухоли, полученные из клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов, характеризовались меньшей степенью инфильтрации макрофагами (PU.1+). Данный факт может говорить о пониженной иммуногенности опухоли, полученной из устойчивых сублиний. Разницы в количестве клеток, экспрессирующих Ki-67, между опухолями, полученными из контрольных и сублиний клеток, выявлено не было.

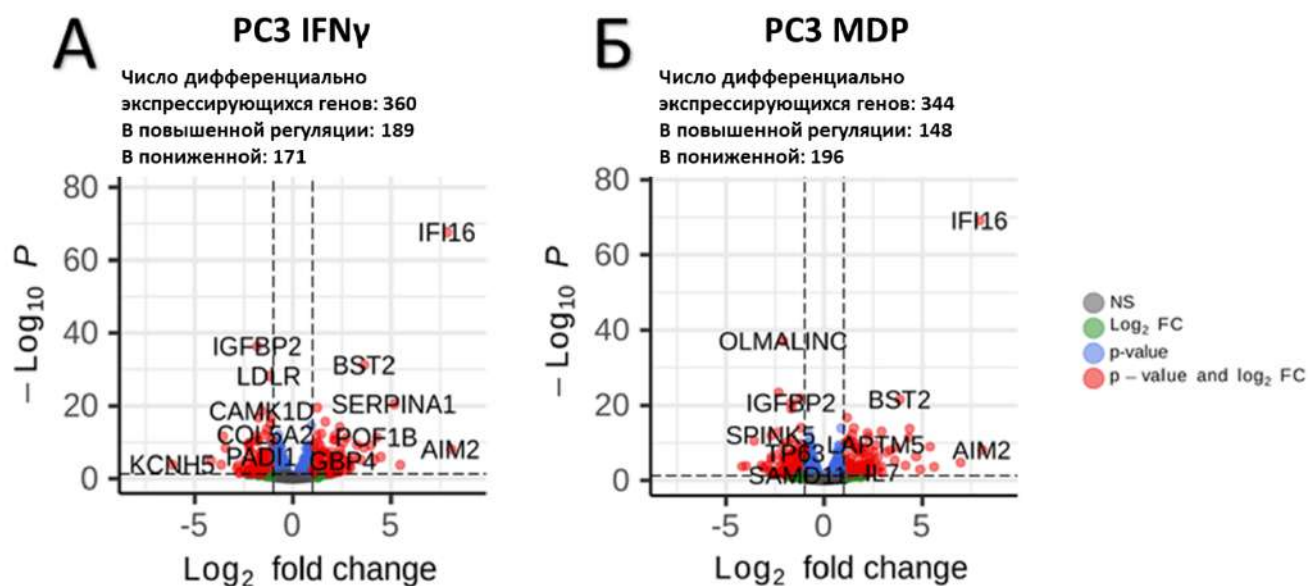
Для оценки метастатического потенциала исследуемых клеток из экспериментальных животных также были извлечены легкие, печень и регионарные лимфоузлы. Далее был проведен гистологический анализ, в результате которого верифицируемые метастазы обнаружены не были.

Проведенные эксперименты *in vivo* показали, что клетки, обладающие устойчивостью к цитотоксической активности макрофагов, характеризуются более злокачественным фенотипом. Разницы в метастатическом потенциале между контрольными и устойчивыми сублиниями выявлено не было.

### 3.6 Анализ транскриптома

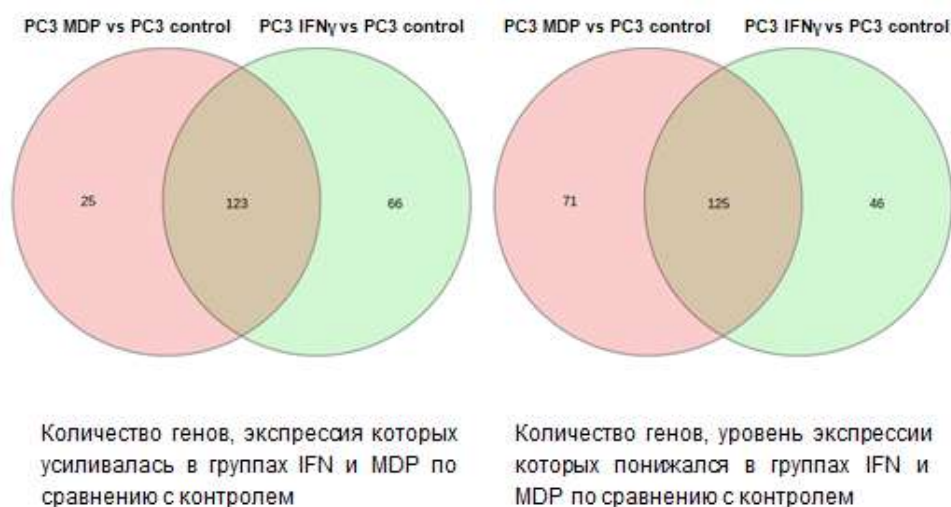
На следующем этапе исследования был произведен анализ транскриптома клеток линии PC3 и их устойчивых сублиний, полученных в результате контактного сокультивирования с клетками THP-1, дифференцированными при помощи PMA+IFN $\gamma$  (PC3 IFN $\gamma$ ) и PMA+IFN $\gamma$ +MDP (PC3 MDP). В результате секвенирования на платформе HiSeq 2000 (Illumina) было получено 267,218,048 одноконцевых прочтений. После удаления адаптеров и прочтений рРНК на каждую библиотеку приходилось 29.08 $\pm$ 4.54 млн прочтений. На эталонный геном человека *GRCh38.p12* выравнивалось от 97.72% до 97.92% всех прочтений, причем большая их часть картировалась уникально (>88%).

В ходе исследования было обнаружено 360 дифференциально экспрессирующихся генов с достоверно ( $\log_2$  fold change >1, FDR corrected p-value<0.05) изменяющейся экспрессией в библиотеках PC3 IFN $\gamma$  по сравнению с контролем (Рисунок 9А). Среди них 189 генов находились в положительной регуляции, 171 ген подвергались отрицательной регуляции. В образцах PC3 MDP по сравнению с контролем 344 гена достоверно ( $\log_2$  fold change >1, FDR corrected p-value<0.05) дифференциально экспрессировались (Рисунок 9 Б). Среди них, экспрессия 148 генов была повышена, а 196 генов находились в отрицательной регуляции.



**Рисунок 9** – Диаграммы рассеяния, отображающие дифференциальную экспрессию генов с достоверной разностью между библиотеками PC3 и PC3 IFN $\gamma$  (А), PC3 и PC3 MDP (Б)

Необходимо отметить, что более половины генов (57.4%), с повышенной экспрессией в экспериментальных библиотеках были одинаковы для библиотек PC3 MDP и PC3 IFN $\gamma$ . Однако 66 генов с достоверно повышенной экспрессией были уникальны для библиотеки PC3 IFN $\gamma$ , а 25 генов с достоверно повышенной экспрессией были уникальны для библиотеки PC3 MDP. Также, более половины генов (51.6%) с достоверно пониженной экспрессией в экспериментальных библиотеках были одинаковы для библиотек PC3 MDP и PC3 IFN $\gamma$ . На рисунке 10 представлены диаграммы Венна для дифференциально экспрессирующихся генов исследуемых библиотек.



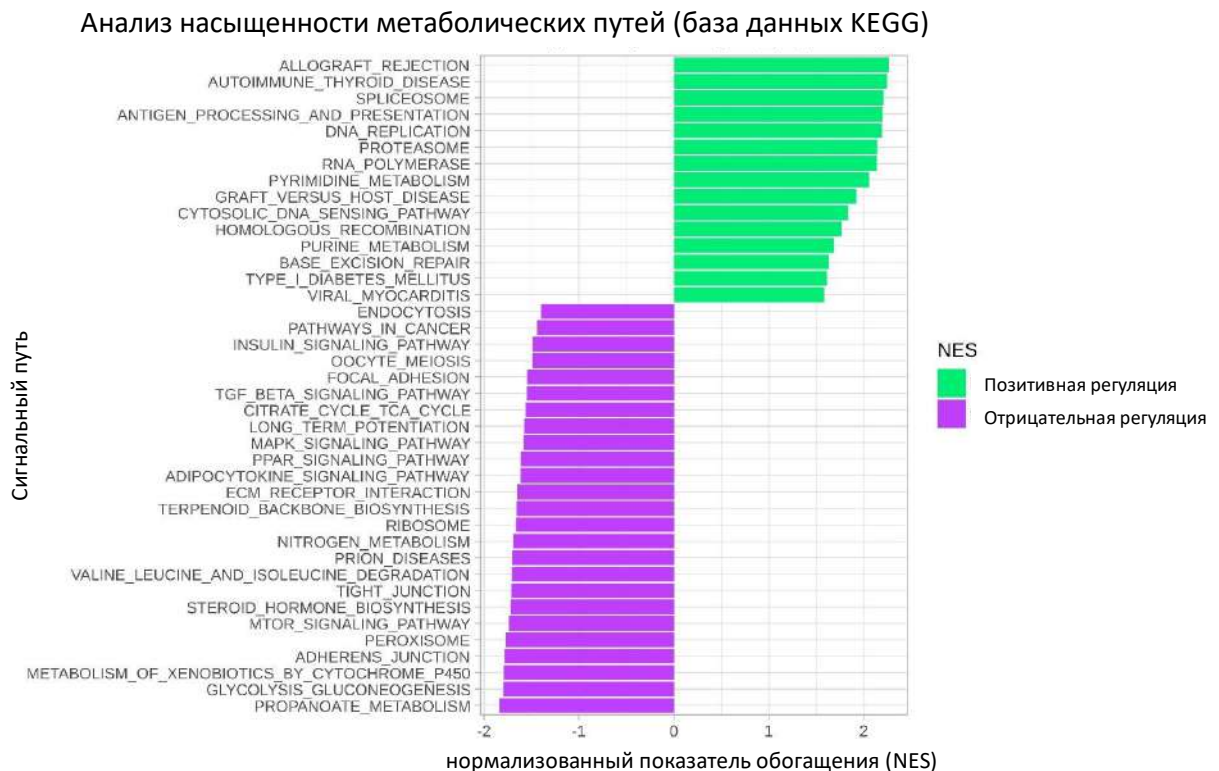
**Рисунок 10** – Диаграммы Венна для дифференциально экспрессирующихся генов с достоверной разностью экспрессии для библиотек PC3 MDP и PC3 IFN $\gamma$  относительно контроля

Стоит отметить, что дифференциально экспрессирующихся генов с достоверно ( $\log_2$  fold change  $>1$ , FDR corrected p-value  $<0.05$ ) изменяющейся экспрессией между библиотеками PC3 IFN $\gamma$  и PC3 MDP обнаружено не было.

Интересно, что в библиотеках устойчивых опухолевых клеток были обнаружены 4 дифференциально экспрессирующихся гена с достоверно ( $\log_2$  fold change  $>1$ , FDR corrected p-value  $<0.05$ ) изменяющейся активностью (*AIM2*, *DHLAG*, *LINC01322*, *HDX*), экспрессия которых не наблюдалась в контрольных образцах. Стоит отметить, что экспрессия всех этих генов наблюдалась как в клетках сублинии PC3 IFN $\gamma$ , так и PC3 MDP.

Таким образом, устойчивые к цитотоксической активности опухолевые клетки, полученные в условиях дифференцировки моноцитов при помощи PMA+IFN $\gamma$  и PMA+IFN $\gamma$ +MDP, имеют схожий профиль экспрессии генов. На основании полученных данных можно говорить о том, что добавление MDP на стадии формирования цитотоксического фенотипа макрофагов вызывает активацию схожих механизмов устойчивости опухолевых клеток, как и в случае использования PMA+IFN $\gamma$ .

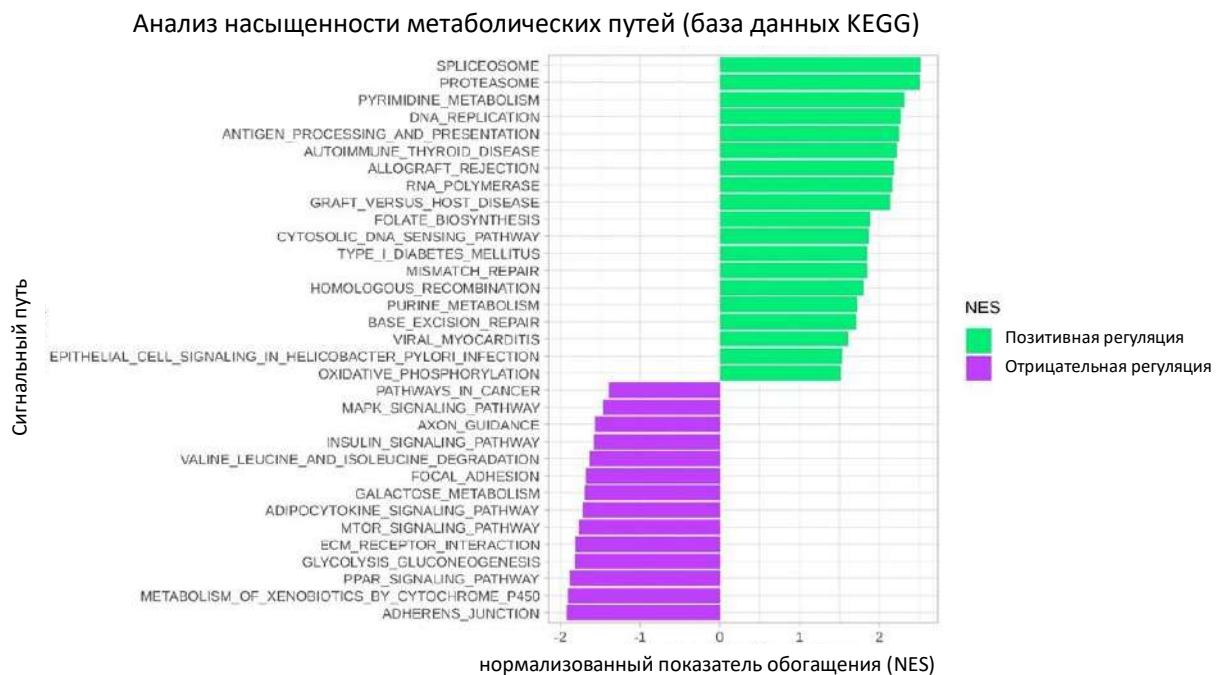
Далее производился анализ насыщенности метаболических путей на основе базы данных KEGG с применением пакета R fgsea. На рисунке 11 зеленым представлены сигнальные пути, активность которых была достоверно повышена в библиотеках PC3 IFN $\gamma$  в сравнении с контролем, а фиолетовым - обозначены сигнальные пути, активность которых была подавлена.



**Рисунок 11** - Результаты анализа обогащения генных онтологий дифференциально экспрессирующихся генов в библиотеках PC3 IFN $\gamma$  по сравнению с контролем

Как видно, в группе PC3 IFN $\gamma$  по сравнению с контролем повышается уровень экспрессии генов, ассоциированных с процессами хранения, передачи и реализации генетической информации (Spliceosome, DNA replication, RNA polymerase, Pyrimidine metabolism, Homologous recombination, Purine metabolism, Base excision repair). Остальные дифференциально экспрессируемые гены с повышенной регуляцией относились к сигнальным путям, ассоциированными с ответом на провоспалительные цитокины, положительной регуляцией сигнальной трансдукции и клеточной коммуникации. Гены, уровень которых понижался в группе PC3 IFN $\gamma$ , относились к метаболическим путям, ассоциированным с ответом на жасмоновую кислоту, метаболизмом поликетидов и алкогольных соединений. Стоит отметить, что метаболические пути mTOR, TGF- $\beta$  и MAPK находились в отрицательной регуляции. Вместе с тем, экспрессия генов - участников сигнальных путей, опосредующих межклеточное взаимодействие, адгезию и цитоскелет, также находилась в отрицательной регуляции в библиотеках PC3 IFN $\gamma$  по сравнению с контролем. Полученные данные дают основания полагать, что опухолевые клетки, устойчивые к цитотоксическому действию макрофагов, полученных в результате активации моноцитов IFN $\gamma$  и PMA, имеют тенденцию к увеличению подвижности, более активной реализации генетического материала в условиях воспаления на фоне замедления метаболизма.

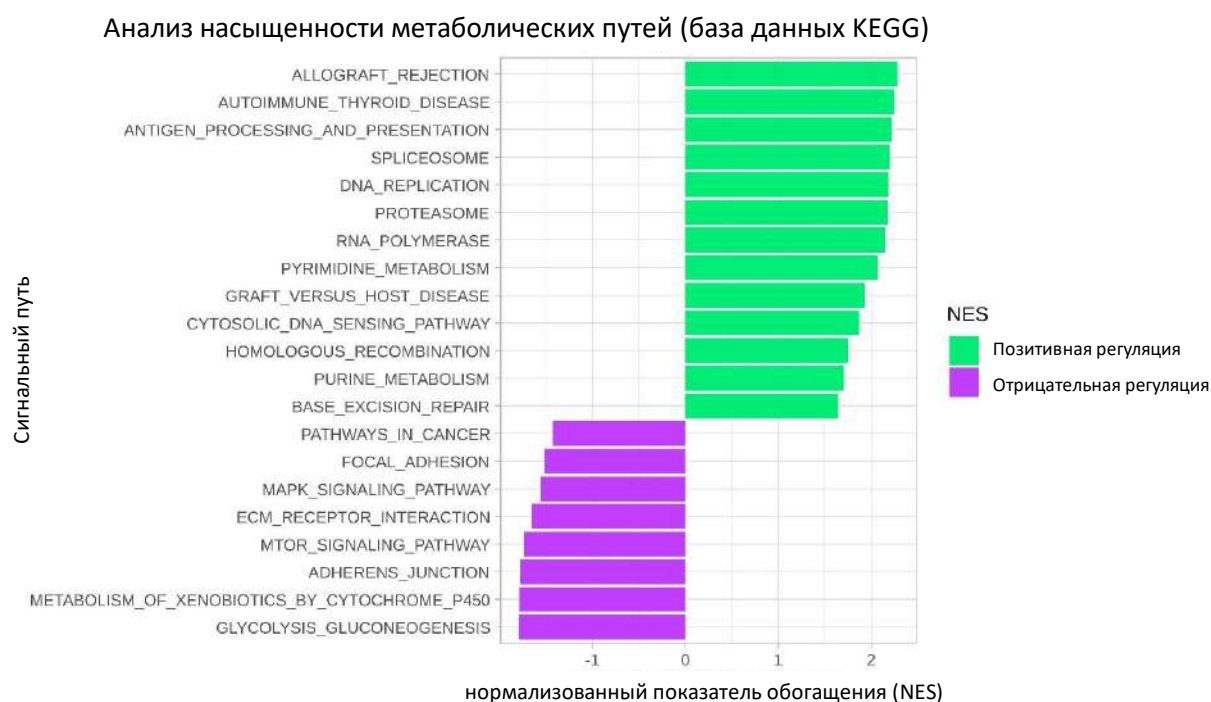
Аналогичный анализ насыщенности метаболических путей на основе базы данных KEGG был проведен для библиотек PC3 MDP по сравнению с контролем (Рисунок 12).



**Рисунок 12** - Результаты анализа обогащения генных онтологий дифференциально экспрессирующихся генов в библиотеках PC3 MDP по сравнению с контролем

Клетки PC3 MDP имели схожий профиль активируемых метаболических путей с клетками PC3 IFN $\gamma$ . Интересно, что с добавлением в систему MDP в опухолевых клетках, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов, наблюдалось повышение уровня экспрессии генов - участников окислительного фосфорилирования, входящие в сигнальный путь Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori IFN $\gamma$  infection. В совокупности, активация этих генов ведет к повышению активности каскада MAPK, перестройке актинового цитоскелета и, как следствие, к повышению подвижности и пролиферации опухолевых клеток (<https://www.kegg.jp/pathway/hsa05120>). Гены с пониженной экспрессией в группе PC3 MDP также относились к схожим сигнальным путям, что и в случае PC3 IFN $\gamma$ , и были ассоциированы с ответом на жасмоновую кислоту, метаболизмом поликетидов и алкогольных соединений, а также к метаболизму стероидов. Метаболические пути mTOR, MAPK, но не TGF- $\beta$  находились в отрицательной регуляции. Сигнальные пути, регулирующие межклеточное взаимодействие, адгезию и цитоскелет также имели отрицательную степень насыщения.

На следующем этапе на основе базы данных KEGG был произведен анализ насыщенности метаболических путей, общих для библиотек PC3 IFN $\gamma$  и PC3 MDP, в сравнении с контролем (Рисунок 13).



**Рисунок 13** - Результаты анализа обогащения генных онтологий общих дифференциально экспрессирующихся генов для библиотек PC3 IFN $\gamma$  и PC3 MDP по сравнению с контролем

В совокупности, опухолевые клетки, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, характеризовались пониженной экспрессией генов, ассоциированных с



метаболизмом поликетидов и алкогольных соединений, а также ксенобиотиков. Имеются данные о том, что для злокачественных образований многих локализаций, в том числе РПЖ, подавление генов системы цитохрома P450 снижает чувствительность опухолевых клеток к некоторым цитостатикам и опосредует более злокачественный фенотип [173]. Более того, в отрицательной регуляции находились гены, вовлечённые в процессы клеточной коммуникации и адгезии, что может говорить о том, что опухолевые клетки, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, характеризуются повышенной способностью к автономному росту и миграции. Метаболические пути с положительной степенью насыщения были ассоциированы с процессами хранения, передачи и реализации генетической информации и ответом на провоспалительные цитокины.

Проанализировав данные дифференциальной экспрессии генов библиотек PC3 IFN $\gamma$  и PC3 MDP по сравнению с контролем, с учетом наблюдаемых характеристик устойчивых опухолевых клеток были выявлены гены - потенциальные детерминанты устойчивости к цитотоксической активности, отвечающие за формирование более злокачественного фенотипа опухолевых клеток (Таблица 10).

**Таблица 10** - Дифференциально экспрессирующиеся гены в устойчивых опухолевых клетках линии PC3 по сравнению с контролем

Ген	Название гена	PC3 IFN $\gamma$		PC3 MDP	
		Кратность изменения (Log2Fold change)	Достоверность (AdjPvalue)	Кратность изменения (Log2Fold change)	Достоверность (AdjPvalue)
<b>Регуляция клеточного цикла</b>					
<i>BST2</i>	bone marrow stromal cell antigen 2	3,85	2,93E-22	3,63	6,28E-32
<i>FMNL3</i>	formin like 3	2,54	2,39E-08	2,56	1,04E-10
<i>GBP4</i>	guanylate binding protein 4	2,55	4,22E-06	2,54	1,35E-05
<i>NGFR</i>	nerve growth factor receptor	2,35	0,002	2,20	0,002
<i>PTN</i>	pleiotrophin	2,26	2,53E-12	2,10	2,28E-11
<i>PKHD1</i>	PKHD1 ciliary IPT domain containing fibrocystin/polyductin	2,21	2,37E-05	2,21	2,19E-06
<i>S1PR1</i>	sphingosine-1-phosphate receptor 1	1,87	0,0007	1,70	0,001

<i>PRKAR2B</i>	protein kinase cAMP-dependent type II regulatory subunit beta	1,79	0,001	1,52	0,011
<i>IL24</i>	interleukin 24	1,76	0,001	1,57	0,005
<i>LGALS9</i>	galectin 9	1,55	0,039	1,47	0,043
<i>GPER1</i>	G protein-coupled estrogen receptor 1	1,20	0,007	1,21	0,004
<i>GLP2R</i>	glucagon like peptide 2 receptor	-1,07	0,008	-1,23	0,002
<i>CLDN1</i>	claudin 1	-	-	-1,14	1,07E-15
<i>AKR1C3</i>	aldo-keto reductase family 1 member C3	-1,48	9,71E-08	-1,34	1,28E-05
<i>TP63</i>	tumor protein p63	-1,49	5,31E-08	-1,57	5,42E-08
<i>AKR1C2</i>	aldo-keto reductase family 1 member C2	-1,60	1,85E-05	-1,50	1,33E-05
<i>IGFBP2</i>	insulin like growth factor binding protein 2	-1,68	2,33E-21	-1,81	4,36E-37
<i>HPGD</i>	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase	-1,73	0,014	-2,06	0,0008
<i>SPINK5</i>	serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	-2,71	9,25E-13	-2,24	1,30E-10
<b>Клеточная адгезия</b>					
<i>MUC16</i>	mucin 16, cell surface associated	4,15	9,68E-05	4,15	5,57E-06
<i>FAT3</i>	FAT atypical cadherin 3	3,65	1,61E-09	3,63	2,86E-09
<i>CDH11</i>	cadherin 11	2,33	7,08E-09	2,38	7,58E-15
<i>PCDH19</i>	protocadherin 19	2,03	6,28E-08	1,96	4,80E-08
<i>NEGR1</i>	neuronal growth regulator 1	1,63	3,29E-08	1,48	4,98E-08
<i>ADAMTS9</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 9	1,48	0,009	1,75	0,001
<i>PCDH9</i>	protocadherin 9	-	-	1,49	0,012
<i>LGALS3BP</i>	galectin 3 binding protein	1,17	2,06E-17	1,24	2,71E-20
<i>IGFN1</i>	immunoglobulin like and fibronectin type III domain containing 1	-	-	1,15	0,040
<i>PKP1</i>	plakophilin 1	-	-	1,14	8,93E-07
<i>ROBO4</i>	roundabout guidance receptor 4	1,06	7,78E-11	1,06	2,72E-08
<i>ABI3BP</i>	ABI family member 3 binding protein	-1,38	3,35E-06	-1,31	1,89E-05
<i>NPNT</i>	nephronectin	-	-	-1,03	0,0001
<i>CLDN9</i>	claudin 9	-1,52	0,022	-1,41	0,040
<i>FIBCD1</i>	fibrinogen C domain containing 1	-1,31	0,001	-1,09	0,008

<i>FLRT1</i>	fibronectin leucine rich transmembrane protein 1	-2,30	0,0002	-2,43	1,20E-05
<i>DLC1</i>	DLC1 Rho GTPase activating protein	-1,26	4,12E-08	-1,32	7,81E-08
<b>Миграция и инвазия</b>					
<i>MMP3</i>	matrix metalloproteinase 3	1,78	0,016	2,02	0,006
<i>MMP9</i>	matrix metalloproteinase 9	-	-	1,76	0,028
<i>FLOT1</i>	flotillin 1	1,42	5,56E-13	1,45	4,65E-13
<i>IGFBP3</i>	insulin like growth factor binding protein 3	-	-	-2,17	0,029
<i>PALMD</i>	palmdelphin	-1,90	0,036	-2,26	0,006
<b>Стволовой фенотип</b>					
<i>CDH11</i>	cadherin 11	2,33	7,08E-09	2,38	7,58E-15
<i>ZEB1</i>	zinc finger E-box binding homeobox 1	-	-	2,11	0,024
<i>TERT</i>	telomerase reverse transcriptase	-	-	1,56	0,007
<i>ALDH3A1</i>	aldehyde dehydrogenase 3 family member A1	-1,80	0,003	-1,69	0,010
<i>NDRG1</i>	N-myc downstream regulated 1	-1,89	0,022	-1,85	0,026

Помимо анализа дифференциально экспрессирующихся генов, кодирующих белки, дополнительно проведен анализ генов длинных некодирующих РНК (днРНК), экспрессия которых достоверно изменялась при приобретении опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагов. В таблице 11 представлены длинные некодирующие РНК с достоверно повышенной или пониженной экспрессией в устойчивых опухолевых клетках линии РС3 с наибольшей степенью разности.

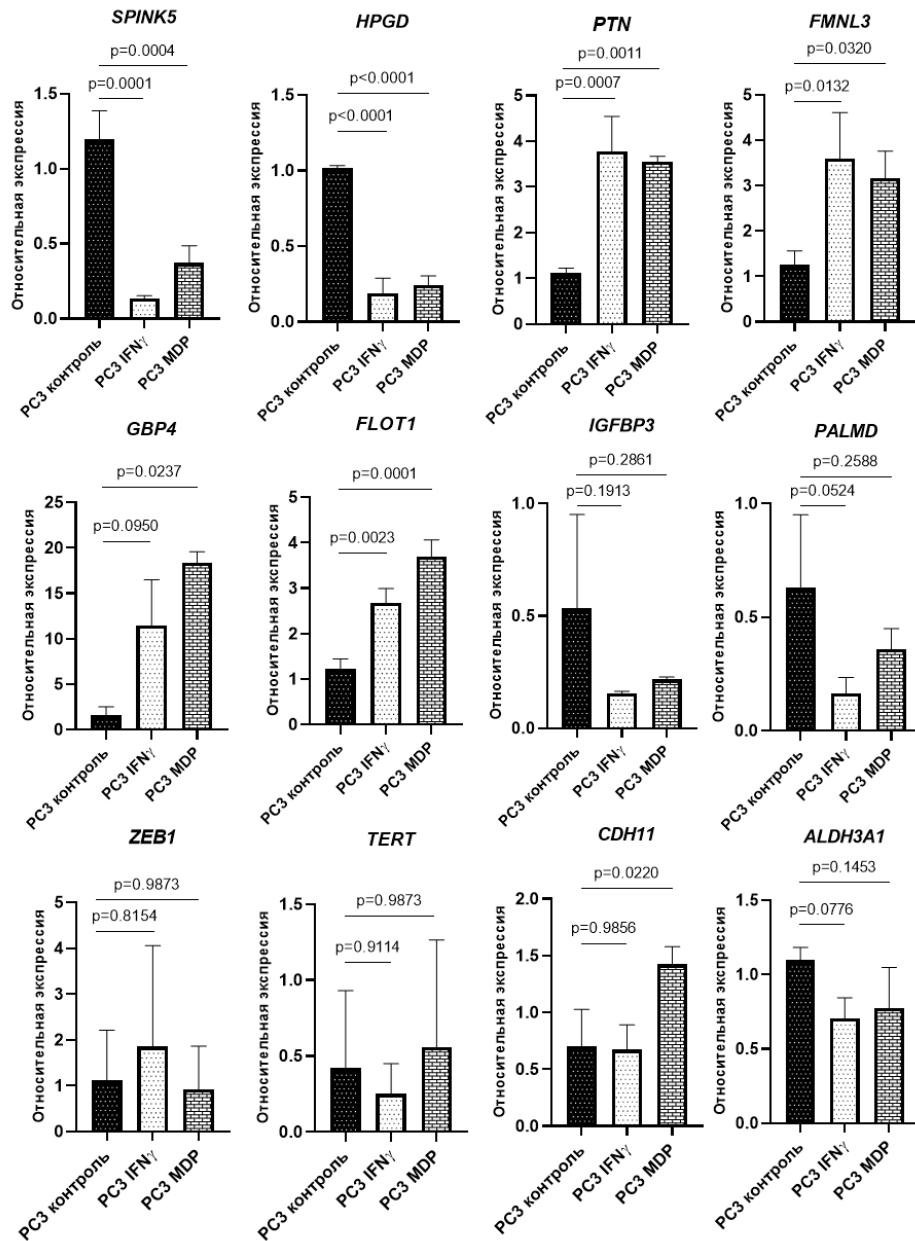
**Таблица 11** - Дифференциально экспрессирующиеся гены днРНК в устойчивых опухолевых клетках линии PC3 по сравнению с контролем

Ген	Название гена	PC3 IFN $\gamma$		PC3 MDP	
		Кратность изменения (Log2Fold change)	Достоверность (AdjPvalue)	Кратность изменения (Log2Fold change)	Достоверность (AdjPvalue)
<i>LINC02301</i>	lincRNA	2,74	0,004	2,93	0,001
<i>LINC00623</i>	lincRNA	1,82	7,85E-09	1,71	1,13E-07
<i>LCAL1</i>	lung cancer associated lincRNA 1	-	-	1,73	0,016
<i>LINC02591</i>	lincRNA	1,52	0,002	1,49	0,002
<i>LINC01619</i>	long intergenic non-protein coding RNA 1619	1,26	0,043	-	-
<i>CCDC183-AS1</i>	CCDC183 antisense RNA 1	-	-	1,24	0,014
<i>LINC01145</i>	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1145	1,17	0,001	1,19	0,0003
<i>LINC00106</i>	long intergenic non-protein coding RNA 106	-	-	1,14	0,017
<i>SH3PXD2A-AS1</i>	SH3PXD2A antisense RNA 1	-	-	1,08	0,011
<i>LINC00540</i>	long intergenic non-protein coding RNA 540	1,01	0,006	1,02	0,004
<i>PGM5P3-AS1</i>	PGM5P3 antisense RNA 1	-	-	-1,15	0,043
<i>LINC01285</i>	long intergenic non-protein coding RNA 1285	-1,18	4,25E-04	-1,22	6,95E-05
<i>PGM5P4-AS1</i>	PGM5P4 antisense RNA 1	-	-	-1,27	0,039
<i>LRP4-AS1</i>	lincRNA LRP4 antisense RNA 1	-	-	-1,72	0,008
<i>LINC00685</i>	Antisense RNA	-1,85	0,014	-1,70	0,012

<i>HSD11B1-ASI</i>	HSD11B1 antisense RNA 1	-1,95	0,0001	-	-
<i>LINC00887</i>	long intergenic non-protein coding RNA 887	-1,96	2,23E-04	-1,51	0,006
<i>OLMALINC</i>	oligodendrocyte maturation-associated long intergenic non-coding RNA	-2,08	1,70E-17	-1,74	8,14E-38
<i>LINC00898</i>	long intergenic non-protein coding RNA 898	-2,12	0,005	-1,81	0,017
<i>SNHG18</i>	lncRNA small nucleolar RNA host gene 18	-2,70	2,43E-03	-2,18	0,008

На основании полученных данных можно предположить, что в результате добавления компонента клеточной стенки бактерий (MDP) в качестве активатора цитотоксической активности макрофагов задействуется большее число механизмов, вовлеченных в процесс формирования устойчивости, что, в свою очередь, может способствовать формированию более злокачественного фенотипа опухолевых клеток.

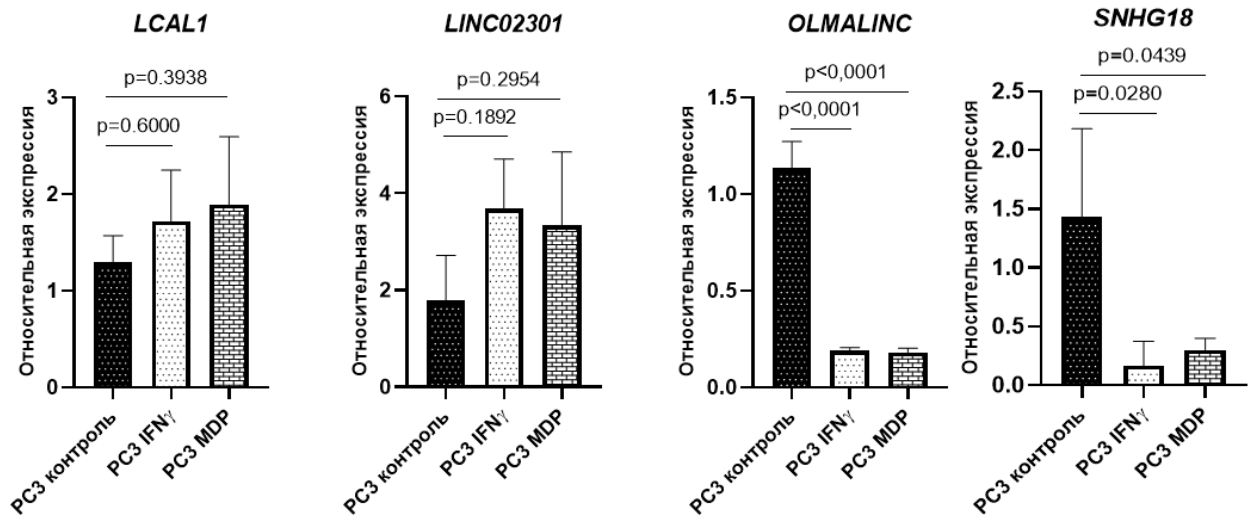
На следующем этапе была произведена валидация данных, полученных при помощи транскриптомного секвенирования, методом qRT-PCR. Была исследована экспрессия мРНК генов *SPINK5*, *HPGD*, *IGFBP3*, *PALMD*, *PTN*, *FLOT1*, *FMNL3*, *GBP4*, *ZEB1*, *TERT*, *ALDH3A1*, *CDH11* (Рисунок 14).



Экспрессия гена в контрольной клеточной линии взята за 1. Представлены результаты трех независимых повторов.

**Рисунок 14** – qRT-PCR анализ относительной экспрессии генов *SPINK5*, *HPGD*, *IGFBP3*, *PALMD*, *PTN*, *FLOT1*, *FMNL3*, *GBP4*, *ZEB1*, *TERT*, *ALDH3A1*, *CDH11* в клеточной линии PC3 и ее сублиниях, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов.

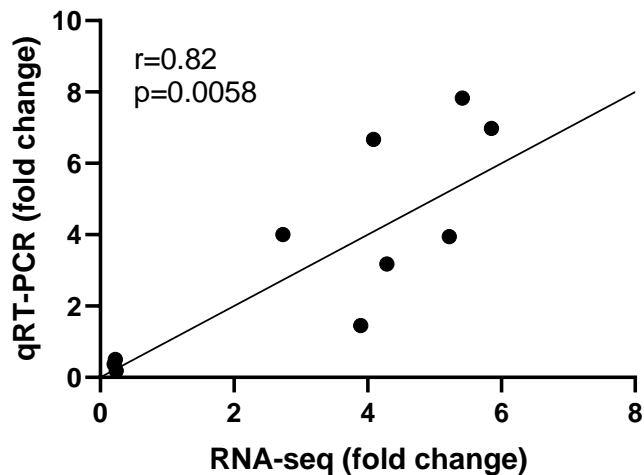
Экспрессия днРНК *LINC02301*, *LCAL1*, *OLMALINC* и *SNHG18* также была исследована методом qRT-PCR (Рисунок 15).



Экспрессия гена в контрольной клеточной линии взята за 1. Представлены результаты трех независимых повторов

**Рисунок 15** - qRT-PCR анализ относительной экспрессии генов *LINC02301*, *LCAL1*, *OLMALINC* и *SNHG18* в клеточной линии PC3 и ее сублиниях, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов.

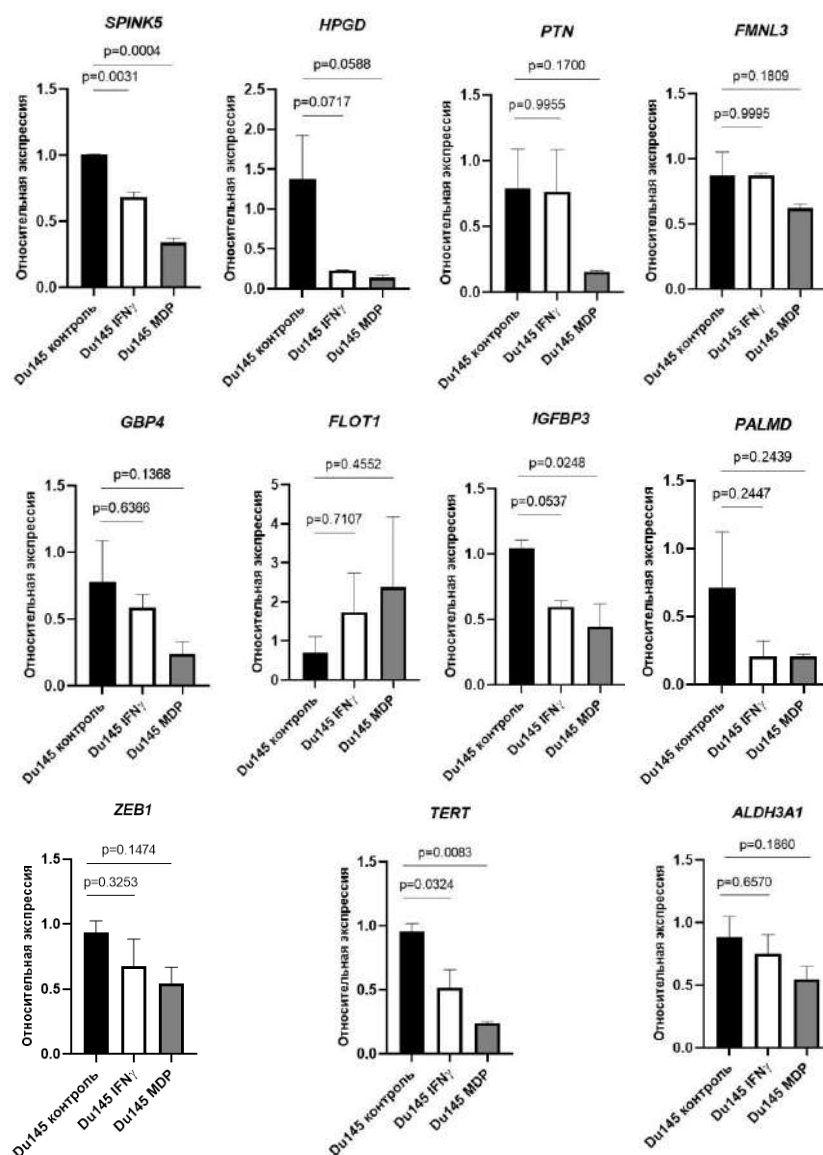
Сопоставимость данных, полученных методом RNA-seq и qRT-PCR, оценивалась при помощи определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена (Рисунок 16).



**Рисунок 16** - Корреляция между данными дифференциальной экспрессии генов в клетках PC3 IFN $\gamma$  и PC3 MDP относительно контроля, полученными методом qRT-PCR и RNA-seq

На основании полученных данных ( $r = 0,82$ ;  $p = 0,0058$ ), можно сделать вывод о том, что изменение экспрессии исследуемых генов, выявленные методом RNA-seq, высоко коррелировали с результатами ПЦР-скрининга.

На следующем этапе работы была произведена оценка уровня экспрессии исследуемых генов методом qRT-PCR в клетках линии Du145 и их сублиний, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов, полученные в результате контактного сокультивирования с макрофагами (Du145 IFN $\gamma$  и Du145 MDP) (Рисунок 17).



Экспрессия гена в контрольной клеточной линии взята за 1. Представлены результаты трех независимых повторов

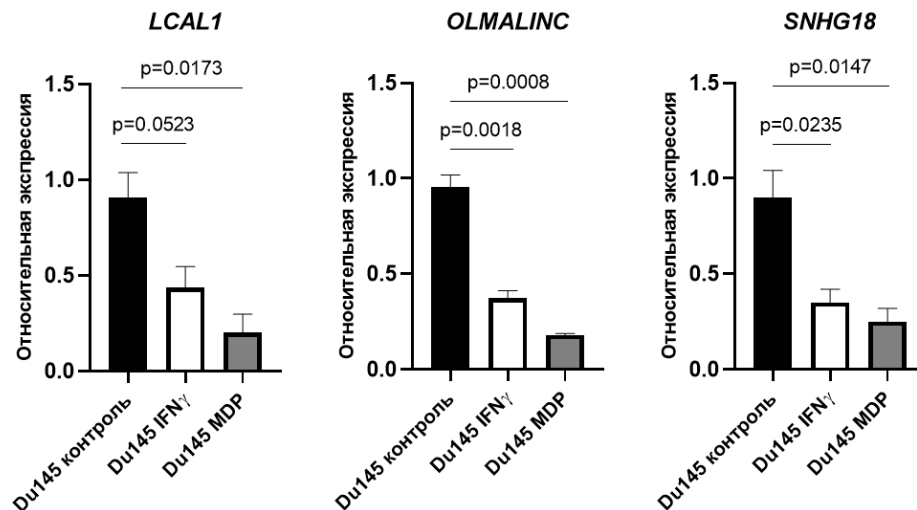
**Рисунок 17** - qRT-PCR анализ относительной экспрессии генов SPINK5, HPGD, IGFBP3, PALMD, PTN, FLOT1, FMNL3, GBP4, ZEB1, TERT, ALDH3A в клеточной линии Du145 и ее сублиниях, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов.

На основании полученных данных можно заключить, что изменение экспрессии большинства исследуемых генов в устойчивых клетках линии Du145 имело аналогичную



тенденцию, как и в случае PC3. Так, с приобретением устойчивости к цитотоксической активности макрофагов уровень экспрессии генов *SPINK5*, *HPGD*, *IGFBP3*, *PALMD*, *ALDH3A* понижался. В случае *SPINK5*, *IGFBP3*, *PALMD* различие в экспрессии достигло статистической значимости для клеток линии Du145. Уровень экспрессии гена *FLOT1* понижался в устойчивых клетках исследуемых линий. Стоит отметить, что наблюдались и противоположные результаты. Так, в случае PC3 с приобретением устойчивости повышался уровень экспрессии генов *PTN*, *FMNL3*, *GBP4* и *CDH11*, в то время как в клетках линии Du145 данные гены находились в отрицательной регуляции. Экспрессия *CDH11* в клетках линии Du145 не была обнаружена. Особого внимания заслуживают гены *ZEB1* и *TERT*, уровень экспрессии которых снижался в клетках линии Du145 с приобретением устойчивости к цитотоксической активности макрофагов. В случае PC3 по результатам RNA-seq экспрессия *ZEB1* и *TERT* достоверно повышалась в сублинии PC3 MDP. Однако в ходе исследования методом qRT-PCR достоверной разности экспрессии получено не было. Стоит отметить, что разность экспрессии всех исследуемых генов увеличивалась с добавлением провоспалительного фактора MDP на стадии дифференцировки моноцитарных клеток.

Экспрессия днРНК *LINC02301*, *LCAL1*, *OLMALINC* и *SNHG18* также была исследована методом qRT-PCR в клетках линии Du145 и их устойчивых сублиниях, полученных в результате контакт-зависимого метода сокультивирования с макрофагами (Рисунок 18).



Экспрессия гена в контрольной клеточной линии взята за 1. Представлены результаты трех независимых повторов

**Рисунок 18** - qRT-PCR анализ относительной экспрессии генов *LCAL1*, *OLMALINC* и *SNHG18* в клеточной линии Du145 и ее сублиниях, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов.

Стоит отметить, что экспрессия *LINC02301* не была обнаружена в клетках линии Du145. Уровень экспрессии *OLMALINC* и *SNHG18* снижался в опухолевых клетках, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов, что согласовывалось с данными, полученными для клеток линии PC3. Экспрессия гена *LCAL1*, напротив, снижалась с приобретением устойчивости клеток линии Du145, в то время как в случае PC3 экспрессия данного гена достоверно повышалась.

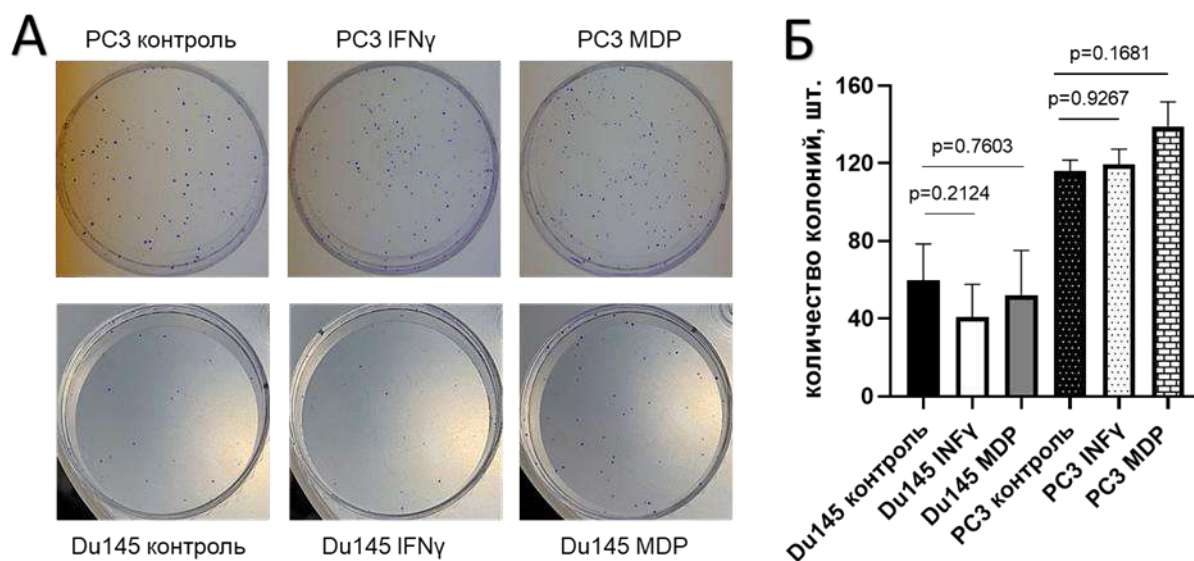
На основании полученных данных можно заключить, что цитотоксическая активность макрофагов запускает схожие механизмы формирования устойчивости опухолевых клеток рака предстательной железы. Вместе с тем отдельные аспекты этого механизма могут быть уникальны для каждой клеточной линии.

### **3.7 Функциональный анализ сублиний опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов *in vitro***

Для исследования характеристик опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксическому действию макрофагов, проводили анализ их характеристик *in vitro*. Результаты исследований указывают на приобретение такими опухолевыми клетками более злокачественного фенотипа.

#### **3.7.1 Исследование способности клеток формировать колонии в условиях разреженной популяции**

В условиях сильно разреженной клеточной популяции формируется дефицит ростовых факторов. В данных условиях менее злокачественные клетки теряют свою жизнеспособность и погибают. Был проведен тест на определение способности клеток PC3 и Du145 и их устойчивых сублиний, полученных в результате контактного сокультивирования с макрофагами, к формированию колоний в данных условиях. Клетки рассеивали в количестве 200 клеток на одну чашку и культивировали в стандартных условиях в течение 14 дней. По истечении срока культивирования клетки окрашивали водным раствором кристаллического фиолетового и подсчитывали колонии, размер которых превышал 1 мм. Количество и размер колоний оценивали при помощи программы ImageJ. На рисунке 19 представлены фотографии чашек и графические данные проведенного статистического анализа.



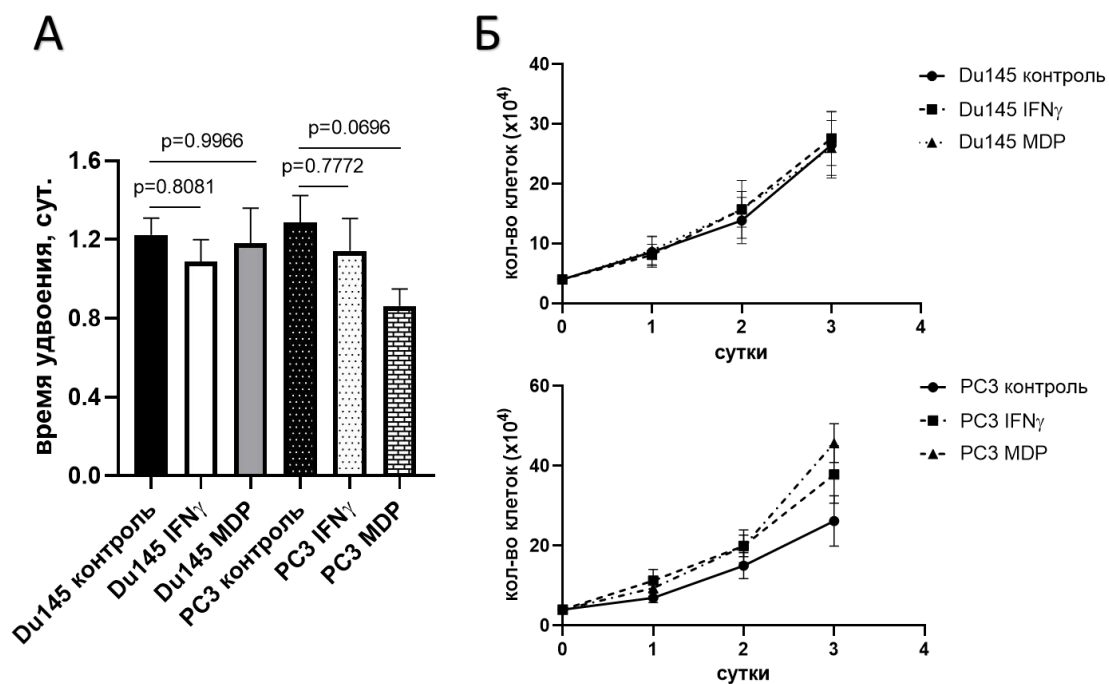
А – фотографии колоний клеток, сформированные в условиях сильно разреженной популяции, Б - статистический анализ разности количества сформировавшихся колоний устойчивых сублиний относительно контроля

### Рисунок 19 – Тест клоногенности

В результате проведенного анализа было выявлено, что все исследованные клеточные линии обладают способностью к образованию колоний в условиях сильно разреженной популяции. Следует отметить, что в случае клеток линии PC3 наблюдается тенденция к увеличению количества образовавшихся колоний с приобретением устойчивости опухолевых клеток к цитотоксическому действию макрофагов, в особенности при использовании для отбора опухолевых клеток цитотоксических макрофагов, стимулированных MDP. Такой же эффект наблюдается для клеток линии Du145. Однако приобретение устойчивости к цитотоксической активности макрофагов в целом снижало способность клеток данной линии к образованию колоний.

### 3.7.2 Исследование динамики роста

Повышенная скорость деления является одной из ключевых характеристик злокачественно трансформированных опухолевых клеток. Для изучения скорости пролиферации исходные клетки линии PC3 и Du145 и их устойчивые сублинии, полученные в результате контактного сокультивирования с макрофагами, рассаживали в концентрации  $4 \times 10^4$  и культивировали в течение трех дней. Подсчет клеток производили ежедневно. На рисунке 20 представлены результаты исследования динамики роста полученных устойчивых сублиний и контрольных клеток.



А - Среднее время удвоения, В - динамика роста клеток

**Рисунок 20** – Динамика роста полученных устойчивых сублиний и контрольных линий рака предстательной железы

Как видно из представленных графиков, значимых отличий в скорости пролиферации исследованных клеточных линий не наблюдалось. Однако просматриваются определенные тенденции.

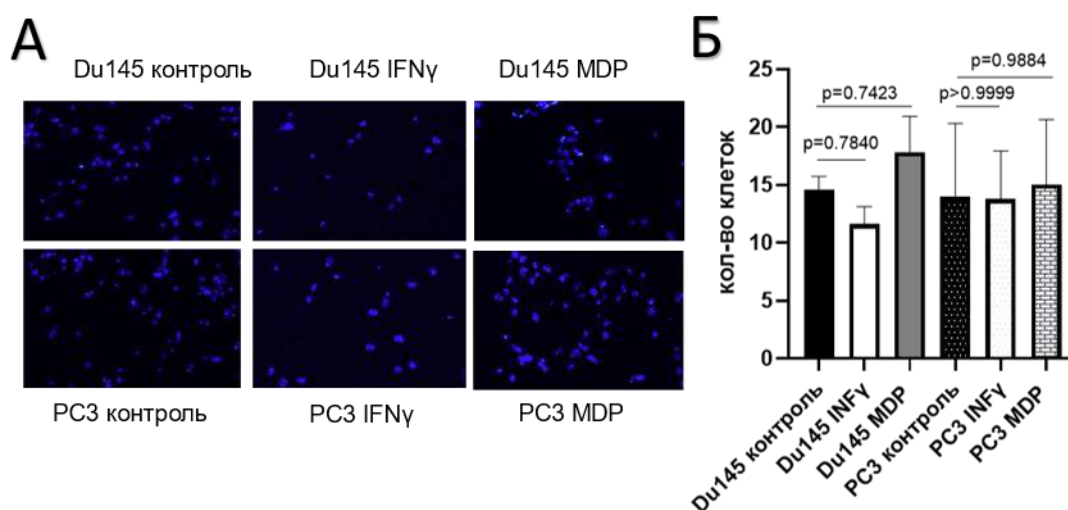
Исходные клеточные линии Du145 и PC3 делятся очень интенсивно. Время удвоения для контрольной линии Du145 составило приблизительно 1,2 суток, для PC3 – 1,3 суток. Сублинии PC3, устойчивые к цитотоксической активности, делятся быстрее контрольных линий: среднее время удвоения составляет в среднем 1,1 суток для PC3 IFN $\gamma$  и 0,9 суток для PC3 MDP. Интересно, что использование для отбора опухолевых клеток цитотоксических макрофагов, стимулированных MDP, приводит к отбору наиболее быстро пролиферирующих клеток.

В случае клеток линии Du145 картина противоположная. Использование для отбора макрофагов, стимулированных MDP, приводит к снижению скорости пролиферации устойчивых опухолевых клеток.

### 3.7.3 Анализ миграционной активности

Благодаря способности опухолевых клеток к инвазии и миграции осуществляется процесс метастазирования солидной опухоли. Злокачественные клетки используют разные

стратегии движения и могут мигрировать как индивидуально, так и коллективно. Миграция отдельных клеток осуществляется без межклеточных взаимодействий и во многом является следствием эпителиально-мезенхимального перехода. Для изучения миграции опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов, были использованы камеры Бойдена. Опухолевые клетки PC3 и Du145 рассаживали и их устойчивые сублинии, полученные в результате контактного сокультивирования с макрофагами, в камеры в концентрации  $5 \times 10^4$  кл/мл в бессывороточной среде. В лунку наливали культуральную среду, содержащую сыворотку. Спустя 24 часа культивирования клетки на обратной стороне мембраны окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst и подсчитывали. Результаты анализа представлены на рисунке 21.



А – фотографии мембран камеры Бойдена. Увеличение - 40х, Б - статистический анализ миграционной активности устойчивых сублиний относительно контроля.

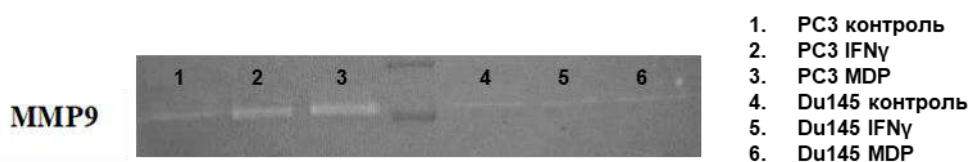
**Рисунок 21** – Анализ миграционной активности

В результате проведенного анализа статистически достоверной разницы в миграционной активности по градиенту сыворотки между полученными сублиниями и исходными клетками выявлены не были.

### 3.7.4 Анализ уровня секреции матриксных металлопротеиназ

Для роста, инвазии и метастазирования злокачественной опухоли необходимо remodelирование внеклеточного матрикса. Матриксные металлопротеиназы (MMPs) представляют собой семейство секретируемых цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать компоненты внеклеточного матрикса. Согласно литературным данным, MMPs

секретируются большинством типом солидных опухолей и играют важную роль в их прогрессии [174]. Семейство металлопротеаз состоит из шести групп, различающихся по химическому составу и типу расщепления субстрата. В данной работе производился анализ активности группы желатиназ. К этой группе относятся MMP-2 (~72 кДа) и MMP-9 (~92 кДа). Для оценки активности желатиназ методом зимографии проведен сравнительный анализ их секреции в кондиционированной культуральной среде исследуемыми клеточными линиями. Для этого исходные клетки линии PC3 и Du145 и их устойчивые сублинии пассаживали в концентрации  $5 \times 10^5$  и культивировали в стандартных условиях в течение 24 часов. Далее производили замену среды на бессывороточную и культивировали еще 24 часа перед началом исследования. Анализ уровня секреции был нормализован на количество клеток в момент забора проб. Результаты исследования представлены на рисунке 22.



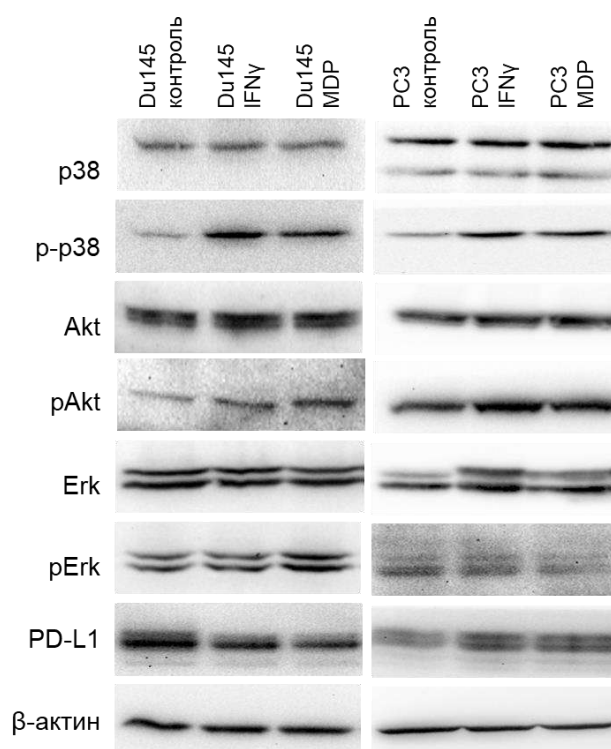
**Рисунок 22** - Желатиновая зимография кондиционированных сред, полученных от исследованных клеточных линий рака предстательной железы

При анализе полученных результатов оказалось, что все исследованные сублинии PC3 и Du145 экспрессируют только MMP-9, а MMP-2 не экспрессируют. С приобретением устойчивости к цитотоксической активности макрофагов клетки линии PC3 увеличивали уровень экспрессии данной желатиназы. В случае Du145 с приобретением устойчивости уровень секреции MMP-9 не менялся. Несмотря на увеличение экспрессии MMP-9 устойчивыми сублиниями клеток PC3 увеличение метастазирования в моделях *in vivo* не наблюдалось (п.2.5). Это может объясняться тем, что метастазирование — это сложный многофакторный процесс и увеличение экспрессии MMP-9 недостаточно для того, чтобы на него повлиять.

### **3.7.5 Исследование активности белков, потенциально вовлеченных в формирование устойчивости**

На следующем этапе было проведено исследование активности белков, потенциально вовлеченных в формирование устойчивого фенотипа опухолевых к цитотоксическому действию макрофагов. Исследовали клетки линии PC3 и Du145 и их устойчивые сублинии, полученные в результате контактного сокультивирования с макрофагами.

В ходе исследования методом вестерн блота была изучена экспрессия белка PD-L1, а также активность каскадов MAPK и PI3K/Akt путей методом анализа уровня фосфорилирования белков ERK1/2 (по остатку треонина 202 и остатку тирозина 204), Akt (по остатку серина 473) и p38 (по остатку треонина 180 и остатку тирозина 182). Оценка экспрессии бета-актина проводилась в качестве нормоконтроля. На рисунке 23 представлены результаты проведенного исследования.



**Рисунок 23** - Вестерн-блот анализ уровня фосфорилирования белков p38, Akt, Erk и экспрессии PD-L1 и β-актина в клеточных линиях PC3 и Du145 и их сублиниях

Результаты проведенного исследования указывают на то, что с приобретением устойчивости к цитотоксической активности макрофагов значительно повышается уровень фосфорилирования киназы p38, в то время как активность Akt и Erk остается неизменной. Приобретение устойчивости клеток РПЖ к цитотоксической активности макрофагов не влияло на уровень экспрессии белка PD-L1.

Полученные данные дают основу полагать, что киназа p38 вовлечена в процессы формирования резистентности опухолевых клеток к цитотоксическому действию макрофагов.

### 3.7.6 Анализ чувствительности опухолевых клеток к действию цитостатиков

Паклитаксел широко используется для лечения злокачественных опухолей разных локализаций. Действие препарата нацелено на ингибирование митоза и, тем самым, замедление и/или прекращение роста новообразования [175]. Формирование резистентности опухолевых клеток к действию цитостатиков группы таксанов является серьезной проблемой в онкологии [175]. В ходе исследования была проанализирована чувствительность клеток линии PC3, Du145 и их устойчивых сублиний, полученных в результате контактного сокультивирования с макрофагами, к действию паклитаксела. Клетки культивировали в присутствии 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 25 нМ и 50 нМ цитостатика в течение 72 часов. После чего производили оценку жизнеспособности опухолевых клеток при помощи МТТ-теста. Результаты анализа представлены в таблице 12.

**Таблица 12** – Результаты анализа чувствительности исходных клеток рака предстательной железы и их сублиний к цитотоксическому действию паклитаксела

<b>PC3</b>			
	контроль	IFN $\gamma$	MDP
(IC50 $\pm$ SEM), нМ	(3,59 $\pm$ 0,52)	(3,42 $\pm$ 0,09)	(4,35 $\pm$ 0,46)
P <sub>adj</sub>		0,49	0,94
<b>Du145</b>			
	контроль	IFN $\gamma$	MDP
(IC50 $\pm$ SEM), нМ	(2,70 $\pm$ 0,77)	(3,82 $\pm$ 0,01)	(2,99 $\pm$ 0,73)
P <sub>adj</sub>		0,95	0,41

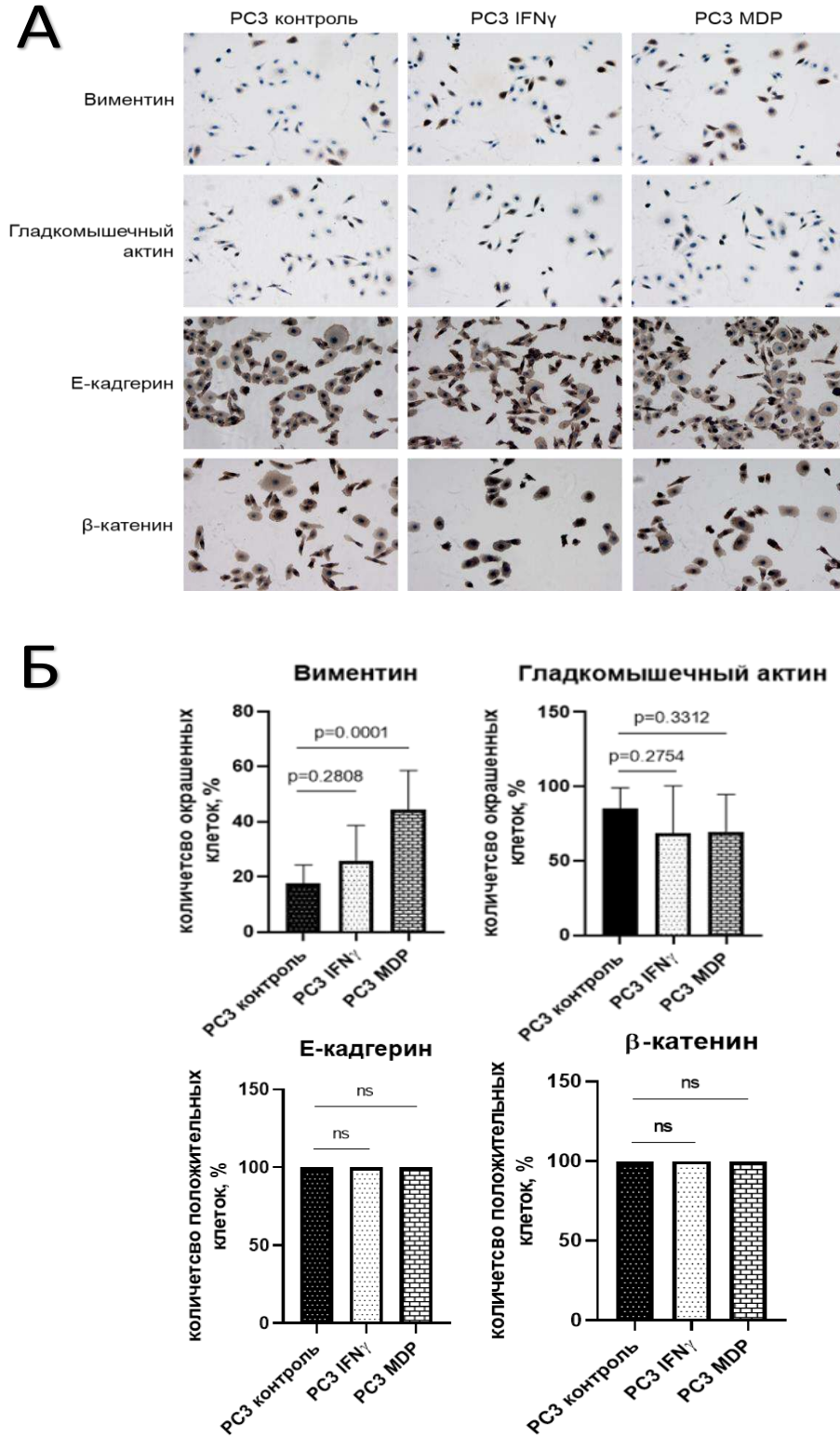
В ходе проведенного исследования статистически достоверной разницы чувствительности к паклитакселу между исходными клеточными линиями и их сублиниями, устойчивыми к цитотоксическому действию макрофагов, выявлено не было.

### 3.7.7 Результаты иммуноцитохимического анализа

В результате эпителиально-мезенхимального перехода опухолевые клетки приобретают прометастатический потенциал, что способствует формированию более злокачественного фенотипа. Снижение экспрессии E-кадгерина, ядерная транслокация  $\beta$ -катенина, экспрессия



виментина и гладкомышечного активна являются признаками ЭМП [176,177]. Для оценки экспрессии данных белков был проведен иммуноцитохимический анализ исследуемых клеток РС3, Du145 и их устойчивых сублиний, полученных в результате контактного сокультивирования с макрофагами. Клетки фиксировали раствором PFA и окрашивали при помощи антител к E-кадгерину, гладкомышечному актину, виментину и бета-катенину. Для анализа результатов определяли процентное соотношение положительных клеток в 5 полях зрения (100x) для каждой исследуемой сублинии. На рисунке 24 представлены примеры ИЦХ окрашивания и результаты статистической оценки уровня экспрессии исследуемых белков клетками РС3 и их устойчивыми сублиниями.

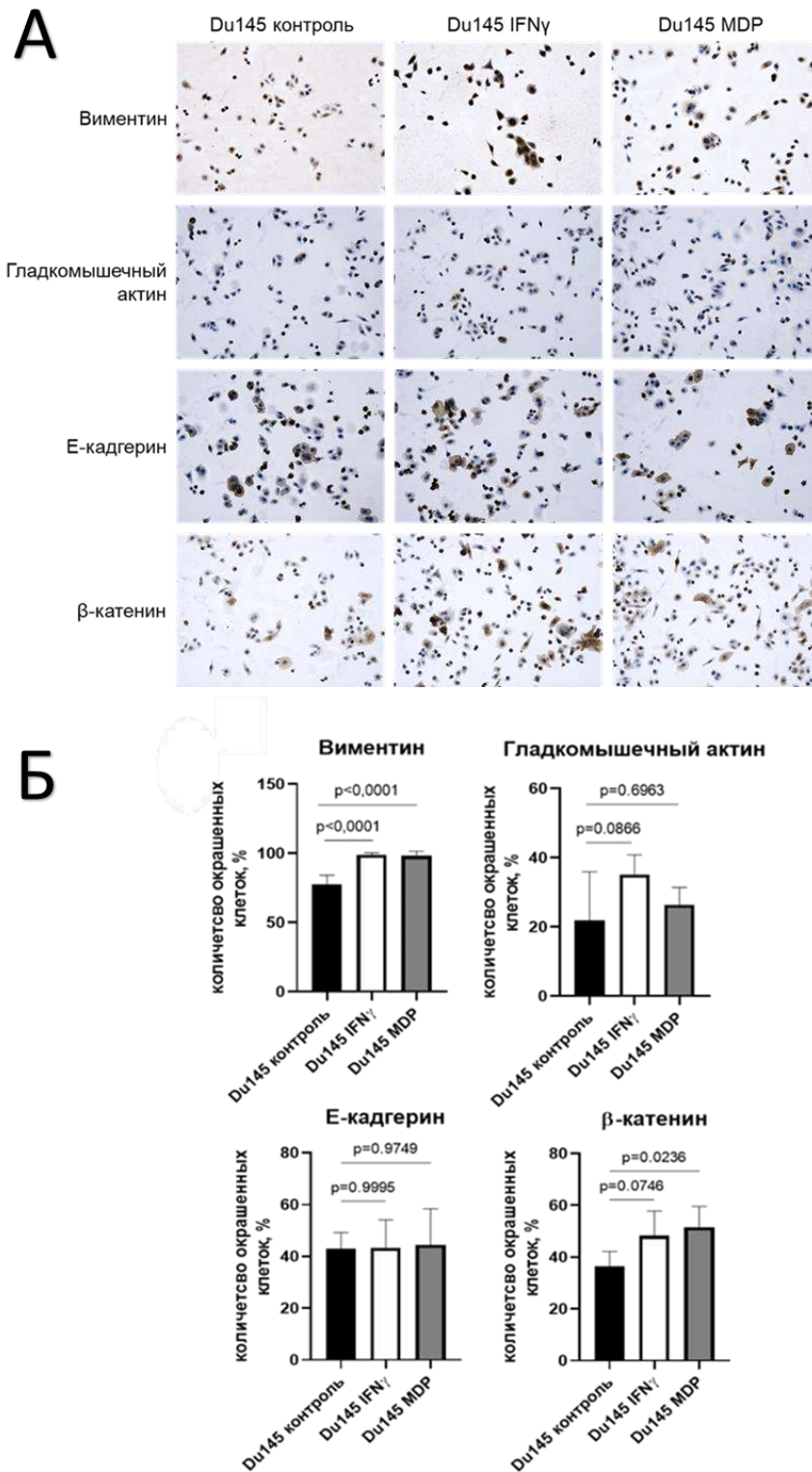


А – Пример ИЦХ окрашивания препаратов клеточной линии PC3 с помощью антител к виментину, гладкомышечному актину, Е-кадгерину и  $\beta$ -катенину. Увеличение - 100х, Б - Результаты статистического анализа экспрессии исследуемых белков

**Рисунок 24** – Оценка экспрессии белков, маркеров эпителиально-мезенхимального перехода, в клеточной линии PC3 и ее устойчивых сублиниях

Сравнительный анализ экспрессии исследуемых белков показал, что в случае РСЗ E-кадгерин и  $\beta$ -катенин экспрессируется в 100% всех исследуемых клеток. С приобретением устойчивости к цитотоксической активности макрофагов наблюдалось повышение уровня экспрессии виментина. Следует отметить, что экспрессия данного белка увеличивалась в устойчивых сублиниях РСЗ с добавлением MDP для активации цитотоксической активности макрофагов. По результатам анализа транскриптома достоверно значимой разницы экспрессии гена, кодирующего виментин, между исходными клетками РСЗ и их устойчивыми сублиниями выявлено не было. Данный факт может свидетельствовать о том, что повышение уровня белка в устойчивых сублиниях опосредовано посттранскрипционными, трансляционными и посттрансляционными механизмами регулирования синтеза белка. Уровень экспрессии гладкомышечного актина статистически достоверно не изменялся. Однако наблюдалась тенденция к снижению его экспрессии с приобретением устойчивости к цитотоксической активности макрофагов сублиниями РСЗ.

В случае клеток линии Du145 наблюдалась несколько иная картина. На рисунке 25 представлены примеры ИЦХ окрашивания и результаты статистической оценки уровня экспрессии исследуемых белков клетками Du145.



А – Пример ИЦХ окрашивания препаратов клеточной линии Du145 с помощью антител к виментину, гладкомышечному актину, Е-кадгерину и  $\beta$ -катенину. Увеличение - 100х;

Б - Результаты статистического анализа экспрессии исследуемых белков

**Рисунок 24** – Оценка экспрессии белков, маркеров эпителиально-мезенхимального перехода, в клеточной линии Du145 и ее устойчивых сублиниях

Как видно, с приобретением устойчивости к цитотоксической активности макрофагов уровень экспрессии виментина достоверно повышался в клетках линии Du145, что сопоставимо с данными, полученными для клеток линии РС3. Уровень экспрессии гладкомышечного актина так же, как и в случае РС3, статистически достоверно не изменялся сублиниями Du145. Однако наблюдалась тенденция к повышению его экспрессии с приобретением устойчивости к цитотоксической активности макрофагов, причем наивысший уровень экспрессии наблюдался в случае использования PMA и IFN $\gamma$  для активации цитотоксической активности макрофагов. При добавлении MDP уровень экспрессии гладкомышечного актина сопоставим с показателями контрольного образца. Так же, как и в случае РС3, не наблюдалось изменение уровня экспрессии е-кадгерина сублиниями Du145 относительно контроля. Стоит отметить, что в отличие от РС3, не все клетки линии Du145 экспрессировали данный белок. Для клеток линии Du145 наблюдалась тенденция к увеличению уровня экспрессии  $\beta$ -катенина с приобретением устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов, в случае добавления в систему MDP данная разница становилась статистически достоверной. Изменение транслокации  $\beta$ -катенина не наблюдалось для всех исследуемых клеток при данном методе анализа.

### **3.8 Исследование фенотипа стромальных иммунокомпетентных клеток рака предстательной железы**

Воздействие на строму опухоли предстательной железы представляет перспективу для расширения терапевтических методов лечения данного заболевания. На сегодняшний день микроокружение рака предстательной железы еще не изучено в полной мере. В рамках настоящей работы было произведено исследование фенотипа опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток методом иммуногистохимии, а именно макрофагов, Т-лимфоцитов, В-клеток и нейтрофилов. Произведен корреляционный анализ их содержания между собой и ассоциация с клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Полученные данные вносят вклад в понимание механизмов взаимодействия опухолевых клеток предстательной железы с иммунными клетками микроокружения и представляют перспективу для разработки иммунотерапевтических стратегий.

Исследование фенотипа стромальных иммунокомпетентных клеток РПЖ проводилось на 30 образцах опухолевой ткани, полученных от пациентов с первично выявленным РПЖ и проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клинический диагноз у всех пациентов был гистологически верифицирован согласно Международной гистологической классификации опухолей (Всемирная организация

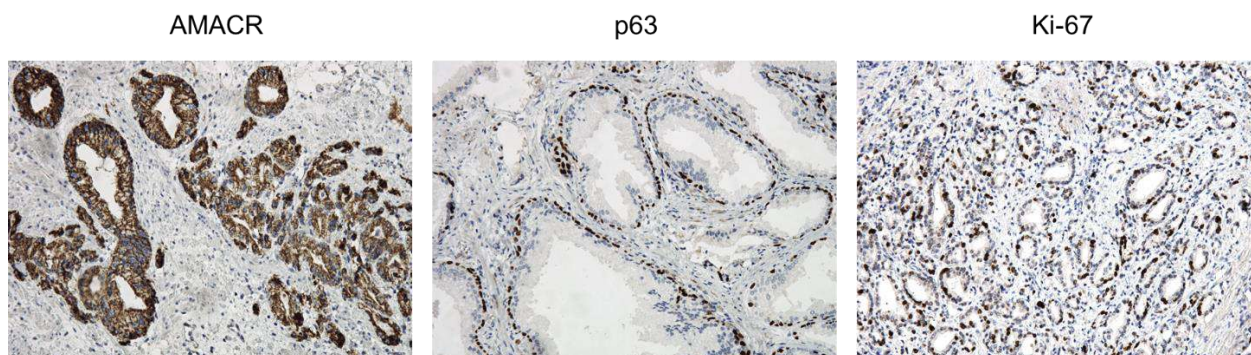
здравоохранения, ВОЗ, 2019) на основании морфологического исследования в патологоанатомическом отделе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Весь исследуемый материал был охарактеризован в соответствии с TNM-классификацией. Все образцы были представлены одним гистотипом опухоли – аденокарцинома. Средний возраст пациентов составил 60 лет. Предоперационный уровень ПСА был в диапазоне от 4,4 нг/мл до 63 нг/мл (среднее значение –16 нг/мл). У всех больных отсутствовали отдаленные метастазы, а пятилетняя выживаемость составила 100%, ввиду чего прогностическая значимость исследуемых маркеров не была определена. В таблице 13 представлены клиничко-морфологические характеристики заболевания.

**Таблица 13** - Общая характеристика исследуемой выборки пациентов раком предстательной железы

<b>Показатель</b>	<b>Число пациентов, абс. (%)</b>
Стадия:	
I-II	15 (50%)
III-IV	15 (50%)
Размер опухоли (T):	
T1-T2	16 (53%)
T3-T4	14 (47%)
Наличие регионарных метастазов (N):	
N0	27 (90%)
N+	3 (10%)
Степень дифференцировки по шкале Глисона:	
5-6	24 (80%)
7	6 (20%)
Возраст, лет:	
≤ 60	13 (43%)
> 60	17 (57%)
ПСА, нг/мл:	
≤ 16	22 (73%)
> 16	8 (27%)

### 3.8.1 Экспрессия AMACR, p63 и Ki-67

В рамках исследования было проведено комплексное иммуноморфологическое исследование препаратов РПЖ с оценкой экспрессии AMACR (P504S, альфа-метилацил-КоА рацемаза), белка p63 и ядерного антигена пролиферативной активности Ki-67 (Рисунок 26).



**Рисунок 26** – Пример ИГХ окрашивания образцов рака предстательной железы с помощью антител к AMACR, p63 и Ki-67. Увеличение - 100x

AMACR является стандартным маркером аденокарциномы предстательной железы, позволяющем с высокой чувствительностью и специфичностью дифференцировать рак предстательной железы от других патологических процессов, а также более точно определить стадию заболевания.

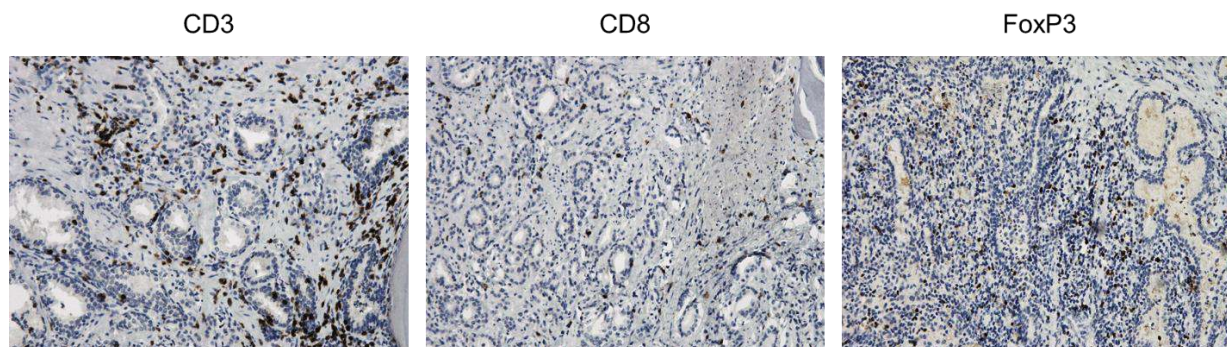
Ген p63 принадлежит к семейству p53 опухолевых супрессорных генов. Белок p63 экспрессируется в ядрах базальных клеток эпителия предстательной железы и позволяет дифференцировать доброкачественную опухоль от аденокарциномы ПЖ.

Ядерный антиген Ki-67 является широко используемым в патологоанатомической практике маркером пролиферации. Известно, что повышенная скорость деления является одной из основных характеристик злокачественных клеток. Пролиферативная активность является одной из наиболее важных характеристик фенотипа опухоли, в значительной степени определяющая скорость прогрессирования и исход заболевания. Чем выше скорость пролиферации, тем агрессивнее опухоль.

### 3.8.2 Экспрессия маркеров Т-клеток в строме опухоли рака предстательной железы

В ходе исследования был проведен иммуногистохимический анализ Т-клеток различных фенотипов: цитотоксических (CD8) и регуляторных (FoxP3) (Рисунок 27). CD3 использовался в качестве общего Т-клеточного маркера. Присутствие FoxP3+ Т-клеток в строме опухоли было

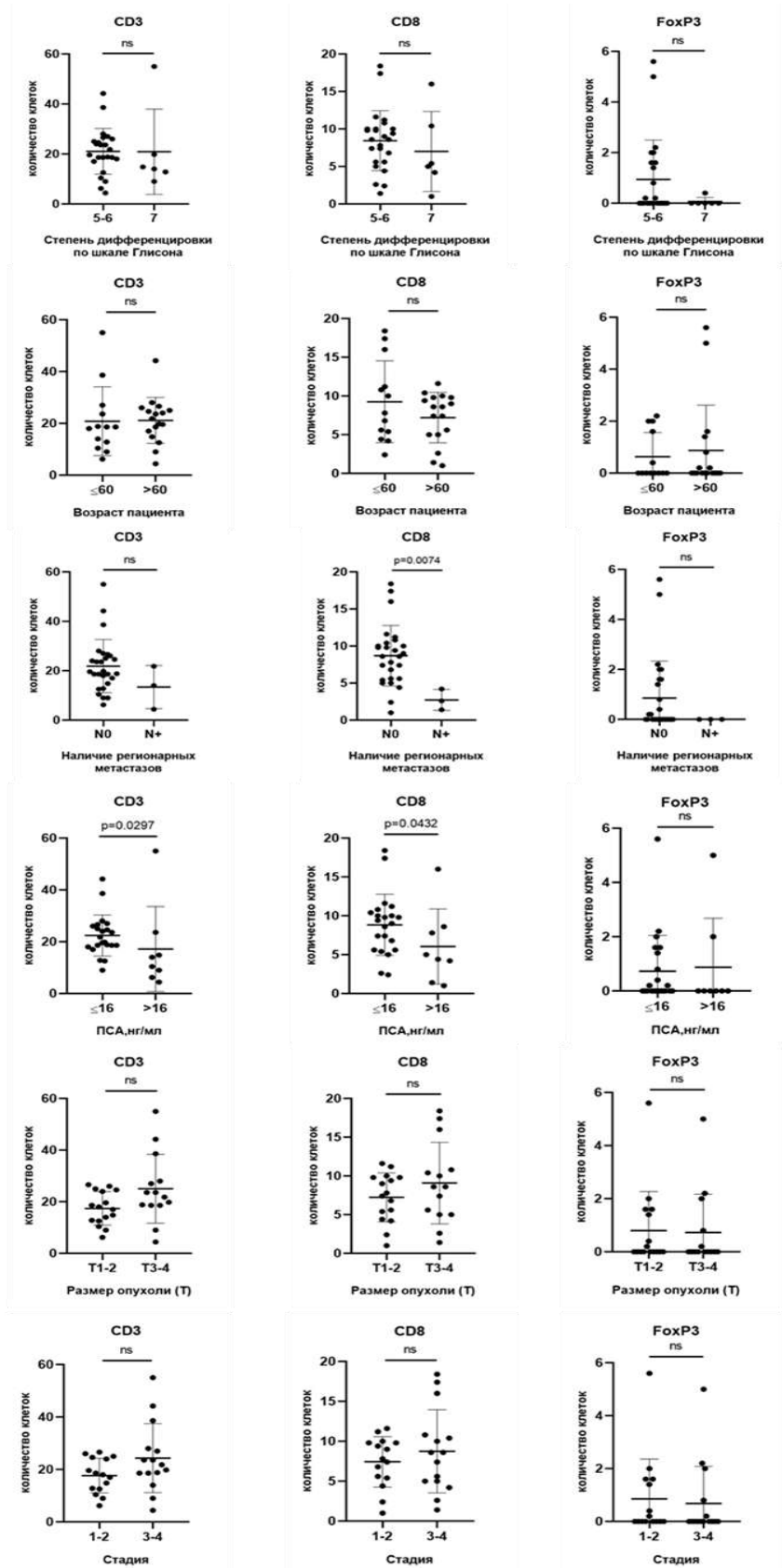
обнаружено в 40% исследуемых образцов, в то время как CD3+ и CD8+ Т-лимфоциты содержались в 100% случаев.



**Рисунок 27** – Пример ИГХ окрашивания образцов рака предстательной железы с помощью антител к CD3, CD8 и FoxP3. Увеличение - 100х

Затем была проанализирована ассоциация экспрессии данных маркеров с клинимоρφологическими характеристиками заболевания (возраст пациентов, степень дифференцировки опухоли, наличие регионарных метастазов, уровень ПСА в крови, размер опухоли и стадия заболевания). Результаты представлены на рисунке 28.





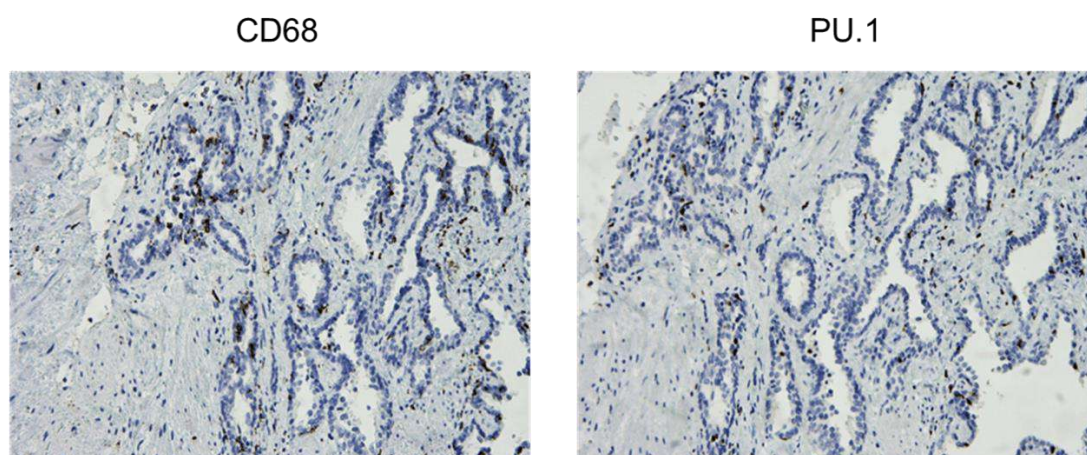
Диаграммы отражают средние значения, а планки погрешностей на них – стандартные отклонения (SD). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ , ns – нет статистически достоверной разности.

**Рисунок 28** - Анализ ассоциации экспрессии маркеров Т-клеток в ткани рака предстательной железы с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

В результате анализа было выявлено, что общее число ассоциированных с опухолью Т-клеток (CD3+), в частности провоспалительного фенотипа (CD8+) выше у пациентов с более низким содержанием ПСА в крови ( $p=0.0297$ ,  $p=0.0432$ , соответственно). Повышенное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов в строме опухоли было характерно для пациентов с отсутствием регионарных метастазов ( $p=0.0074$ ), однако ввиду малой выборки эти данные требуют дальнейшей валидации. Взаимосвязи количества регуляторных Т-клеток (FoxP3+) с клинико-морфологическими характеристиками заболевания выявлено не было.

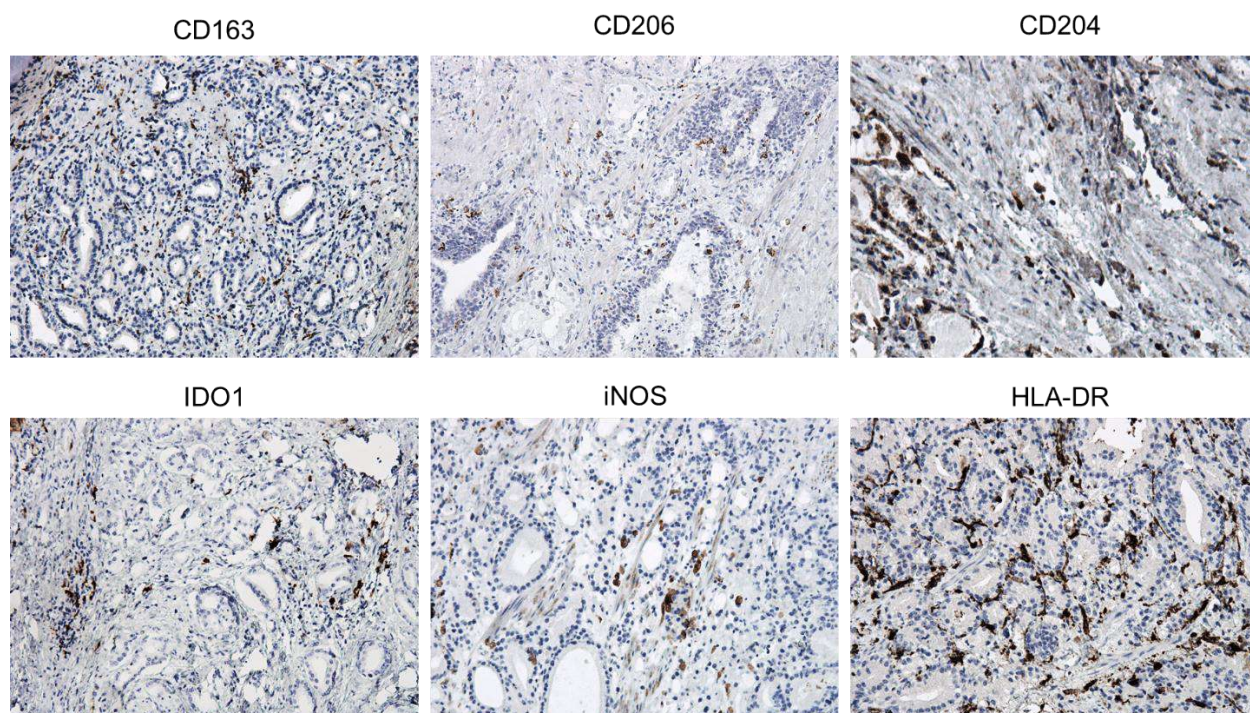
### 3.8.3 Экспрессия маркеров макрофагов в строме опухоли рака предстательной железы

В рамках исследования был проведен анализ общего содержания макрофагов, ассоциированных с опухолью, а также их различных фенотипов в ткани РПЖ. Рутинно используемый маркер CD68 был выбран для идентификации макрофагов в строме опухоли. Также была предпринята попытка применения транскрипционного фактора PU.1 в качестве маркера МАО. Результаты проведенного исследования подтверждают возможность применения PU.1 для выявления макрофагов и в строме РПЖ (Рисунок 29).



**Рисунок 29** - Иммуногистохимический анализ экспрессии CD68 и PU.1 в образцах рака предстательной железы. Увеличение - 100x

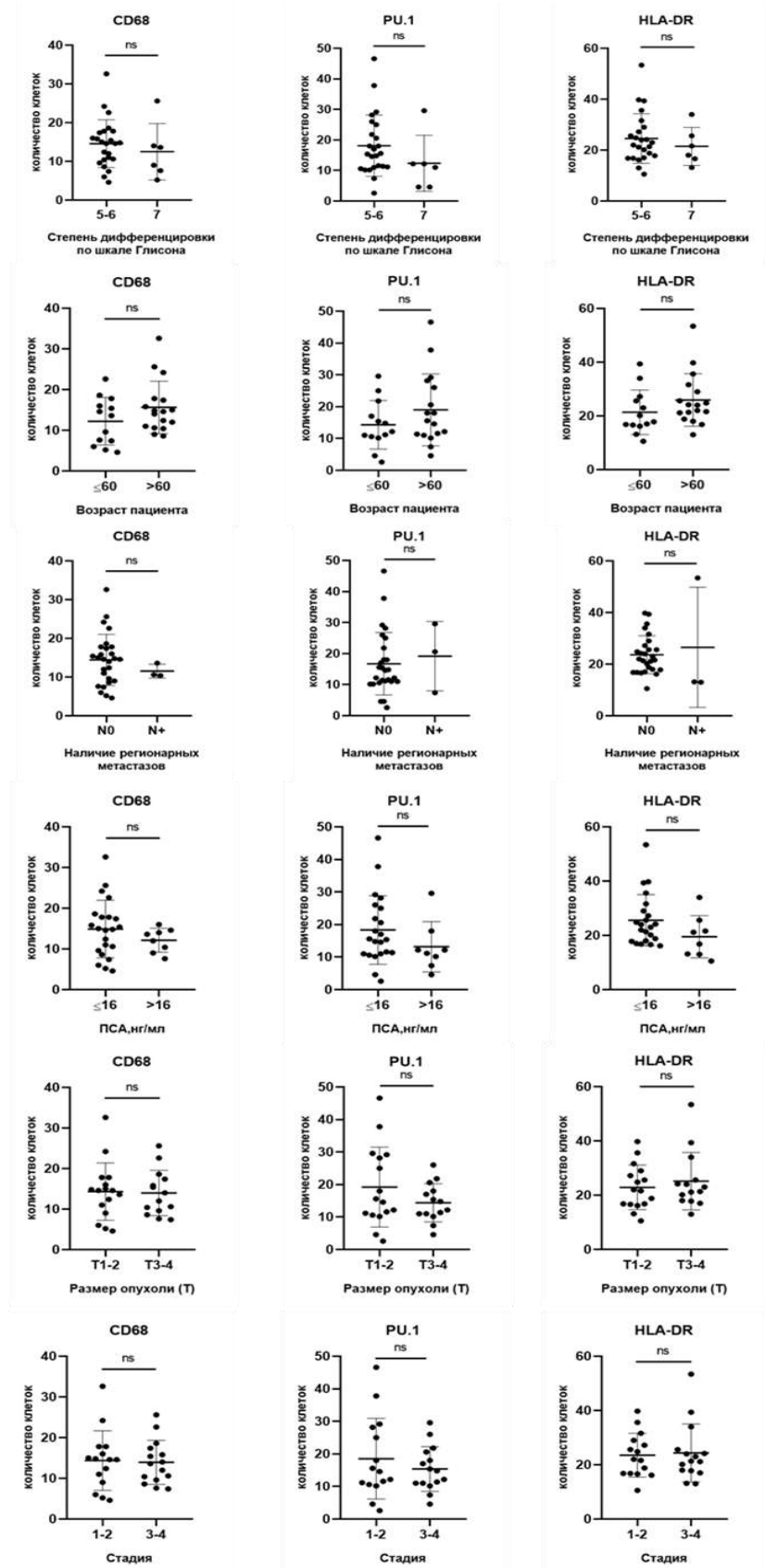
Для идентификации макрофагов фенотипа M1 было выполнено иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к HLA-DR, iNOS и IDO1. В случае M2 макрофагов использовались маркеры CD163, CD206 и CD204. Примеры иммуногистохимических окрашиваний представлены на рисунке 30.



**Рисунок 30** – Пример ИГХ окрашивания образцов ткани рака предстательной железы с помощью антител к CD163, CD204, CD206, IDO1, iNOS и HLA-DR. Увеличение - 100x

Результаты исследования показали, что CD68+, PU.1+, CD163+, CD204+ и HLA-DR+ клетки в строме опухоли обнаруживаются во всех исследуемых образцах. CD206-положительные клетки присутствовали в 73% исследуемых образцов. Экспрессия iNOS была обнаружена лишь в 3% случаев, что являлось недостаточным для проведения статистического анализа. IDO1-положительные клетки были обнаружены в 93% исследуемых образцов. Интересно, что экспрессия данного белка была обнаружена как в стромальных, так и в опухолевых клетках. На основании полученных данных было принято решение о том, что анализ экспрессии IDO1 необходимо проводить для стромальных и опухолевых клеток отдельно. Результаты проведенного исследования описаны в отдельной главе.

На следующем этапе был произведен анализ ассоциации содержания CD68, PU.1 и HLA-DR – положительных клеток в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания (Рисунок 31).



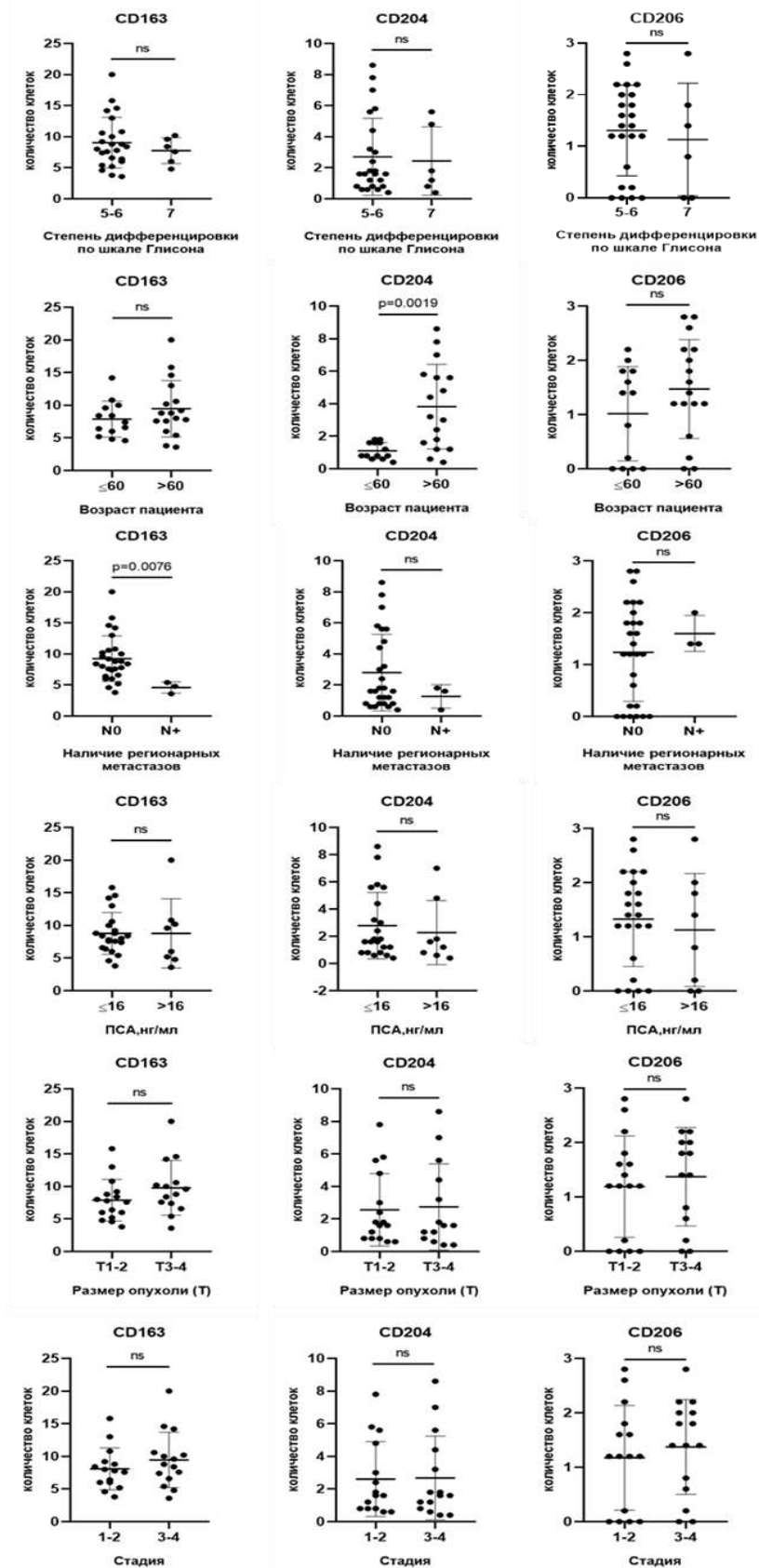
Диаграммы отражают средние значения, а планки погрешностей на них – стандартные отклонения (SD). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ , ns – нет статистически достоверной разности.

**Рисунок 28** - Анализ ассоциации экспрессии маркеров CD68, PU.1 и HLA-DR в ткани рака предстательной железы с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

В результате проведенного исследования взаимосвязи количества CD68+, PU.1+ и HLA-DR+ клеток в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания выявлено не было.

Также была произведена оценка ассоциации содержания CD163, CD204, CD206 – положительных клеток стромы с клинико-морфологическими характеристиками заболевания (Рисунок 32).

В результате исследования было выявлено, что более высокий уровень содержания CD204+ макрофагов в строме опухоли РПЖ характерен для пациентов старшего возраста ( $p=0.0019$ ). Повышенное содержание CD163+ макрофагов в строме было ассоциировано с отсутствием регионарных метастазов ( $p=0.0076$ ), однако ввиду малой выборки данная тенденция требует дальнейшей валидации. В результате проведенного исследования взаимосвязи количества CD206+ макрофагов в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания выявлено не было.

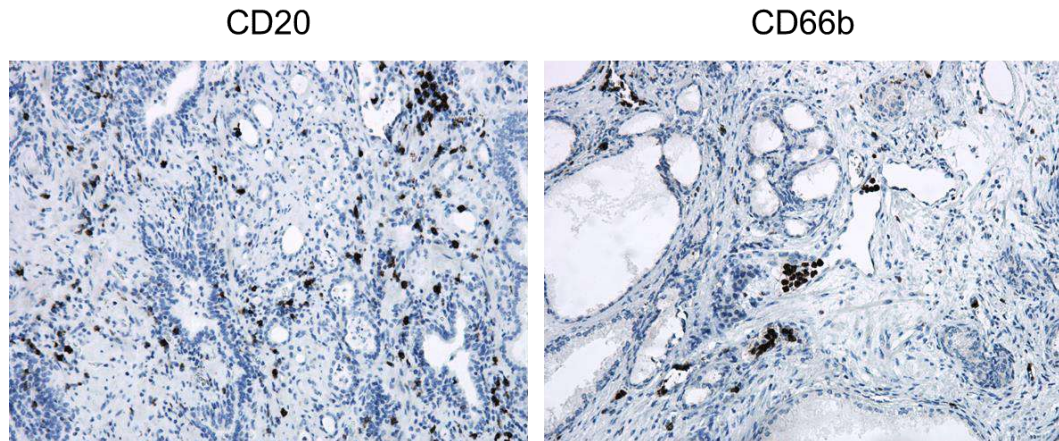


Диаграммы отражают средние значения, а планки погрешностей на них – стандартные отклонения (SD). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ , ns – нет статистически достоверной разности.

**Рисунок 28** - Анализ ассоциации экспрессии маркеров CD163, CD204 и CD206 в ткани рака предстательной железы с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

### 3.8.4 Экспрессия маркеров нейтрофилов и В-лимфоцитов в ткани рака предстательной железы

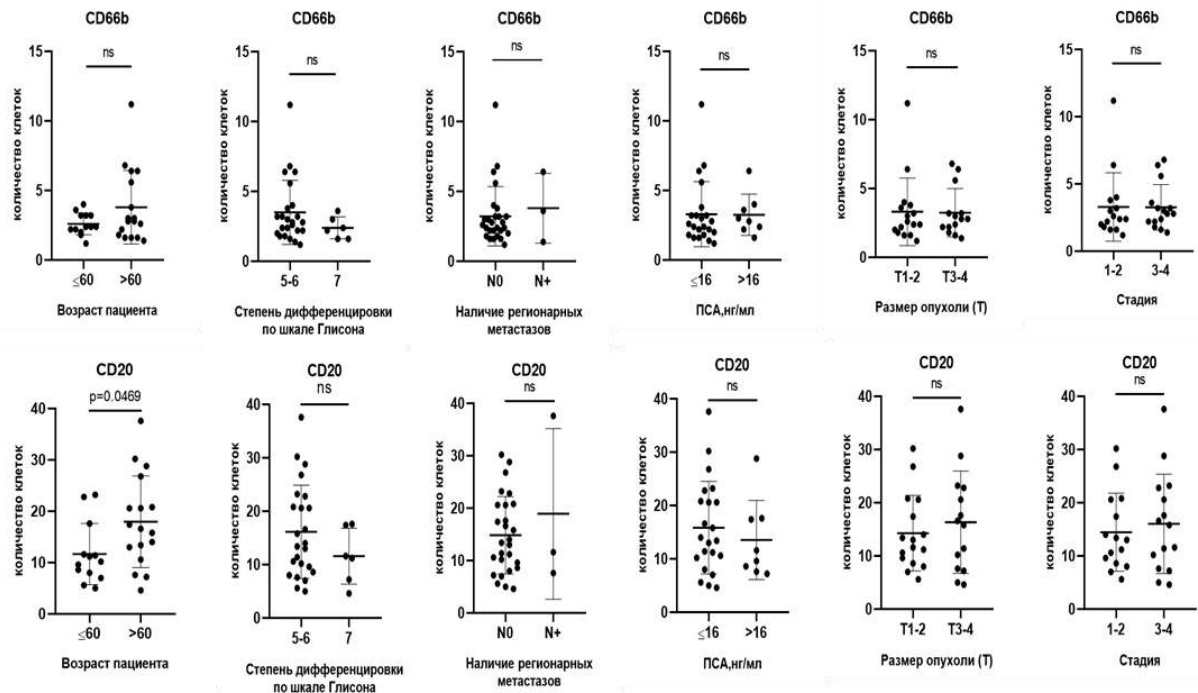
Для идентификации нейтрофилов и В-лимфоцитов в ткани РПЖ были использованы антитела к белкам CD66b и CD20, соответственно. Экспрессия данных маркеров была обнаружена в 100% исследуемых случаях РПЖ (Рисунок 33).



**Рисунок 33** – Пример ИГХ окрашивания образцов ткани рака предстательной железы с помощью антител к CD66b и CD20. Увеличение - 100x

Далее был произведен анализ ассоциации содержания CD66b и CD20 – положительных клеток в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания (Рисунок 34).

Анализ ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками заболевания не выявил значимых результатов для экспрессии CD66b. Более высокий уровень CD20+ лимфоцитов наблюдался у пациентов старшего возраста ( $p=0.0469$ ).



Диаграммы отражают средние значения, а планки погрешностей на них – стандартные отклонения (SD). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ , ns – нет статистически достоверной разности.

**Рисунок 34** – Анализ ассоциации экспрессии маркеров CD66b и CD20 в строме рака предстательной железы с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

### 3.8.5 Экспрессия PD-L1, IDO1 и TNF в опухоли предстательной железы

Риск развития онкологических заболеваний часто ассоциирован с хроническим воспалением. Одним из первых цитокинов, описанных как важнейший медиатор опухолевых клеток, был провоспалительный TNF (фактор некроза опухоли альфа). Это ключевой хемокин воспаления, он участвует в активации клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе. Было обнаружено, что уровень экспрессии TNF повышен при разных типах злокачественных опухолей [178]. Известно, что тканевая экспрессия TNF характерна для карциномы предстательной железы, слабо выражена в случаях доброкачественной гиперплазии и отсутствует в клетках нормального эпителия [179]. В случае РПЖ повышенную экспрессию TNF опухолевыми клетками часто ассоциируют с худшим прогнозом и клинико-морфологическими характеристиками заболевания [180, 181].

Экспрессия IDO1 также активируется в ответ на воспаление, а его растворимая форма обладает иммуносупрессивной функцией, подавляя провоспалительную активность эффекторных Т-клеток. Накоплено большое количество данных, свидетельствующих о роли IDO1 в течение онкологических заболеваний. Экспрессия данного белка наблюдается как в



стромальных, так и в опухолевых клетках [182]. В контексте РПЖ IDO1 рассматривается как специфичный маркер заболевания [183, 184].

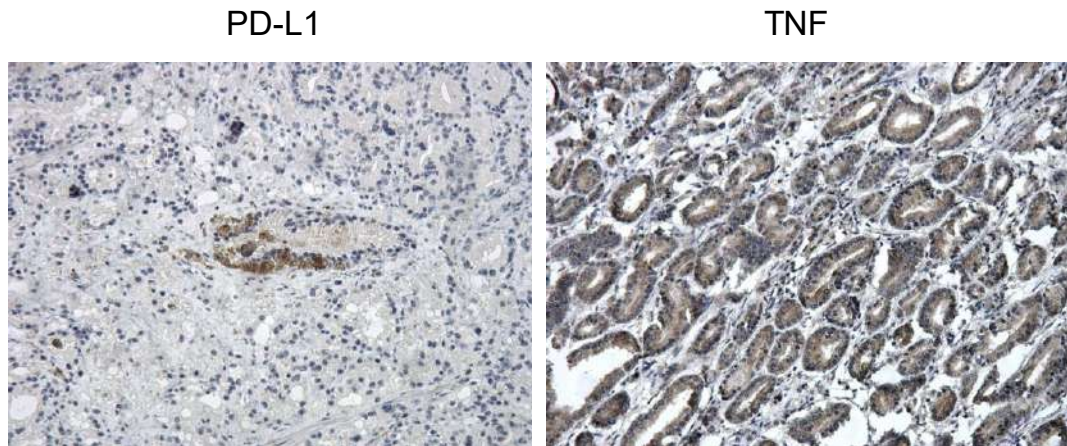
В рамках исследования был проведен иммуногистохимический анализ экспрессии IDO1 и TNF в ткани РПЖ. Также проведен анализ экспрессии известной контрольной точки иммунитета PD-L1 в исследованных образцах.

В результате проведенного анализа было выявлено, что у 13% пациентов IDO1 был экспрессирован только в опухолевых клетках. В 30% образцов IDO1+ клетки были локализованы в строме. Одновременная экспрессия IDO1 как в злокачественных, так и в клетках микроокружения наблюдалась в 50% случаев.

В случае PD-L1 экспрессия данного белка была выявлена в 70% исследуемых образцов, причем у 17% пациентов PD-L1 был экспрессирован только в опухолевых клетках. В 27% образцов экспрессия PD-L1 наблюдалась исключительно в строме. Одновременное присутствие PD-L1+ клеток как в строме, так и в опухоли также наблюдалась в 27% случаев.

Экспрессия TNF была обнаружена в 67% исследуемых образцов. Стоит отметить, что данный белок присутствовал преимущественно в опухолевых клетках.

Примеры ИГХ окрашиваний ткани РПЖ с антителами к PD-L1 и TNF представлены на рисунке 35.



**Рисунок 35** - Пример ИГХ окрашивания образцов ткани рака предстательной железы с помощью антител к PD-L1 и TNF. Увеличение - 100x

Анализ ассоциации уровня экспрессии PD-L1 и IDO1 с клинико-морфологическими характеристиками заболевания был проведен отдельно для экспрессии данного белка стромальными и опухолевыми клетками. Экспрессия TNF изучалась в контексте опухолевых клеток. Для решения поставленной задачи все исследуемые образцы были разделены на две группы с наличием или отсутствием экспрессии исследуемых белков (Таблица 14).

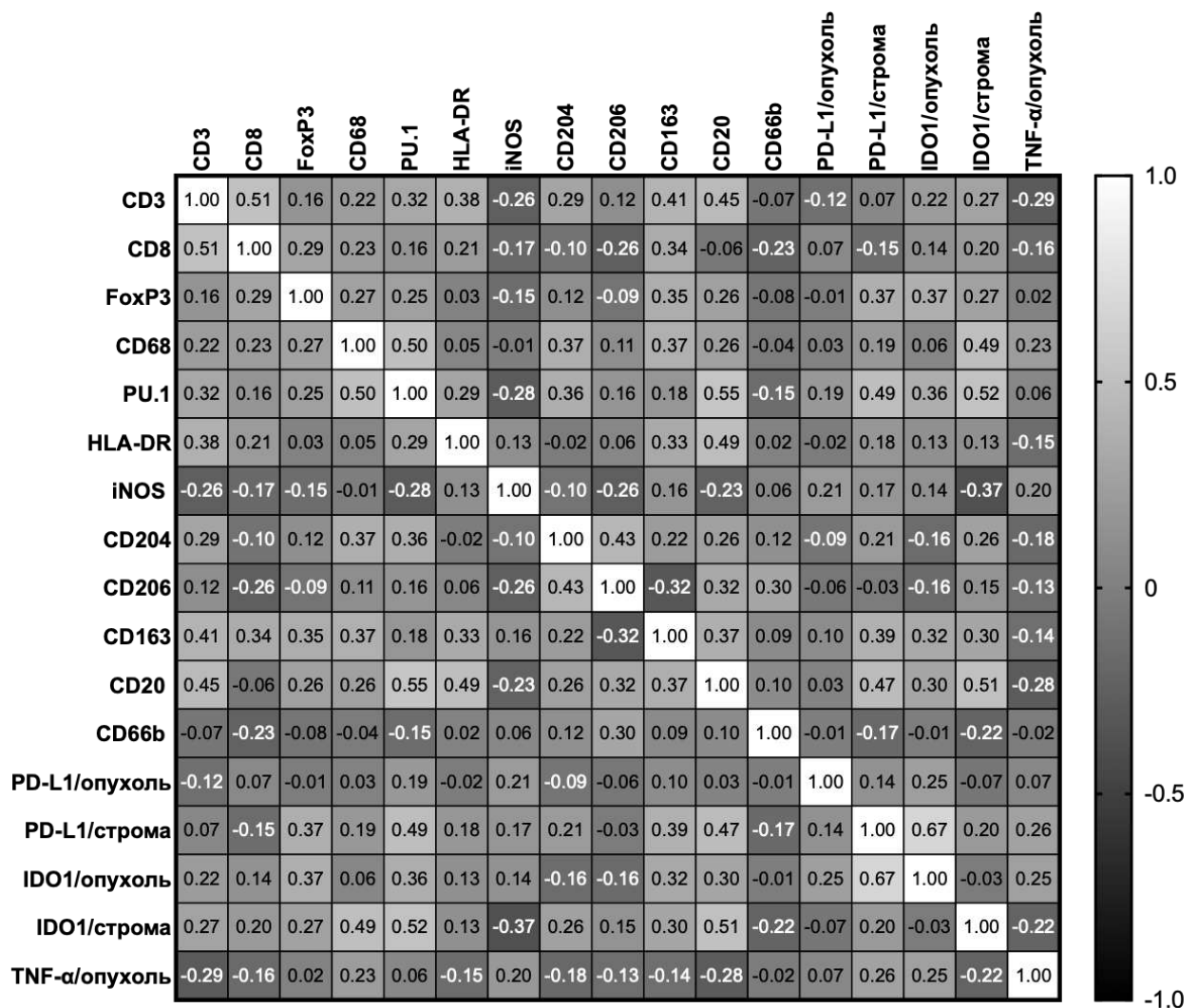
**Таблица 14** – Анализ ассоциации экспрессии PD-L1, IDO1 и TNF в ткани рака предстательной железы с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

	PD-L1 строма			PD-L1 опухоль			IDO1 строма			IDO1 опухоль			TNF опухоль		
	PD-L1+	PD-L1-	p	PD-L1+	PD-L1-	p	IDO1+	IDO1-	p	IDO1+	IDO1-	p	TNF+	TNF-	p
Стадия															
I-II	7	8	0.715	6	10	0.713	12	3	>0.999	7	7	0.257	10	5	>0.999
III-IV	9	6		7	7		12	3		12	4		10	5	
Наличие метастазов															
N-															
N+	14	13	>0.999	12	15	>0.999	22	5	0.502	17	10	>0.999	17	10	0.532
	2	1		1	2		2	1		2	1		3	0	
Размер опухоли															
T1-T2	8	8	0.730	5	10	0.462	13	3	>0.999	9	7	0.466	11	5	>0.999
T3-T4	8	6		8	7		11	3		10	4		9	5	
Возраст															
≤60	5	8	0.269	7	6	0.460	10	3	>0.999	8	5	>0.999	10	3	0.440
>60	11	6		6	11		14	3		11	6		10	7	
ПСА, нг/мл															
≤16	12	10	>0,999	8	14	0.242	14	8	>0.999	7	4	>0.999	12	7	>0,999
>16	4	4		5	3		5	3		12	7		4	2	
Глисон															
5-6	12	12	0.657	10	14	>0.999	20	4	0.571	15	9	>0.999	15	9	0.633
7	4	2		3	3		4	2		4	2		5	1	

В результате проведенного исследования значимых ассоциаций экспрессии PD-L1, IDO1 и TNF с клинико-морфологическими характеристиками заболевания выявлено не было.

### 3.8.6 Корреляционный анализ клеточного состава стромы опухолей рака предстательной железы

На следующем этапе был проведен корреляционный анализ исследуемых маркеров. Исследование проводили методом вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (Рисунок 36).



**Рисунок 36** - Корреляционный анализ содержания различных маркеров в тканях опухолей предстательной железы

Проведенный корреляционный анализ показал тесную взаимосвязь содержания клеток различного фенотипа в строме опухолей предстательной железы. Выявлено, что содержание

PU.1+ клеток прямо коррелирует с содержанием CD68+ макрофагов ( $r = 0,500$ ;  $p = 0,005$ ), что также свидетельствует о возможности применения PU.1 для выявления макрофагов в строме РПЖ. Содержание общего количества макрофагов (CD68+ и PU.1+) ассоциировалось с уровнем экспрессии IDO1 в строме ( $p = 0,006$ ,  $r = 0,491$  и  $p = 0,004$ ,  $r = 0,515$  соответственно), на основании чего можно предположить, что макрофаги опосредуют продукцию IDO1 опухолевыми клетками. Следует отметить, что в случае PU.1+ клеток наблюдалась прямая корреляция их количества с числом IDO1+ опухолевых клеток ( $p = 0,048$ ,  $r = 0,364$ ). Предположительно, макрофаги также опосредуют продукцию белка PD-L1: число PU.1+ клеток прямо коррелировало с содержанием PD-L1+ клеток в строме ( $p = 0,006$ ,  $r = 0,487$ ). Интересно, что общее содержание PU.1+ макрофагов в строме было ассоциировано с количеством В-лимфоцитов (CD20+) ( $p = 0,002$ ,  $r = 0,553$ ).

Содержание цитотоксических M1 макрофагов (HLA-DR+) в строме опухоли было ассоциировано с количеством CD20+ клеток ( $p = 0,007$ ,  $r = 0,486$ ) и общим содержанием Т-лимфоцитов (CD3+) ( $p = 0,036$ ,  $r = 0,384$ ). Количество M2-MAO (CD163+) также прямо коррелировало с числом цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) ( $p = 0,004$ ,  $r = 0,506$ ), CD20+ клеток ( $p = 0,046$ ,  $r = 0,367$ ) и PD-L1+ клеток в строме ( $p = 0,035$ ,  $r = 0,386$ ).

Общее содержание Т-клеток (CD3+) в строме РПЖ ассоциировано с содержанием В-клеток (CD20+) ( $p = 0,012$ ,  $r = 0,454$ ) и M2-MAO (CD163+) ( $p = 0,024$ ,  $r = 0,412$ ). Интересно, что количество регуляторных Т-лимфоцитов в строме (FoxP3+) прямо коррелирует с числом PD-L1+ клеток в строме и IDO1+ опухолевых клеток ( $p = 0,047$ ,  $r = 0,366$  и  $p = 0,044$ ,  $r = 0,370$ , соответственно).

Содержание В-лимфоцитов в строме (CD20+) было ассоциировано с экспрессией PD-L1 стромальными клетками и IDO1 опухолевыми клетками ( $p = 0,009$ ,  $r = 0,471$  и  $p = 0,004$ ,  $r = 0,510$ , соответственно). Интересно, что число PD-L1+ клеток в строме прямо коррелировало с количеством клеток микроокружения, экспрессирующих IDO1 ( $p = 0,029$ ,  $r = 0,201$ ).

На основании полученных данных можно предположить, что иммунные клетки регуляторного фенотипа, а именно M2-MAO и FoxP3+ Т-лимфоциты, а также В-лимфоциты опосредуют повышение экспрессии иммуносупрессорного белка PD-L1 в строме РПЖ. Вероятно, число опухолевых клеток предстательной железы, экспрессирующих белок IDO1, способствующий прогрессии заболевания, растет с увеличением числа регуляторных Т-лимфоцитов и В-клеток в строме. Можно полагать, что в случае РПЖ IDO1, наряду с PD-L1, может выступать контрольной точкой иммунитета, способствующей формированию проопухолевого микроокружения.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наиболее распространенными типами солидных опухолей остаются рак молочной и предстательной желез, легких, колоректальный рак, а также немеланомные раки кожи. В структуре онкологических заболеваний рак предстательной железы занимает 2-е место по заболеваемости и 6-е место по смертности среди мужского населения. Развитие современных методов диагностики, лекарственной терапии, а также усовершенствование методов хирургического лечения привели к увеличению продолжительности жизни пациентов. Достижения в области иммунотерапии произвели революцию в лечении онкологических заболеваний. Так, например, продолжительность жизни пациентов с распространенным раком легкого на фоне иммунотерапии увеличилась до 50% в сравнении со стандартной химиотерапией [185]. Успех применения данных препаратов отчасти определил важность микроокружения опухоли в прогрессии заболевания.

### 4.1 Получение опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов *in vitro*

На сегодняшний день роль стромы в прогрессии опухолей подтверждена многочисленными исследованиями. Макрофаги составляют преобладающую популяцию опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток [35]. Известно, что на поздних стадиях заболевания большинство ассоциированных с опухолью макрофагов представлено иммуносупрессорным фенотипом M2, способствующим прогрессии заболевания [34]. Повышенная плотность данных клеток в строме опухоли также ассоциирована с неблагоприятным прогнозом пациентов с различными типами солидных опухолей [36]. Цитотоксические макрофаги фенотипа M1, напротив, обладают противоопухолевой активностью, ввиду чего тактика реполяризации M2-МАО привлекла внимание многих исследователей. Однако методы иммунотерапии, направленные на МАО, не получили широкого распространения и применяются только совместно с другими видами терапии [35].

На сегодняшний день роль M1 макрофагов в опухолевой прогрессии неоднозначна. Имеются данные о том, что цитотоксические макрофаги в строме опухоли способствуют ее пролиферации и метастазированию [186-188]. Более того, известно, что длительное воздействие продуцируемых M1 макрофагами цитотоксических агентов (таких как активные формы кислорода), может привести к повреждению ДНК нормальной клетки, накоплению мутаций и, как следствие, злокачественной трансформации и инициации опухоли [189]. Этим, частично, опосредована взаимосвязь хронического воспаления и канцерогенеза, впервые

замеченная Рудольфом Вирховом еще в 1863 году. Данная концепция получила широкое распространение на протяжении последнего десятилетия. Неудачи реполяризации макрофагов в строме опухоли в качестве терапевтической тактики, наряду с накоплением данных о проопухолевой активности цитотоксических макрофагов, послужили формированием нашей гипотезы о том, что под действием цитотоксической активности макрофагов формируется и отбирается фенотип более злокачественных опухолевых клеток.

Для проверки данной гипотезы нами была разработана клеточная модель для изучения механизмов взаимодействия цитотоксических макрофагов с опухолевыми клетками. С целью стандартизации результатов исследования для получения макрофагоподобных клеток были использованы клеточные линии миелоидного происхождения ТНР-1, HL-60, U937 и K562. Данные клетки широко используются в иммунологических исследованиях в качестве альтернативы мононуклеарных клеток периферической крови человека (МПК) [190, 191]. На основании собственных экспериментальных и литературных данных было заключено, что клеточная линия ТНР-1 является приоритетной для данного вида исследований [191]. Один эксперимент включал три последовательных раунда сокультивирования опухолевых клеток с макрофагами. Один раунд составлял 5 суток совместного культивирования макрофагов и опухолевых клеток и 3 дня отдыха. Каждое последующее сокультивирование проводилось с вновь дифференцированными клетками ТНР-1, что позволяет создать условия поддержания провоспалительного фенотипа макрофагов в системе. Такая модель сокультивирования была разработана впервые и позволяет как изучать механизмы цитотоксической активности макрофагов, так и получать клоны опухолевых клеток, устойчивые к данному воздействию. По сравнению с уже описанными подходами отличительной особенностью разработанной в настоящем исследовании модели является более длительная экспозиция опухолевых клеток к цитотоксическим факторам макрофагов. Данные условия сопоставимы с формируемыми в процессе канцерогенеза, когда на фоне нарушения механизмов регуляции воспаления в опухолевом микроокружении присутствуют цитотоксические макрофаги на всех стадиях формирования злокачественной опухоли. Результаты проведенных исследований показали, что длительная экспозиция к цитотоксическим факторам макрофагов может привести к таким качественным изменениям опухолевых клеток как изменение экспрессии генов, метаболизма, что, в совокупности, может привести к изменению фенотипа опухолевых клеток.

Разработанная экспериментальная модель позволила получить 8 сублиний клеточных линий рака предстательной железы человека: 4 сублиний клеточной линии РС3 и 4 сублиний линии Du145 (Таблица 9). Было установлено, что жизнеспособность полученных сублиний в условиях цитотоксической активности макрофагов значительно увеличилась в сравнении с исходными опухолевыми клетками (Рисунок 5). Данный эффект достиг статистически

достоверной разницы в случае контакт-зависимого механизма взаимодействия опухолевых и эффекторных клеток, что говорит в пользу того, что межклеточные взаимодействия или тесная ко-локализация при сокультивировании макрофагов и опухолевых клеток предполагает принципиальное значение для селекции устойчивых злокачественных клонов.

#### **4.2 Функциональные характеристики опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов**

Было обнаружено, что опухолевые клетки, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, обладают более злокачественным потенциалом в сравнении с исходными клетками. Так, в ходе проведенных *in vitro* и *in vivo* исследований было показано, что клетки рака предстательной железы с приобретением устойчивости к цитотоксической активности макрофагов характеризовались повышенной скоростью пролиферации и образовывали опухоли более злокачественного гистотипа (Рисунок 6-8, 20). В результате иммуногистохимического анализа было выявлено, что опухоли, полученные из клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов, характеризовались снижением уровня PU.1+ клеток воспалительного инфильтрата. Можно предположить, что это опосредовано снижением иммуногенности опухоли, что способствует прогрессии заболевания. Более того, при низком содержании клеток воспалительного инфильтрата применение наиболее распространенных методов иммунотерапии окажется менее эффективным.

Повышенная миграционная и инвазивная способности - еще одна отличительная черта опухолевых клеток с более злокачественными свойствами, которые во многом опосредованы способностью к расщеплению внеклеточного матрикса [192]. Расщепление осуществляется посредством продукции и секреции различных внеклеточных протеаз. Из литературных данных известно, что протеазы, принадлежащие к семейству матриксных металлопротеиназ (MMPs), играют важную роль в опухолевой прогрессии [193]. В частности, было показано, что MMPs играют критическую роль в прогрессии рака предстательной железы и рассматриваются как перспективные терапевтические мишени для лечения метастатического РПЖ [194]. Результаты настоящего исследования показали, что устойчивые сублинии РС3, полученные в результате контакт-зависимого метода сокультивирования с цитотоксическими макрофагами (РС3 IFN $\gamma$  и РС3 MDP) характеризовались повышенным уровнем экспрессии MMPs на уровне мРНК и белка (Таблица 10, Рисунок 22).

В результате исследования направленной миграции по градиенту ростовых факторов *in vitro* было выявлено, что все исследованные клеточные линии (в т.ч. контрольные) обладают способностью к направленной миграции, и отбор опухолевых клеточных линий, устойчивых к

цитотоксической активности макрофагов, не влияет на миграционные способности опухолевых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Миграция и инвазия являются характерными свойствами мезенхимальных клеток, ввиду чего данные свойства опухолевых клеток во многом определены эпителиально-мезенхимальным переходом. Одним из широко известных маркеров мезенхимальных клеток является белок промежуточных филаментов виментин [176]. Повышенная экспрессия данного белка наблюдается в различных типах солидных опухолей и ассоциирована с плохим прогнозом [195-198]. В ходе настоящего исследования было выявлено, что повышение экспрессии виментина является универсальной характеристикой устойчивых опухолевых клеток. Известно, что киназа Akt1 защищает данный белок от протеолиза за счет его фосфорилирования по серину 39, ввиду чего активация пути PI3K/Akt может опосредовать наблюдаемое повышение экспрессии виментина [199]. Виментин, в свою очередь, способствует стабилизации активированной формы Erk [200]. В устойчивых опухолевых клетках не наблюдалось потери экспрессии E-кадгерина, известного маркера ЭМП. Известно, что миграция опухолевых клеток может протекать без потери E-кадгерина, в то время как высокая экспрессия виментина способствует наиболее эффективному методу миграции [201].

Адаптация клетки к внешним факторам происходит путем изменения активности генов с последующим синтезом белков, необходимых для повышения жизнеспособности. Работа генов регулируется транскрипционными факторами, расположенными в ядре. Передача внешнего сигнала от поверхности клетки к ядру осуществляется посредством последовательного фосфорилирования определенных белков. Одни из них - протеинкиназы, активируемые митогенами (МАРК). Их последовательное фосфорилирование приводит к транскрипции генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции основных клеточных функций, таких как рост, пролиферация и дифференцировка клеток. В клетках млекопитающих насчитывается несколько каскадов МАРК. В зависимости от природы внешнего стимула активируются определённые из них, изменяя транскрипцию разных наборов генов. ERK1/2 и p38 являются одними из основных МАРК. Осуществление различных пролиферативных сигналов осуществляется, в основном, киназами ERK1/2. Активация p38 происходит под действием некоторых цитокинов и факторов стресса и может приводить как к остановке клеточного цикла и индукции апоптоза, так и, наоборот, повышению пролиферативной активности. Еще одним семейством белков, участвующих в передаче внешних сигналов к ядру с последующим изменением активности генов, являются ферменты с обобщенным названием фосфатидилинозитид-3-киназа (PI3K), катализирующих фосфорилирование фосфолипида фосфатидилинозитола с образованием его трифосфата (PIP3). Данная молекула вовлечена в реализацию митогенных, мотогенных и антиапоптотических стимулов. Протеинкиназа В (Akt/PKB) является одним из основных эффекторов PIP3. В результате фосфорилирования Akt/PKB происходит активация каскада



реакций, ведущих к подавлению апоптоза и повышению скорости пролиферации. Более того, известно о взаимосвязи виментина и каскада PI3K/Akt [202]. А именно, активация пути PI3K/Akt ведет к увеличению уровня виментина в клетке благодаря его фосфорилированию [202]. Известно также о том, что виментин участвует в активации пути PI3K/Akt, а также способствует стабилизации активированной формы Erk [203, 204].

PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1), молекула, подавляющая иммунный ответ. Данный белок экспрессируется на поверхности иммунных и злокачественных клеток. Связывание PD-L1 с PD-1 на поверхности активированных Т-клеток ведет к угнетению их цитотоксической активности и запуску программируемой клеточной гибели. Известно, что повышенная экспрессия PD-L1 способствует уходу опухоли от иммунологического надзора и является маркером неблагоприятного прогноза для большинства солидных опухолей. Известно, что активация каскадов MAPK и пути PI3K/Akt способствует повышению экспрессии PD-L1 [205]. В частности, было показано, что в результате подавления экспрессии ERK1/2 и ингибирования Akt наблюдалось падение экспрессии PD-L1 [206]. В ходе настоящего исследования изменения экспрессии белка PD-L1 в опухолевых клетках с приобретением устойчивости к цитотоксической активности макрофагов выявлено не было (Рисунок 23).

Результаты настоящего исследования показали, что повышение активности MAPK p38 было характерно для всех полученных сублиний опухолевых клеток предстательной железы, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов. Из литературных данных известно, что активация p38 происходит в ответ на действие стресс-факторов ( $\gamma$ - и УФ-излучение, оксидативный и осмотический стресс и др.) и некоторых цитокинов (интерлейкинов, интерферонов, TNF и др.) [207, 208]. Активная форма p38 приводит к повышению экспрессии транскрипционных факторов (c-Jun, ATF2 и др.), функционирование которых в зависимости от клеточного контекста может приводить как к остановке клеточного цикла и индукции апоптоза, так и, напротив, к повышению скорости пролиферации [207, 208]. В контексте злокачественных клеток активность p38 часто ассоциируют с плохим прогнозом и более злокачественным фенотипом опухоли, выраженным в повышенной инвазивной активности и химиорезистентности [209, 210]. Роль MAPK p38 в активации пролиферации была описана и для нормальных фибробластов [211]. Было показано, что TNF может повышать скорость пролиферации клеток рака молочной железы путем активации NFkB и киназы p38 [212]. Известно также, что TNF способствует метастазированию РПЖ в лимфоузлы посредством фосфорилирования MAPK Erk и p38 [213]. В многочисленных исследованиях было показано, что известный опухолевый маркер муцин 16 (MUC16 или CA125) способствует пролиферации, миграции и инвазии клеток опухолей разных нозологий, в частности, посредством

фосфорилирования киназы p38 [214-216]. Результаты настоящего исследования показали, что уровень экспрессии *MUC16* достоверно повышался в опухолевых клетках, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов, в сравнении с исходными клетками РПЖ (Log2Fold change = 4,15) (Таблица 10). Фактор некроза опухоли активирует и прометастатические факторы, в частности MMPs. В норме данный эффект опосредует ремоделирование ткани, однако в случае злокачественно трансформированных клеток было показано, что данный эффект повышает метастатический потенциал [217, 218].

Фактор некроза опухоли является основным медиатором воспаления, и известно, что его роль в онкоиммунологии носит двойственный характер. Данный цитокин может обладать как иммуностимулирующим, так и иммуносупрессорным действием. TNF рассматривается в качестве перспективной терапевтической мишени для лечения некоторых форм онкологических заболеваний [219]. На животных моделях было показано, что подавление TNF способствует резистентности к химически индуцированному канцерогенезу [92, 220, 221]. Проопухоловая роль TNF была показана для злокачественных опухолей различных локализаций [222]. Известно, что механизм данного действия опосредован активацией MAPK и PI3K/Akt каскадов, транскрипционных факторов NFκB, c-JUN, AP-1 [222]. На модели рака предстательной железы было показано, что лишь правильно подобранная концентрация TNF в комплексе с йодом способствует апоптозу опухолевых клеток [223]. TNF относится к суперсемейству цитокинов TNF/TNFR и является трансмембранным белком II типа. TNF представляет собой белок, состоящий из 157 аминокислот, который синтезируется в виде мембраносвязанного белка (mTNF) [224]. В результате действия металлопротеиназы ADAM17 (от англ. a disintegrin and metalloproteinase domain 17) происходит отщепление мембранного фрагмента синтезированного фактора некроза опухоли и перевод этого цитокина в растворимое состояние (sTNF) [224]. TNF взаимодействует с двумя специфическими рецепторами, присутствующими на поверхности почти каждого типа клеток: TNFR1 (TNFRSF1A) и TNFR2 (TNFRSF1B) [224]. И, если сигнальные пути, опосредованные взаимодействием sTNF с TNFR1 изучены достаточно хорошо, роль TNFR2 и mTNF остается предметом дискуссий. По некоторым данным mTNF повышает эффективность взаимодействия TNF с рецепторами 1 и 2 типа [225]. Более того, присутствие mTNF необходимо для активации альтернативного пути NFκB, что может способствовать подавлению апоптоза, повышению скорости пролиферации и инвазии опухолевых клеток, а также ангиогенезу [226]. Данные, полученные в ходе настоящего исследования, также свидетельствуют в пользу необходимости присутствия как растворимой, так и мембрансвязанной формы TNF для формирования более злокачественного фенотипа опухолевых клеток (Рисунок 5). Можно предположить, что TNF является одним из факторов цитотоксичности макрофагов, опосредующих устойчивость клеток рака предстательной железы

к данному воздействию. Основным источником TNF в микроокружении опухоли являются M1 макрофаги и повышенное содержание данного цитокина как в строме солидных опухолей различных локализаций, так и в опухоли является фактором неблагоприятного прогноза пациентов [227]. Число макрофагов в строме опухоли также может быть использовано в качестве прогностического маркера для некоторых форм онкологических заболеваний. Необходимо отметить, что прогностическая значимость может зависеть от локализации МАО. Так, например, высокое количество макрофагов внутри опухоли (так называемые интратуморальные МАО) ассоциировано с менее благоприятным прогнозом у пациентов с различными типами опухолей, включая рак молочной железы, легких, яичников и толстой кишки [228, 229]. Макрофаги, локализованные в строме опухоли, окружающих кровеносных сосудах и лимфатических узлах, напротив, могут быть связаны с более благоприятным прогнозом [228]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что тесная ко-локализация макрофагов и опухолевых клеток способствует формированию более злокачественного фенотипа последних. Однако литературные данные в контексте прогностической значимости M1 макрофагов для пациентов с различными типами онкологических заболеваний противоречивы [230]. Одной из причин различий в характере ассоциаций МАО с клинико-морфологическими параметрами заболевания и прогнозом пациентов является то, что разные исследователи рассматривают МАО различных локализаций [230]. Это подчеркивает важность учета локализации МАО в дополнение к их количеству в качестве прогностического маркера для опухолей различных локализаций.

#### **4.3 Характеристики транскриптома опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов**

Проведенный анализ транскриптома выявил активацию различных генов, потенциально вовлеченных в формирование устойчивости опухолевых клеток к цитотоксическому действию клеток врожденного иммунитета, а также формированию более злокачественного фенотипа. Так, во всех устойчивых сублиниях наблюдалось снижение экспрессии генов-опухолевых супрессоров *SPINK5* и *HPGD*. Белок *SPINK5* относится к самому крупному семейству ингибиторов сериновых протеаз SPINK (serine protease inhibitor Kazal type), участвующих в прогрессии ЗНО. Из литературных данных известно, что низкая экспрессия *SPINK5* повышает скорость пролиферации и способствует уходу от апоптоза опухолевых клеток путем регуляции сигнального пути Wnt/ $\beta$ -catenin, подавления экспрессии Bcl-2 и *KLK5* и активации пути Hippo [231, 232]. Было показано, что подавление экспрессии *SPINK5* способствует метастазированию рака предстательной железы [233]. Сообщалось, что цитотоксическая активность макрофагов

подавляет экспрессию *HPGD* и кодируемого им белка 15-PGDH, что способствует повышению скорости пролиферации и ассоциировано с худшим прогнозом и клинико-морфологическими характеристиками заболевания в случае рака поджелудочной железы [234]. Опухоль-супрессорная функция *HPGD* была описана и для других форм онкологических заболеваний. Было показано, что потеря экспрессии этого гена повышает скорость пролиферации, способности к миграции и инвазии клеток рака желудка и шейки матки, что, отчасти, опосредовано активацией Akt и STAT3 [235, 236].

Все полученные в данной работе сублинии опухолевых клеток, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, характеризовались понижением уровня экспрессии генов *PALMD*, *IGFBP3* и *ALDH3A1*. Из литературных данных известно, что *PALMD* и *IGFBP3* являются проапоптотическими генами, регулируемые онкосупрессором p53, и нарушение их функций ведет к прогрессии опухоли, в частности рака предстательной железы [237, 238]. Механизмы проопухолевого действия потери *PALMD* и *IGFBP3* не изучены в полной мере. Известно, что подавление *PALMD* способствует метастазированию, отчасти обусловленным повышенной экспрессией MMPs [239]. Из литературных данных известно, что повышение экспрессии *ALDH3A1* связано с метастазированием и фенотипом стволовых клеток опухолей подкожных ксенографтов, полученных из клеток Du145 и PC3 [240]. Схожие данные получены и в случае рака легкого [241]. Противоположные данные были получены для плоскоклеточного рака полости рта [242]. Было показано, что низкая экспрессия *ALDH3A1* выступала диагностическим маркером, а также фактором неблагоприятного прогноза [242]. Более того, повышение экспрессии *ALDH3A1* подавляло ЭМП по пути IL-6/STAT3 с понижением уровня экспрессии виментина и MMP3 [242].

Результаты настоящего исследования показали, что повышение экспрессии гена *FLOT1* также было общей характеристикой устойчивых сублиний (как в случае клеток PC3, так и Du145). Из литературных данных известно, что *FLOT1* является маркером плохого прогноза для многих форм ЗНО, способствует повышению скорости пролиферации, миграционной и инвазивной активности злокачественных клеток [243-245]. Было показано, что механизм данного воздействия опосредован активностью киназы Akt, усилением транскрипционной активности FOXO3a, активацией ингибитора циклинзависимой киназы p21 (Cip1) и p27 (Kip1) и подавлением циклина D1 [246]. Активация *FLOT1* в тканях метастатического РПЖ человека и клетках РПЖ с высоким метастатическим потенциалом положительно коррелировало со стабилизацией Snail и индукцией Snail-опосредованных генов ЭМП [247]. Индукция ЭМП, опосредованная *FLOT1*, во многом осуществляется через сигнальный путь Erk/Akt [248]. Было показано, что *FLOT1* может взаимодействовать с такими участниками сигнального пути MAPK, как c-Raf, MEK, KSR1 и ERK [249].

Отдельно необходимо отметить, что под цитотоксическим действием макрофагов в опухолевых клетках изменяется экспрессия ряда длинных некодирующих РНК (днРНК). Данные молекулы все чаще рассматривают в качестве возможных мишеней для диагностики и лечения онкологических заболеваний [250]. Показано как проонкогенное, так и онкосупрессорное действие днРНК, однако их роль в механизмах формирования устойчивости опухоли к цитотоксическому действию клеток врожденного иммунитета остается мало изученной [251-253]. В результате настоящего исследования было показано, что снижение экспрессии днРНК *OLMALINC* и *SHG18* является универсальным свойством опухолевых клеток Du145 и PC3, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов.

Длинная некодирующая РНК *OLMALINC* относится к межгенным РНК и ассоциирована с созреванием олигодендроцитов (Oligodendrocyte Maturation-Associated Long Intergenic Non-Coding RNA). Роль *OLMALINC* в инициации и прогрессии опухоли практически не описана в научной литературе. В результате биоинформатического анализа было показано, что экспрессия *OLMALINC* входит в прогностическую модель остеосаркомы. Помимо этого, высокий уровень экспрессии *OLMALINC* был ассоциирован с плотностью тучных клеток, а также CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в опухолевой строме остеосаркомы [254]. На сегодняшний день роль *OLMALINC* в контексте рака предстательной железы не описана в научной литературе. Более того, роль *OLMALINC* практически не описана в контексте онкологических заболеваний в целом, что безусловно требует продолжения исследований.

Роль днРНК *SHG18* (small nucleolar RNA host gene 18) в онкогенезе так же еще не определена. Имеющиеся данные фрагментарны и противоречивы. Так, было показано, что в случае немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) повышенная экспрессия *SNHG18* способствует повышению скорости пролиферации, миграции и инвазии опухоли [255]. Известно также, что *SNHG18* способствует подвижности клеток глиомы за счет нарушения ядерно-цитоплазматического транспорта  $\alpha$ -енолазы [256]. Было показано, что активация *SNHG18* ведет к подавлению белка SEMA5A [257]. В свою очередь высокая экспрессия SEMA5A способствует инвазии, ангиогенезу и метастазированию опухолевых клеток в случае рака поджелудочной железы [258]. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования для изучения функциональной роли SNHG18 и его связи с белком SEMA5A при разных типах злокачественных новообразований.

Таким образом, гипотеза о том, что под действием цитотоксической активности макрофагов производится отбор опухолевых клеток, устойчивых к данному воздействию и обладающих более злокачественным фенотипом, подтвердилась. Схожие данные были получены и другими авторами. Сообщалось, что совместное культивирование клеточных линий рака молочной железы и колоректального рака с цитотоксическими макрофагами,

полученными путем дифференцировки клеток линии ТНР-1, способствовало формированию более злокачественного фенотипа опухолевых клеток [259, 260]. Стоит отметить, что данные исследования были направлены на изучение краткосрочного ответа (время сокультивирования макрофагов с опухолевыми клетками не более 1 суток) и имели узкую направленность. Так, Chung ST et al исследовали влияние IL-1 $\beta$  на экспрессию клетками рака молочной железы остеопротегерина, белка, способствующего прогрессии опухоли. Следует отметить, что в данной работе не производилась направленная дифференцировка ТНР-1 в макрофагоподобные клетки цитотоксического фенотипа, а применялась только М0 дифференцировка при помощи РМА. Однако полученные данные дают основу полагать, что при кратковременном (8 часов) совместном культивировании с клетками рака молочной железы такие макрофаги продуцируют провоспалительный цитокин IL-1 $\beta$ , что может свидетельствовать о формировании цитотоксического фенотипа макрофагов. В исследовании в контексте колоректального рака, клетки ТНР-1 были дифференцированы в макрофагоподобные клетки цитотоксического фенотипа (при помощи LPS). Примечательно, что по результатам проведенного исследования более злокачественный фенотип клеток формировался только в условиях контакт-зависимого метода сокультивирования и был выражен в более высоких уровнях секреции белков, связанных с пролиферацией клеток. Стоит отметить, что данное исследование не было направлено на изучение канцерогенеза, его целью было объяснение иммунопатологий слизистых оболочек. Интересно, что механизмы формирования более злокачественного потенциала как в случае рака молочной железы, так и в случае колоректального рака были опосредованы активностью киназы p38, что согласуется с данными, полученными в ходе настоящей работы. Стоит отметить, что в рамках нашей работы впервые произведен широкий анализ характеристик опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов как *in vitro*, так и *in vivo*, исследована дифференциальная экспрессия генов. Отличительная особенность модели, используемой в настоящей работе, – возможность исследовать роль цитотоксической активности макрофагов при продолжительном воздействии на опухолевые клетки. Схожие методики зарекомендовали себя при исследовании химиорезистентности опухолевых клеток, когда долговременное культивирование опухолевых клеток в присутствии цитостатиков приводит к формированию механизмов устойчивости клеток к данному воздействию [261, 262].

#### **4.4. Особенности фенотипа клеток воспалительного инфильтрата опухолевой стромы рака предстательной железы и их клиническая значимость**

В ходе настоящей работы также было произведено исследование состава опухолеинфильтрирующих иммунных клеток рака предстательной железы. Проведенный анализ показал, что фенотип клеток воспалительного инфильтрата достаточно разнообразен и представлен большинством типов иммунных клеток. Проведенный статистический анализ ассоциации уровня экспрессии маркеров клеток воспалительного инфильтрата различных фенотипов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания выявил ряд особенностей.

Была определена связь уровня простат-специфического антигена (ПСА), основного диагностического маркера РПЖ, с общим количеством Т-лимфоцитов в строме. А именно, у пациентов с более низким уровнем ПСА наблюдается большее число CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в опухолевом инфильтрате. CD8 является маркером цитотоксических Т-клеток, повышенное содержание которых считается маркером благоприятного прогноза для многих форм онкологических заболеваний [263-266]. В современных литературных данных нет единого мнения относительно роли CD8 в качестве прогностического маркера для рака предстательной железы. Большинство литературных данных указывает на то, что высокое содержание данных клеток в строме РПЖ ассоциировано с лучшим прогнозом [267, 268]. Полученные в ходе настоящей работы данные согласуются с литературными данными. Было выявлено, что для пациентов с РПЖ высокое содержание CD8<sup>+</sup> клеток ассоциировано с отсутствием регионарных метастазов и более низким уровнем ПСА. Известно, что FoxP3 занимает центральную роль в дифференцировке и поддержании фенотипа иммуносупрессивных Т-клеток (Tregs). Данный белок широко признан в качестве маркера Tregs. Литературные данные, посвященные роли Tregs в патогенезе РПЖ, противоречивы [269, 270]. Результаты настоящего исследования не выявили ассоциации FoxP3<sup>+</sup> Tregs с клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Однако был выявлен интересный факт прямой корреляции FoxP3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в строме опухоли с числом IDO1<sup>+</sup> опухолевых клеток и PD-L1<sup>+</sup> клеток стромы. Существуют данные о том, что эпителиально-мезенхимальный переход клеток рака предстательной железы сопровождается повышением экспрессии IDO1 в опухолевой ткани, а также формированием иммуносупрессорного фенотипа микроокружения опухоли, характеризующегося повышенным содержанием FoxP3<sup>+</sup> Tregs на фоне снижения числа цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [271].

Для количественной оценки макрофагов в строме наряду с общепринятым маркером CD68 впервые был использован маркер PU.1. Ранее мы показали, что PU.1 может быть

использован в качестве общего макрофагального маркера для рака почки, пищевода и колоректального рака [3, 4, 272-273]. Полученные данные настоящего исследования дают основу полагать, что PU.1 может использоваться и в случае РПЖ. Преимущество использования PU.1 состоит в том, что данный белок является транскрипционным фактором. Ядерная локализация удобна в окрашивание с использованием двух и более маркеров, что представляет большую перспективу, например, в обнаружении M1 макрофагов. Имеются данные о том, что применение двойного окрашивания с использованием транскрипционных факторов может быть наиболее эффективной тактикой обнаружения M1 макрофагов [274].

Из современных литературных данных известно, что для рака предстательной железы инфильтрация макрофагов в строму, особенно M2 фенотипа, способствует развитию и метастазированию опухоли, а также формированию гормононечувствительного фенотипа [127, 275]. Сообщалось, что повышенная плотность CD163+ макрофагов в строме РПЖ ассоциирована с худшим прогнозом [276], экстракапсулярным распространением [127], более высокими показателями шкалы Глисона и частотой метастазирования [277]. Результаты настоящего исследования показывают, что повышенная плотность CD163 ассоциирована с отсутствием метастазов в регионарные лимфоузлы, однако ввиду малой выборки пациентов с метастазами, эти данные подлежат дальнейшей валидации. В ходе проведенного исследования впервые была выявлена значимая ассоциация содержания клеток стромы с возрастом пациентов с РПЖ. А именно, было показано, что строма опухоли пациентов более старшего возраста содержала повышенное количество CD20+ и CD204+ клеток. Аналогичная ассоциация для маркера CD204 была описана в случае глиомы [278]. В совокупности, полученные и литературные данные свидетельствуют о том, что пациенты более старшего возраста с различными формами злокачественных новообразований характеризуются повышенным содержанием иммуносупрессорных клеток в строме [279]. В свою очередь, Tregs, M2-MAO и В-лимфоциты способствуют экспрессии иммуносупрессорных молекул PD-L1 и IDO1 стромальными и опухолевыми клетками. Результаты настоящего исследования и литературные данные дают основу полагать, что в случае РПЖ IDO1 может выступать контрольной точкой иммунитета и представлять перспективу в качестве терапевтической мишени [5, 183, 280-282].

Выявленные в ходе работы особенности и ассоциации содержания различных типов клеток опухолевой стромы с клиническими характеристиками пациентов расширяют представления о прогрессии данного заболевания и помогают в поиске новых терапевтических стратегий.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность злокачественных опухолей уходить из-под иммунологического надзора является одной из основных особенностей, способствующих прогрессии заболевания. Исследования, посвященные изучению механизмов устойчивости злокачественно трансформированных клеток, формируют теоретическую базу для разработки новых терапевтических подходов и являются крайне актуальными.

Данная работа посвящена изучению взаимодействия цитотоксических макрофагов и опухолевых клеток рака предстательной железы. В ходе исследования была создана уникальная клеточная модель для изучения данного взаимодействия. Макрофагоподобные клетки провоспалительного фенотипа были получены из клеток моноцитарного происхождения линии ТНР-1 путем дифференцировки при помощи РМА, IFN $\gamma$  и MDP. В работе использовались гормононечувствительные клетки рака предстательной железы линии РС3 и Du145.

Результаты проведенного исследования говорят о том, что под действием цитотоксической активности макрофагов происходит отбор клонов опухолевых клеток, более устойчивых к данному воздействию. По результатам *in vitro* и *in vivo* исследований данный эффект имеет тенденцию к увеличению с добавлением MDP на этапе дифференцировки ТНР-1.

Результаты *in vivo* экспериментов показали, что опухолевые клетки, устойчивые к цитотоксическому действию макрофагов, характеризуются более злокачественным фенотипом. В сравнении с исходными клетками РС3 и Du145 опухоли, полученные из устойчивых сублиний, характеризовались большим размером, более злокачественным гистотипом и пониженным уровнем инфильтрации PU.1+ иммунных клеток. Вместе с тем, признаков регионарных и отдаленных метастазов в модельных животных выявлено не было.

В результате транскриптомного анализа в устойчивых сублиний был выявлен ряд генов с aberrантной экспрессией, вовлеченных в регуляцию пролиферации, инвазии, миграции и программируемой клеточной гибели. Среди них изменение уровня экспрессии генов *SPINK5*, *HPGD*, *FLOT1*, *IGFBP3*, *PALMD* и *ALDH3A1* были универсальны для клеток линии РС3 и Du145. Литературные данные об участии выявленных генов в прогрессии опухолей фрагментарны и требуются дальнейшие исследования. Кроме того, в результате транскриптомного анализа было выявлено, что цитотоксическая активность макрофагов ведет к активации некоторых длинных некодирующих РНК. Активность двух из них, *OLMALINC* и *SNG18*, одинаково менялась в устойчивых сублиний линии РС3 и Du145. В настоящий момент роль днРНК в опухолевой прогрессии активно исследуется. Данные молекулы представляют интерес в качестве диагностических и терапевтических мишеней в контексте многих заболеваний, в том числе, онкологических.

Проведенные *in vitro* исследования показали, что опухолевые клетки рака предстательной железы, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, обладают повышенной скоростью роста и признаками эпителиально-мезенхимального перехода. Наблюдалось повышение уровня экспрессии виментина и активности киназы p38 в полученных сублиниях. TNF является одним из возможных факторов цитотоксичности макрофагов, влияющим на формирование устойчивости опухолевых клеток.

В ходе работы были исследованы характеристики стромы рака предстательной железы. Полученные данные указывают на то, что основными клетками, экспрессирующими иммуносупрессорные молекулы PD-L1 и IDO1, в строме опухоли в случае РПЖ являются макрофаги, инфильтрирующие опухоль. Повышенная экспрессия IDO1 в опухолевой ткани ассоциирована с иммуносупрессорным фенотипом воспалительного инфильтрата. Тот факт, что число макрофагов прямо коррелирует с количеством Т-лимфоцитов в строме РПЖ, а содержание макрофагов M2 - с цитотоксическими Т-клетками свидетельствует о взаимодействии механизмов врожденного и приобретенного иммунитета в процессе прогрессии рака предстательной железы. Впервые выявлена ассоциация повышенного CD204+ и CD20+ иммунных клеток с более старшим возрастом пациентов с РПЖ.

Полученные данные расширяют наше понимание механизмов ухода опухоли из-под иммунологического надзора, что крайне актуально для улучшения имеющихся и разработки новых иммунотерапевтических препаратов для лечения онкологических заболеваний. Выявленные в ходе работы особенности и ассоциации содержания различных типов клеток опухолевой стромы с клиническими характеристиками пациентов расширяют представления о прогрессии данного заболевания и помогают в поиске новых терапевтических стратегий.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые создана и отработана воспроизводимая клеточная модель, позволяющая в условиях *in vitro* изучать механизмы цитотоксической активности макрофагов и отбирать клоны опухолевых клеток, устойчивые к данному воздействию.

2. Впервые получены субклинии клеток рака предстательной железы, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов. Было показано, что данный эффект проявляется только при контакт-зависимом методе сокультивирования опухолевых и эффекторных клеток.

3. Клетки, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, характеризовались более злокачественным фенотипом, образовывали опухоли подкожных ксенографтов большего размера более агрессивного гистотипа.

4. Повышение экспрессии виментина и активной формы киназы p38 было универсальной характеристикой опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов.

5. Было показано, что приобретение устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов влияло на экспрессию ряда генов функциональных белков и длинных некодирующих РНК, потенциально вовлеченных в процесс опухолевой прогрессии.

6. Впервые было показано, что транскрипционный фактор PU.1 может быть использован для идентификации макрофагов в строме рака предстательной железы.

7. Анализ фенотипа клеток воспалительного инфильтрата опухолевой стромы рака предстательной железы и их ассоциация с клинико-морфологическими характеристиками заболевания показал, что с увеличением возраста пациентов с РПЖ количество иммуносупрессорных клеток в строме опухоли растет. Выявлено, что экспрессия иммуносупрессорных молекул IDO1 и PD-L1 в строме РПЖ опосредована M2-MAO и Tregs.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ADAM17 – металлопротеиназа, относящаяся к семейству металлопротеаз ADAM (от англ. a disintegrin and metalloproteinase domain 17).

ADCC – антителозависимая клеточная цитотоксичность (от англ. Antibody-dependent cellular cytotoxicity).

ADCP – антителозависимый клеточный фагоцитоз (от англ. antibody-dependent cellular phagocytosis).

Akt 1 – серин-треонин-протеинкиназа.

ANOVA - дисперсионный анализ (от англ. Analysis of Variance).

ATCC - американская коллекция типовых культур (от англ. American Type Culture Collection).

BRG1 – транскрипционный фактор BRG1 (от англ. Brahma-related gene-1)

CCL – CC-подобный хемокин.

CD – кластер дифференцировки (от англ. cluster of differentiation).

Con A - конканавалин А.

CRs - рецепторы комплемента.

CSF1 - колониестимулирующий фактор-1.

CTLA-4 - цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (от англ. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4).

EMA - Европейское агентство по лекарственным средствам (от англ. European Medicines Agency).

Erk1/2 - киназа регулируемая внеклеточными факторами 1/2

Fc – кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина, концевая часть молекулы иммуноглобулина, которая взаимодействует с Fc-рецептором на поверхности клетки и с некоторыми белками системы комплемента (англ. fragment crystallizable region, Fc region, Fc).

FcR - Fc-рецептор.

FDA - управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (от англ. Food and Drug Administration).

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

Her2 - рецептор эпидермального фактора роста, тип 2/

HLA-DR - рецептор главного комплекса гистосовместимости II класса (от англ. (Human Leukocyte Antigen – DR isotype).

IDO1 - индолеамин-пиррол-2,3-диоксигеназа.

IGF - инсулиноподобный фактор роста (от англ. insulin-like growth factor)

IL – интерлейкины, группа цитокинов, синтезируемая в основном лейкоцитами.

- IFN $\gamma$  – интерферон гамма, продукт Т-лимфоцитов-хелперов I типа.
- iNOS - индуцибельная синтаза оксида азота (от англ. Inducible nitric oxide synthase).
- ITAM - иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (от англ. immunoreceptor tyrosine-based activation motif).
- ITIM - иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (от англ. Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif).
- JNK - c-Jun киназа.
- KDM6B - эпигенетический фактор лизиндеметилязы 6B.
- LPS – липополисахарид, основной компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий.
- mAbs – моноклональные антитела (от англ. monoclonal antibodies)
- МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа (от англ. МАРК - mitogen-activated protein kinase)
- MAF - фактор активации макрофагов (от англ. macrophage-activating factor)
- MIF - фактор ингибирования миграции макрофагов (от англ. macrophage inhibitory factor)
- MCP-1 – моноцитарный хемотаксический фактор-1 (от англ. Monocyte Chemoattractant Protein 1).
- MDP – мурамиловый дипептид, минимальная структурная единица пептидогликана, входящего в состав клеточной стенки как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (от англ.
- MHC – основной комплекс гистосовместимости (от англ. major histocompatibility complex).
- miRNA – микроРНК.
- MMP – матриксная металлопротеаза (от англ. matrix metalloprotease).
- mTOR – мишень рапамицина млекопитающих (от англ. mammalian target of rapamycin).
- NF $\kappa$ B – ядерный фактор энхансера к легкой полипептидной цепи в В-клетках (от англ. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells).
- НК-клетки – натуральные киллеры (от англ. natural killers).
- NGFR - рецептор фактора нейротрофинов (от англ. Nerve Growth Factor Receptor).
- p38 - 38 кДа стресс-активируемая киназа.
- PAMP - патоген-ассоциированные молекулярные структуры (от англ. Pathogen-associated molecular patterns).
- PAF – фактор активации тромбоцитов (от англ. platelet-activating factor).
- PAFR – рецептор фактора активации тромбоцитов (от англ. receptor of platelet-activating factor).
- PBS – фосфорно-солевой буфер
- qRT-PCR – количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (от англ. quantitative real-time polymerase chain reaction).

SMAF - специфический фактор активации макрофагов (от англ. specific macrophage arming factor).

SPINK - ингибитор сериновых протеаз (от англ. serine protease inhibitor Kazal type)

PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели

PD-L1 – лиганд программируемой клеточной гибели

PI3K – фосфо-инозитол-3-киназа (от англ. phospho-inositol-3-kinase).

PMA – форболовый эфир (от англ. phorbol 12-myristate 13-acetate).

RNAseq – секвенирование РНК (от англ. RNA sequencing).

TGF- $\beta$  – трансформирующий ростовой фактор бета (от англ. transforming growth factor beta).

Th – Т-хелперы (от англ. T helper).

TLR – Толл-подобные рецепторы (от англ. Toll-like receptor).

TNF – фактор некроза опухоли, провоспалительный цитокин, продукт активированных моноцитов, макрофагов и лимфоцитов (от англ. tumor necrosis factor).

sTNF – растворимая форма фактора некроза опухоли (от англ. soluble tumor necrosis factor).

mTNF – мембрансвязанная форма фактора некроза опухоли (от англ. membrane-bound tumor necrosis factor).

Treg – Т-супрессоры

VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов (от англ. vascular endothelial growth factor).

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

ЗНО – злокачественные новообразования.

ИГХ – иммуногистохимия.

ИЦХ – иммуноцитохимия.

ИФА – иммуноферментный анализ.

МАО – макрофаги, ассоциированные с опухолью.

МАИР – международное агентство по изучению рака.

ПСА – простат-специфичный антиген.

ПКГ – программируемая клеточная гибель.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

РНК – рибонуклеиновая кислота.

днРНК - длинная некодирующая РНК.

РМЖ – рак молочной железы.

РПЖ – рак предстательной железы.

ФГА – фитогемагглютинин.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Саранцева, К.А. Иммунология: формирование иммунного ответа как ведущего фактора противоопухолевой защиты / К.А. Саранцева, Л.В. Лактионова, Е.В. Реутова, П.А. Черенко, В.В. Бредер // Злокачественные опухоли. – 2016. - Т.2. - С.5-14
2. Таптева, Т.О. Патоморфологическая оценка простаты после радикальной простатэктомии / Т.О. Лаптева // Вестник урологии. - 2019. - Т.7, N1. - С.74-83
3. Ковалева, О.В. Иммуносупрессорные особенности фенотипа стромы опухолей почки различных гистологических типов / О.В. Ковалева, М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, П.А. Подлесная, Р.М. Табиев, Н.В. Кунцевич, Г.Д. Ефремов, Б.Я. Алексеев, А.Н. Грачев // Онкоурология. – 2020. - Т.16, N2. – С.29-35
4. Ковалева, О.В. PU.1 – ядерный маркер иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы при колоректальном раке / О.В. Ковалева, А.Н. Грачев, П.А. Подлесная, М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, Н.Ю. Соколов, З.З. Мамедли, Д.А. Кудлай, Н.Е. Кушлинский // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2021. – Т.10, N2. - С.32–39
5. Подлесная, П.А. Клиническая значимость фенотипа иммунных клеток опухолевой стромы рака предстательной железы / П.А. Подлесная, О.В. Ковалева, М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, А.А. Петренко, В.В. Мочальникова, А.Н. Грачев // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Т.9, N1. – С.8-19
6. Groenendijk, F.H. Estrogen receptor splice variants as a potential source of false-positive estrogen receptor status in breast cancer diagnostics / F.H. Groenendijk, W. Zwart, A. Floore, S. Akbari, R. Bernards // Breast cancer research and treatment. - 2013. - Vol. 140, N 3. - P. 475-84
7. Schumacher, T.N. Neoantigens in cancer immunotherapy / T.N. Schumacher, R.D. Schreiber // Science. - 2015. - Vol.348, N6230. - P.69-74
8. Novak, M.L. Macrophage phenotypes during tissue repair / M.L. Novak, T.J. Koh // Journal of leukocyte biology. - 2013. - Vol.93, N6. - P.875-81
9. Mills, C.D. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm / C.D. Mills, K Kincaid, J.M. Alt, M.J. Heilman, A.M. Hill // Journal of immunology. - 2000. - Vol.164, N12. - P.6166-73
10. Embleton, M. The Macrophage (2nd Edn) / M. Embleton // British Journal of Cancer. – 2003. - Vol. 89. - P.421
11. Ochoa, M.C. Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells / M.C. Ochoa, L. Minute, I. Rodriguez, S. Garasa, E. Perez-Ruiz, S. Inogés, I. Melero, P. Berraondo // Immunology and cell biology. - 2017. - Vol.95, N4. - P.347-55

12. Nagai, M. The equipment for cutting test of the root canal instruments / M. Nagai, M. Kobayashi, A. Muramatsu // Iyo Kizai Kenkyujo hokoku. Reports of the Institute for Medical and Dental Engineering, Tokyo Medical and Dental University. - 1977. - Vol.11. - P.61-6
13. Thomas, D. Altered glycosylation in cancer: A promising target for biomarkers and therapeutics / D. Thomas, A.K. Rathinavel, P. Radhakrishnan // Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer. - 2021. - Vol.1875, N1. - P.188464
14. Sung, H. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray // CA: a cancer journal for clinicians. - 2021. - Vol.71, N3. - P.209-49
15. Rebbeck, T.R. Global patterns of prostate cancer incidence, aggressiveness, and mortality in men of african descent / T.R. Rebbeck, S.S. Devesa, B.L. Chang, C.H. Bunker, I. Cheng, K. Cooney, R. Eeles, P. Fernandez, V.N. Giri, S.M. Gueye, C.A. Haiman, B.E. Henderson, C.F. Heyns, J.J. Hu, S.A. Ingles, W. Isaacs, M. Jalloh, E.M. John, A.S. Kibel, L.R. Kidd, P. Layne, R.J. Leach, C. Neslund-Dudas, M.N. Okobia, E.A. Ostrander, J.Y. Park, A.L. Patrick, C.M. Phelan, C. Ragin, R.A. Roberts, B.A. Rybicki, J.L. Stanford, S. Strom, I.M. Thompson, J. Witte, J. Xu, E. Yeboah, A.W. Hsing, C.M. Zeigler-Johnson // Prostate cancer. - 2013. - Vol.2013. - P.560857
16. Clinton, S.K. The World Cancer Research Fund American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. / S.K. Clinton, E.L. Giovannucci, S.D. Hursting // The Journal of nutrition. - 2020. - Vol. 150, N 4. - P. 663-71
17. Humphrey, P.A. Histopathology of Prostate Cancer / P.A. Humphrey // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. - 2017. - Vol.7, N10. - P.030411
18. Testa, U. Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Prostate Cancer Development: Therapeutic Implications / U. Testa, G. Castelli, E. Pelosi // Medicines. - 2019. - Vol.6, N3. - P.82
19. Welch, H.G. Reconsidering Prostate Cancer Mortality - The Future of PSA Screening / H.G. Welch, P.C. Albertsen // The New England journal of medicine. - 2020. - Vol.382, N16. - P.1557-63
20. Nagpal, K. Development and validation of a deep learning algorithm for improving Gleason scoring of prostate cancer / K. Nagpal, D. Foote, Y. Liu, P.C. Chen, E. Wulczyn, F. Tan, N. Olson, J.L. Smith, A. Mohtashamian, J.H. Wren, G.S. Corrado, R. MacDonald, L.H. Peng, M.B. Amin, A.J. Evans, A.R. Sangoi, C.H. Mermel, J.D. Hipp, M.C. Stumpe // NPJ digital medicine. - 2019. - Vol.2. - P.48
21. Lo, C.H. Multifaceted Roles for Macrophages in Prostate Cancer Skeletal Metastasis / C.H. Lo, C.C. Lynch // Frontiers in endocrinology. - 2018. - Vol.9. - P.247



22. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. - 2011. - Vol.144, N5. - P.646-74
23. Sfanos, K.S. The IFNlammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development / K.S. Sfanos, S. Yegnasubramanian, W.G. Nelson, A.M. De Marzo // *Nature reviews. Urology*. - 2018. - Vol.15, N1. - P.11-24
24. Nair, S.S. The Tumor Microenvironment and Immunotherapy in Prostate and Bladder Cancer / S.S. Nair, R. Weil, Z. Dovey, A. Davis, A.K. Tewari // *The Urologic clinics of North America*. - 2020. - Vol.47, N4S. - P.e17-e54
25. 22. Anderson, N.M. The tumor microenvironment / N.M. Anderson, M.C. Simon // *Current biology: CB*. - 2020. - Vol.30, N16. - P.R921-R925
26. Mittal, D. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape / D. Mittal, M.M. Gubin, R.D. Schreiber, M.J. Smyth // *Current opinion in immunology*. - 2014. - Vol.27. - P.16-25
27. Finn, O.J. Human Tumor Antigens Yesterday, Today, and Tomorrow / O.J. Finn // *Cancer immunology research*. - 2017. - Vol.5, N5. - P.347-54
28. Huang, C.Y. Regulation of CD47 expression in cancer cells / C.Y. Huang, Z.H. Ye, M.Y. Huang, J.J. Lu // *Translational oncology*. - 2020. - Vol.13, N12. - P.100862
29. Petricevic, B. Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients / B. Petricevic, J. Laengle, J. Singer, M. Sachet, J. Fazekas, G. Steger, R. Bartsch, E. Jensen-Jarolim, M. Bergmann // *Journal of translational medicine*. - 2013. - Vol.11. - P.307
30. Sobhani, N. CTLA-4 in Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy / N. Sobhani, D.R. Tardiel-Cyril, A. Davtyan, D. Generali, R. Roudi, Y. Li // *Cancers*. - 2021. - Vol.13, N6. - P.1440
31. Sánchez-Reyes, K. Cervical cancer cell supernatants induce a phenotypic switch from U937-derived macrophage-activated M1 state into M2-like suppressor phenotype with change in Toll-like receptor profile / K. Sánchez-Reyes, A. Bravo-Cuellar, G. Hernández-Flores, J.M. Lerma-Díaz, L.F. Jave-Suárez, P. Gómez-Lomelí, R. de Celis, A. Aguilar-Lemarroy, J.R. Domínguez-Rodríguez, P.C. Ortiz-Lazareno // *BioMed research international*. - 2014. - Vol.2014. - P.683068
32. Yin, T. Apatinib Suppressed Macrophage-Mediated Malignant Behavior of Hepatocellular Carcinoma Cells via Modulation of VEGFR2/STAT3/PD-L1 Signaling / T. Yin, C.B. Fu, D.D. Wu, L. Nie, H. Chen, Y. Wang // *Molekuliarnaia biologiiia*. - 2023. - Vol.57, N4. - P.706-8
33. Brigati, C. Tumors and IFNlammatory IFNIltrates: friends or foes / C. Brigati, D.M. Noonan, A. Albin, R. Benelli // *Clinical & experimental metastasis*. - 2002. - Vol.19, N3. - P.247-58

34. Bingle, L. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies / L. Bingle, N.J. Brown, C.E. Lewis // *The Journal of pathology*. - 2002. - Vol.196, N3. - P.254-65
35. Cassetta, L. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nature reviews* / L. Cassetta, J.W. Pollard // *Drug discovery*. - 2018. - Vol.17, N12. - P.887-904
36. Zhang, Q.W. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature / Q.W. Zhang, L. Liu, C.Y. Gong, H.S. Shi, Y.H. Zeng, X.Z. Wang, Y.W. Zhao, Y.Q. Wei // *PloS one*. - 2012. - Vol.7, N12. - P.e50946
37. Epelman, S. Origin and functions of tissue macrophages / S. Epelman, K.J. Lavine, G.J. Randolph // *Immunity*. - 2014. - Vol.41, N1. - P.21-35
38. Molawi, K. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age / K. Molawi, Y. Wolf, P.K. Kandalla, J. Favret, N. Hagemeyer, K. Frenzel, A.R. Pinto, K. Klapproth, S. Henri, B. Malissen, H.R. Rodewald, N.A. Rosenthal, M. Bajenoff, M. Prinz, S. Jung, M.H. Sieweke // *The Journal of experimental medicine*. - 2014. - Vol.211, N11. - P.2151-8
39. Xu, S. Tissue-Resident Macrophages in Fungal Infections / S. Xu, M.L. Shinohara // *Frontiers in immunology*. - 2017. - Vol. 8. - P.1798
40. Stout, R.D. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments / R.D. Stout, J. Suttles // *Journal of leukocyte biology*. - 2004. - Vol.76, N3. - P.509-13
41. London, A. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair / A. London, M. Cohen, M. Schwartz // *Frontiers in cellular neuroscience*. - 2013. - Vol.7. - P.34
42. Naito, M. Differentiation and function of Kupffer cells / M. Naito, G. Hasegawa, Y. Ebe, T. Yamamoto // *Medical electron microscopy: official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*. - 2004. - Vol.37, N1. - P.16-28
43. Florencio-Silva, R. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells / R. Florencio-Silva, G.R. Sasso, E. Sasso-Cerri, M.J. Simões, P.S. Cerri // *BioMed research international*. - 2015. - Vol.2015. - P.421746
44. Joshi, N. Alveolar Macrophages / N. Joshi, J.M. Walter, A.V. Misharin // *Cellular immunology*. - 2018. - Vol.330. - P.86-90
45. Kelly, A. Alveolar Proteinosis Syndrome / A. Kelly, C. McCarthy // *Pulmonary. Seminars in respiratory and critical care medicine*. - 2020. - Vol.41, N2. - P.288-98
46. Davies, L.C. Tissue-resident macrophages / L.C. Davies, S.J. Jenkins, J.E. Allen, P.R. Taylor // *Nature immunology*. - 2013. - Vol.14, N10. - P.986-95

47. Davies, L.C. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute IFN $\lambda$  inflammation / L.C. Davies, M. Rosas, P.J. Smith, D.J. Fraser, S.A. Jones, P.R. Taylor // *European journal of immunology*. - 2011. - Vol.41, N8. - P.2155-64
48. Yona, S. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis / S. Yona, K.W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guilliams, A. Misharin, D.A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer, S. Jung // *Immunity*. - 2013. - Vol.38, N1. - P.79-91
49. Gautier, E.L. Systemic analysis of PPAR $\gamma$  in mouse macrophage populations reveals marked diversity in expression with critical roles in resolution of IFN $\lambda$  inflammation and airway immunity / E.L. Gautier, A. Chow, R. Spanbroek, G. Marcelin, M. Greter, C. Jakubzick, M. Bogunovic, M. Leboeuf, N. van Rooijen, A.J. Habenicht, M. Merad, G.J. Randolph // *Journal of immunology*. - 2012. - Vol.189, N5. - P.2614-24
50. Dick, S.A. Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction / S.A. Dick, J.A. Macklin, S. Nejat, A. Momen, X. Clemente-Casares, M.G. Althagafi, J. Chen, C. Kantores, S. Hosseinzadeh, L. Aronoff, A. Wong, R. Zaman, I. Barbu, R. Besla, K.J. Lavine, B. Razani, F. Ginhoux, M. Husain, M.I. Cybulsky, C.S. Robbins, S. Epelman // *Nature immunology*. - 2019. - Vol.20, N1. - P.29-39
51. Sager, H.B. Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure / H.B. Sager, M. Hulsmans, K.J. Lavine, M.B. Moreira, T. Heidt, G. Courties, Y. Sun, Y. Iwamoto, B. Tricot, O.F. Khan, J.E. Dahlman, A. Borodovsky, K. Fitzgerald, D.G. Anderson, R. Weissleder, P. Libby, F.K. Swirski, M. Nahrendorf // *Circulation research*. - 2016. - Vol.119, N7. - P.853-64
52. Dou, L. Phenotype and Function in Liver Disorder Macrophage / L. Dou, X. Shi, X. He, Y. Gao // *Frontiers in immunology*. - 2019. - Vol.10. - P.3112
53. Singer, A.J. Cutaneous wound healing / A.J. Singer, R.A. Clark // *The New England journal of medicine*. - 1999. - Vol.341, N10. - P.738-46
54. Burke, B. Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets / B. Burke, S. Sumner, N. Maitland, C.E. Lewis // *Journal of leukocyte biology*. - 2002. - Vol.72, N3. - P.417-28
55. Meli, V.S. Biophysical regulation of macrophages in health and disease / V.S. Meli, P.K. Veerasubramanian, H. Atcha, Z. Reitz, T.L. Downing, W.F. Liu // *Journal of leukocyte biology*. - 2019. - Vol.106, N2. - P.283-99
56. Kovaleva, O.V. CHID1 Is a Novel Prognostic Marker of Non-Small Cell Lung Cancer / O.V. Kovaleva, M.A. Rashidova, D.V. Samoiloa, P.A. Podlesnaya, R.M. Tabiev, V.V.

Mochalnikova, A. Gratchev // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol.22, N1. – P.450

57. Nathan, C. Role of iNOS in human host defense. Science / C. Nathan. - 2006. – Vol.312, N5782. - P.1874-5

58. Wang, N. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance / N. Wang, H. Liang, K. Zen // Frontiers in immunology. - 2014. - Vol.5. - P.614

59. Röszer, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms / T. Röszer // Mediators of Inflammation. - 2015. - Vol.2015. - P.816460

60. Stifano, G. Macrophage Involvement in Systemic Sclerosis: Do We Need More Evidence / G. Stifano, R.B. Christmann // Current rheumatology reports. - 2016. - Vol.18, N1. - P.2

61. Mosser, D.M. Exploring the full spectrum of macrophage activation / D.M. Mosser, J.P. Edwards // Nature reviews. Immunology. - 2008. - Vol.8, N12. - P.958-69

62. Haser, R. Structure and sequence of the multihaem cytochrome c3 / R. Haser, M. Pierrot, M. Frey, F. Payan, J.P. Astier, M. Bruschi, J. Le Gall // Nature. - 1979. - Vol. 282, N5741. - P.806-10

63. Zhong, Y. MicroRNA-720 suppresses M2 macrophage polarization by targeting GATA3 / Y. Zhong, C. Yi // Bioscience reports. - 2016. - Vol.36, N4. - P.e00363

64. Ying, H. MiR-127 modulates macrophage polarization and promotes lung inflammation and injury by activating the JNK pathway / H. Ying, Y. Kang, H. Zhang, D. Zhao, J. Xia, Z. Lu, H. Wang, F. Xu, L. Shi // Journal of immunology. - 2015. - Vol.194, N3. - P.1239-51

65. Perrelet, L.A. Panoramic radiography in the examination of edentulous patients / L.A. Perrelet, M. Bernhard, M. Spirgi // The Journal of prosthetic dentistry. - 1977. - Vol.37, N5. - P.494-8

66. Cao, J. LncRNA-MM2P Identified as a Modulator of Macrophage M2 Polarization / J. Cao, R. Dong, L. Jiang, Y. Gong, M. Yuan, J. You, W. Meng, Z. Chen, N. Zhang, Q. Weng, H. Zhu, Q. He, M. Ying, B. Yang // Cancer immunology research. - 2019. - Vol.7, N2. - P.292-305

67. Brüne, B. Redox control of inflammation in macrophages / B. Brüne, N. Dehne, N. Grossmann, M. Jung, D. Namgaladze, T. Schmid, A. von Knethen, A. Weigert // Antioxidants & redox signaling. - 2013. - Vol.19, N6. - P.595-637

68. Kicliter, E. Some telencephalic connections in the frog, *Rana pipiens* / E. Kicliter // The Journal of comparative neurology. - 1979. - Vol.185, N1. - P.75-86

69. Mauel, J. Activation and cytotoxic activity of macrophages: a short review / J. Mauel // Recent results in cancer research. - 1976. - Vol.56. - P.31-40

70. De Groot, J.W. Differences in the induction of macrophage cytotoxicity by the specific T lymphocyte factor, specific macrophage arming factor (SMAF), and the lymphokine, macrophage activating factor (MAF) / J.W. De Groot, R.A. De Weger, R.J. Vandebriel, W. D. Otter // Immunobiology. - 1989. - Vol.179, N2-3. - P.131-44

71. Upton, R. Combining CD47 blockade with trastuzumab eliminates HER2-positive breast cancer cells and overcomes trastuzumab tolerance / R. Upton, A. Banuelos, D. Feng, T. Biswas, K. Kao, K. McKenna, S. Willingham, P.Y. Ho, B. Rosental, M.C. Tal, T. Raveh, J.P. Volkmer, M.D. Pegram, I.L. Weissman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2021. - Vol.118, N29. - P.e2026849118
72. Zhang, M. IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages / M. Zhang, B. Wen, O.M. Anton, Z. Yao, S. Dubois, W. Ju, N. Sato, D.J. DiLillo, R.N. Bamford, J.V. Ravetch, T.A. Waldmann // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2018. - Vol.115, N46. - P.E10915-E10924
73. Reis, E.S. Complement in cancer: untangling an intricate relationship / E.S. Reis, D.C. Mastellos, D. Ricklin, A. Mantovani, J.D. Lambris // *Nature reviews. Immunology*. - 2018. - Vol.18, N1. - P.5-18
74. Li, L. Hypoxia restrains the expression of complement component 9 in tumor-associated macrophages promoting non-small cell lung cancer progression / L. Li, H. Yang, Y. Li, X.D. Li, T.T. Zeng, S.X. Lin, Y.H. Zhu, X.Y. Guan // *Cell death discovery*. - 2018. - Vol.4. - P.63
75. Boehm, U. Cellular responses to interferon-gamma / U. Boehm, T. Klamp, M. Groot, J.C. Howard // *Annual review of immunology*. - 1997. - Vol.15. - P.749-95
76. Paradkar, P.H. In vitro macrophage activation: A technique for screening anti-IFN $\lambda$  inflammatory, immunomodulatory and anticancer activity of phytomolecules / P.H. Paradkar, L.S. Mishra, J.V. Joshi, S.P. Dandekar, R.A. Vaidya, A.B. Vaidya // *Indian journal of experimental biology*. - 2017. - Vol.55, N3. - P.133-41
77. Gelder, M.G. The future of psychiatry in Britain / M.G. Gelder // *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*. - 1979. - Vol.13, N2. - P.103-8
78. Canton, J. Scavenger receptors in homeostasis and immunity / J. Canton, D. Neculai, S. Grinstein // *Nature reviews. Immunology*. - 2013. - Vol.13, N9. - P.621-34
79. Kawai, T. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in IFN $\lambda$  production and immunity / T. Kawai, S. Akira // *Immunity*. - 2011. - Vol.34, N5. - P.637-50
80. Uribe-Querol, E. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process / E. Uribe-Querol, C. Rosales // *Frontiers in immunology*. - 2020. - Vol.11. - P.1066
81. Nimmerjahn, F. Fc $\gamma$  receptors as regulators of immune responses / F. Nimmerjahn, J.V. Ravetch // *Nature reviews. Immunology*. - 2008. - Vol.8, N1. - P.34-47
82. Daëron, M. Fc receptor biology / M. Daëron // *Annual review of immunology*. - 1997. - Vol.15. - P.203-34

83. Jaiswal, S. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis / S. Jaiswal, C.H. Jamieson, W.W. Pang, C.Y. Park, M.P. Chao, R. Majeti, D. Traver, N. van Rooijen, I.L. Weissman // *Cell*. - 2009. - Vol.138, N2. - P.271-85
84. Gordon, S.R. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity / S.R. Gordon, R.L. Maute, B.W. Dulken, G. Hutter, B.M. George, M.N. McCracken, R. Gupta, J.M. Tsai, R. Sinha, D. Corey, A.M. Ring, A.J. Connolly, I.L. Weissman // *Nature*. - 2017. - Vol.545, N7655. - P.495-9
85. Kuchle, H.J. The question of acceptance or refusal of a mandate to testify as an expert / H.J. Kuchle, L. Mewe // *Munchener medizinische Wochenschrift*. - 1979. - Vol.121, N13. - P.447-8
86. Overdijk, M.B. Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma / M.B. Overdijk, S. Verploegen, M. Bögels, M. van Egmond, J.J. Lammerts van Bueren, T. Mutis, R.W. Groen, E. Breij, A.C. Martens, W.K. Bleeker, P.W. Parren // *mAbs*. - 2015. - Vol.7, N2. - P.311-21
87. Djavaheri-Mergny, M. Regulation of autophagy by NFkappaB transcription factor and reactive oxygen species / M. Djavaheri-Mergny, M. Amelotti, J. Mathieu, F. Besançon, C. Bauvy, P. Codogno // *Autophagy*. - 2007. - Vol.3, N4. - P.390-2
88. Hayakawa, Y. Innate immune recognition and suppression of tumors / Y. Hayakawa, M.J. Smyth // *Advances in cancer research*. - 2006. - Vol. 95. - P.293-322
89. Hadrup, S. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment / S. Hadrup, M. Donia, P. Thor Straten // *Cancer microenvironment: official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. - 2013. - Vol.6, N2. - P.123-33
90. Benimetskaya, L. Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein / L. Benimetskaya, J.D. Loike, Z. Khaled, G. Loike, S.C. Silverstein, L. Cao, J. el Khoury, T.Q. Cai, C.A. Stein // *Nature medicine*. - 1997. - Vol.3, N4. - P.414-20
91. Canli, Ö. Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Induce Epithelial Mutagenesis / Ö. Canli, A.M. Nicolas, J. Gupta, F. Finkelmeier, O. Goncharova, M. Pesic, T. Neumann, D. Horst, M. Löwer, U. Sahin, F.R. Greten // *Cancer cell*. - 2017. - Vol.32, N6. - P.869-883.e5
92. Moore, R.J. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis / R.J. Moore, D.M. Owens, G. Stamp, C. Arnott, F. Burke, N. East, H. Holdsworth, L. Turner, B. Rollins, M. Pasparakis, G. Kollias, F. Balkwill // *Nature medicine*. - 1999. - Vol.5, N7. - P.828-31
93. Noy, R. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy / R. Noy, J.W. Pollard // *Immunity*. - 2014. - Vol.41, N1. - P.49-61
94. Wang, X. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes / X. Wang, Y. Lin // *Acta pharmacologica Sinica*. - 2008. - Vol.29, N11. - P.1275-88

95. Landsberg, J. Melanomas resist T-cell therapy through IFN $\lambda$  inflammation-induced reversible dedifferentiation / J. Landsberg, J. Kohlmeyer, M. Renn, T. Bald, M. Rogava, M. Cron, M. Fatho, V. Lennerz, T. Wölfel, M. Hölzel, T. Tüting // *Nature*. - 2012. - Vol.490, N7420. - P.412-6
96. Zhou, X. Nerve growth factor receptor negates the tumor suppressor p53 as a feedback regulator / X. Zhou, Q. Hao, P. Liao, S. Luo, M. Zhang, G. Hu, H. Liu, Y. Zhang, B. Cao, M. Baddoo, E.K. Flemington, S.X. Zeng, H. Lu // *eLife*. - 2016. - Vol. 5. - P.e15099
97. Das, A. MMP proteolytic activity regulates cancer invasiveness by modulating integrins / A. Das, M. Monteiro, A. Barai, S. Kumar, S. Sen // *Scientific reports*. - 2017. - Vol.7, N1. - P.14219
98. Wang, X.F. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in immune tolerance: focus on macrophage polarization of THP-1 cells / X.F. Wang, H.S. Wang, H. Wang, F. Zhang, K.F. Wang, Q. Guo, G. Zhang, S.H. Cai, J. Du // *Cellular immunology*. - 2014. - Vol.289, N1-2. - P.42-8
99. Mellor, A.L. Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses / A.L. Mellor, D.B. Keskin, T. Johnson, P. Chandler, D.H. Munn // *Journal of immunology*. - 2002. - Vol.168, N8. - P.3771-6
100. Zhang, M. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients / M. Zhang, Y. He, X. Sun, Q. Li, W. Wang, A. Zhao, W. Di // *Journal of ovarian research*. - 2014. - Vol. 7. - P.19
101. Boutilier, A.J. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment / A.J. Boutilier, S.F. ElSawa // *International journal of molecular sciences*. - 2021. - Vol.22, N13. - P.6995
102. Hu, W. Tumor-associated macrophages in cancers / W. Hu, X. Li, C. Zhang, Y. Yang, J. Jiang, C. Wu // *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. - 2016. - Vol.18, N3. - P.251-8
103. Weiskopf, K. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer / K. Weiskopf, I.L. Weissman // *mAbs*. - 2015. - Vol.7, N2. - P.303-10
104. Condeelis, J. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis / J. Condeelis, J.W. Pollard // *Cell*. - 2006. - Vol.124, N2. - P.263-6
105. Ruffell, B. Macrophages and therapeutic resistance in cancer / B. Ruffell, L.M. Coussens // *Cancer cell*. - 2015. - Vol.27, N4. - P.462-72
106. Ries, C.H. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy / C.H. Ries, M.A. Cannarile, S. Hoves, J. Benz, K. Wartha, V. Runza, F. Rey-Giraud, L.P. Pradel, F. Feuerhake, I. Klaman, T. Jones, U. Jucknischke, S. Scheiblich, K. Kaluza, I.H. Gorr, A. Walz, K. Abiraj, P.A. Cassier, A. Sica, C. Gomez-Roca, K.E. de Visser, A. Italiano, C. Le Tourneau, J.P. Delord, H. Levitsky, J.Y. Blay, D. Rüttinger // *Cancer cell*. - 2014. - Vol.25, N6. - P.846-59

107. Cannarile, M.A. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy / M.A. Cannarile, M. Weisser, W. Jacob, A.M. Jegg, C.H. Ries, D. Rüttinger // *Journal for immunotherapy of cancer*. - 2017. - Vol.5, N1. - P.53
108. da Silva Junior, I.A. Modulation of Tumor-Associated Macrophages (TAM) Phenotype by Platelet-Activating Factor (PAF) Receptor / I.A. da Silva Junior, S.C. Stone, R.M. Rossetti, S. Jancar, A.P. Lepique // *Journal of immunology research*. - 2017. - Vol.2017. - P.5482768
109. Liang, Z.X. LncRNA RPPH1 promotes colorectal cancer metastasis by interacting with TUBB3 and by promoting exosomes-mediated macrophage M2 polarization / Z.X. Liang, H.S. Liu, F.W. Wang, L. Xiong, C. Zhou, T. Hu, X.W. He, X.J. Wu, D. Xie, X.R. Wu, P. Lan // *Cell death & disease*. - 2019. - Vol.10, N11. - P.829
110. Wang, X. Hypoxic Tumor-Derived Exosomal miR-301a Mediates M2 Macrophage Polarization via PTEN/PI3K $\gamma$  to Promote Pancreatic Cancer Metastasis / X. Wang, G. Luo, K. Zhang, J. Cao, C. Huang, T. Jiang, B. Liu, L. Su, Z. Qiu // *Cancer research*. - 2018. - Vol.78, N16. - P.4586-98
111. Chi, R.K. An evaluation of Tween 80 effects on the survival and DNA repair in *Escherichia coli* following UV or gamma irradiation / R.K. Chi, J.J. Scocca, P.C. Huang // *Mutation research*. - 1978. - Vol.49, N1. - P.1-8
112. Balkwill, F. Cancer and the chemokine network / F. Balkwill // *Nature reviews. Cancer*. - 2004. - Vol.4, N7. - P.540-50
113. Post, J. President's remarks / J. Post // *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. - 1979. - Vol.55, N10. - P.893-5
114. Binenbaum, Y. Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma / Y. Binenbaum, E. Fridman, Z. Yaari, N. Milman, A. Schroeder, G. Ben David, T. Shlomi, Z. Gil // *Cancer research*. - 2018. - Vol.78, N18. - P.5287-99
115. Yin, Z. Macrophage-derived exosomal microRNA-501-3p promotes progression of pancreatic ductal adenocarcinoma through the TGFBR3-mediated TGF- $\beta$  signaling pathway / Z. Yin, T. Ma, B. Huang, L. Lin, Y. Zhou, J. Yan, Y. Zou, S. Chen // *Journal of experimental & clinical cancer research*. - 2019. - Vol.38, N1. - P.310
116. Yang, M. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells / M. Yang, J. Chen, F. Su, B. Yu, F. Su, L. Lin, Y. Liu, J.D. Huang, E. Song // *Molecular cancer*. - 2011. - Vol.10. - P.117
117. Xu, J. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis / J. Xu, C. Wu, X. Che, L. Wang, D. Yu, T. Zhang, L. Huang, H. Li, W. Tan, C. Wang, D. Lin // *Molecular carcinogenesis*. - 2011. - Vol.50, N2. - P.136-42



118. Gottardo, F. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers / F. Gottardo, C.G. Liu, M. Ferracin, G.A. Calin, M. Fassan, P. Bassi, C. Sevignani, D. Byrne, M. Negrini, F. Pagano, L.G. Gomella, C.M. Croce, R. Baffa // *Urologic oncology*. - 2007. - Vol.25, N5. - P.387-92
119. Lan, J. M2 Macrophage-Derived Exosomes Promote Cell Migration and Invasion in Colon Cancer / J. Lan, L. Sun, F. Xu, L. Liu, F. Hu, D. Song, Z. Hou, W. Wu, X. Luo, J. Wang, X. Yuan, J. Hu, G. Wang // *Cancer research*. - 2019. - Vol.79, N1. - P.146-58
120. Zhao, X. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature / X. Zhao, J. Qu, Y. Sun, J. Wang, X. Liu, F. Wang, H. Zhang, W. Wang, X. Ma, X. Gao, S. Zhang // *Oncotarget*. - 2017. - Vol.8, N18. - P.30576-86
121. Yuan, X. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in ovarian cancer: A meta-analysis / X. Yuan, J. Zhang, D. Li, Y. Mao, F. Mo, W. Du, X. Ma // *Gynecologic oncology*. - 2017. - Vol.147, N1. - P.181-7
122. Falleni, M. M1 and M2 macrophages' clinicopathological significance in cutaneous melanoma / M. Falleni, F. Savi, D. Tosi, E. Agape, A. Cerri, L. Moneghini, G.P. Bulfamante // *Melanoma research*. - 2017. - Vol.27, N3. - P.200-10
123. Hanada, T. Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer / T. Hanada, M. Nakagawa, A. Emoto, T. Nomura, N. Nasu, Y. Nomura // *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association*. - 2000. - Vol.7, N7. - P.263-9
124. Cao, J. Prognostic role of tumour-associated macrophages and macrophage scavenger receptor 1 in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis / J. Cao, J. Liu, R. Xu, X. Zhu, X. Zhao, B.Z. Qian // *Oncotarget*. - 2017. - Vol.8, N47. - P.83261-9
125. Shimura, S. Reduced IFN $\gamma$  infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression / S. Shimura, G. Yang, S. Ebara, T.M. Wheeler, A. Frolov, T.C. Thompson // *Cancer research*. - 2000. - Vol. 60, N 20. - P. 5857-61
126. Erlandsson, A. M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer / A. Erlandsson, J. Carlsson, M. Lundholm, A. Fält, S. Andersson, O. Andrén, S. Davidsson // *Prostate*. - 2019. - Vol.79. - P.363-369
127. Lanciotti, M. The role of M1 and M2 macrophages in prostate cancer in relation to extracapsular tumor extension and biochemical recurrence after radical prostatectomy / M. Lanciotti, L. Masieri, M.R. Raspollini, A. Minervini, A. Mari, G. Comito, E. Giannoni, M. Carini, P. Chiarugi, S. Serni // *BioMed research international*. - 2014. - Vol.2014. - P.486798
128. Erlandsson, A. M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer / A. Erlandsson, J. Carlsson, M. Lundholm, A. Fält, S.O. Andersson, O. Andrén, S. Davidsson // *The Prostate*. - 2019. - Vol.79, N4. - P.363-9

129. Mukaida, N. Chemokines in cancer development and progression and their potential as targeting molecules for cancer treatment / N. Mukaida, S. Sasaki, T. Baba // *Mediators of Inflammation*. – 2014. - Vol. 2014. - P.170381
130. Li, M. A role for CCL2 in both tumor progression and immunosurveillance / M. Li, D.A. Knight, L. Snyder, M.J. Smyth, T.J. Stewart // *Oncoimmunology*. - 2013. - Vol.2, N7. - P.e25474
131. Bonapace, L. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis / L. Bonapace, M.M. Coissieux, J. Wyckoff, K.D. Mertz, Z. Varga, T. Junt, M. Bentires-Alj // *Nature*. - 2014. - Vol.515, N7525. – P.130-3
132. Nywening, T.M. Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial / T.M. Nywening, A. Wang-Gillam, D.E. Sanford, B.A. Belt, R.Z. Panni, B.M. Cusworth, A.T. Toriola, R.K. Nieman, L.A. Worley, M. Yano, K.J. Fowler, A.C. Lockhart, R. Suresh, B.R. Tan, K.H. Lim, R.C. Fields, S.M. Strasberg, W.G. Hawkins, D.G. DeNardo, S.P. Goedegebuure, D.C. Linehan // *The Lancet. Oncology*. - 2016. - Vol.17, N5. - P.651-62
133. Loberg, R.D. CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth in vivo through the regulation of macrophage infiltration / R.D. Loberg, C. Ying, M. Craig, L. Yan, L.A. Snyder, K.J. Pienta // *Neoplasia*. - 2007. - Vol.9, N7. - P.556-62
134. Loberg, R.D. Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo / R.D. Loberg, C. Ying, M. Craig, L.L. Day, E. Sargent, C. Neeley, K. Wojno, L.A. Snyder, L. Yan, K.J. Pienta // *Cancer research*. - 2007. - Vol.67, N19. - P.9417-24
135. Brana, I. Carlumab, an anti-CCL2 chemokine ligand 2 monoclonal antibody, in combination with four chemotherapy regimens for the treatment of patients with solid tumors: an open-label, multicenter phase 1b study / I. Brana, A. Calles, P.M. LoRusso, L.K. Yee, T.A. Puchalski, S. Seetharam, B. Zhong, C.J. de Boer, J. Tabernero, E. Calvo // *Targeted oncology*. - 2015. - Vol.10, N1. - P.111-23
136. Arwert, E.N. Unidirectional Transition from Migratory to Perivascular Macrophage Is Required for Tumor Cell Intravasation / E.N. Arwert, A.S. Harney, D.A. Entenberg, Y. Wang, E. Sahai, J.W. Pollard, J.S. Condeelis // *Cell reports*. - 2018. - Vol.23, N5. - P.1239-48
137. Van Rooijen, N. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications / N. Van Rooijen, A. Sanders // *Journal of immunological methods*. - 1994. - Vol.174, N1-2. - P.83-93

138. Banciu, M. Antitumor activity of liposomal prednisolone phosphate depends on the presence of functional tumor-associated macrophages in tumor tissue / M. Banciu, J.M. Metselaar, R.M. Schiffelers, G. Storm // *Neoplasia*. - 2008. - Vol.10, N2. – P.108-17
139. De Rosa, G. Bisphosphonates and cancer: what opportunities from nanotechnology / G. De Rosa, G. Misso, G. Salzano, M. Caraglia // *Journal of drug delivery*. - 2013. - Vol.2013. - P.637976
140. Pedersen, M.B. High intratumoral macrophage content is an adverse prognostic feature in anaplastic large cell lymphoma / M.B. Pedersen, A.V. Danielsen, S.J. Hamilton-Dutoit, K. Bendix, P. Nørgaard, M.B. Møller, T. Steiniche, F. d'Amore // *Histopathology*. - 2014. - Vol.65, N4. - P.490-500
141. Tian, Y. Elevated serum and synovial fluid levels of interleukin-34 in rheumatoid arthritis: possible association with disease progression via interleukin-17 production / Y. Tian, H. Shen, L. Xia, J. Lu // *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. - 2013. - Vol.33, N7. - P.398-401
142. Strachan, D.C. CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing IFN $\gamma$  infiltration by CD8 $^{+}$  T cells / D.C. Strachan, B. Ruffell, Y. Oei, M.J. Bissell, L.M. Coussens, N. Pryer, D. Daniel // *Oncoimmunology*. - 2013. - Vol.2, N12. - P.e26968
143. Tap, W.D. Structure-Guided Blockade of CSF1R Kinase in Tenosynovial Giant-Cell Tumor / W.D. Tap, Z.A. Wainberg, S.P. Anthony, P.N. Ibrahim, C. Zhang, J.H. Healey, B. Chmielowski, A.P. Staddon, A.L. Cohn, G.I. Shapiro, V.L. Keedy, A.S. Singh, I. Puzanov, E.L. Kwak, A.J. Wagner, D.D. Von Hoff, G.J. Weiss, R.K. Ramanathan, J. Zhang, G. Habets, Y. Zhang, E.A. Burton, G. Visor, L. Sanftner, P. Sevenson, H. Nguyen, M.J. Kim, A. Marimuthu, G. Tsang, R. Shellooe, C. Gee, B.L. West, P. Hirth, K. Nolop, M. van de Rijn, H.H. Hsu, C. Peterfy, P.S. Lin, S.G. Tong-Starksen, Bollag // *The New England journal of medicine*. - 2015. - Vol.373, N5. - P.428-37
144. Quail, D.F. The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas / D.F. Quail, R.L. Bowman, L. Akkari, M.L. Quick, A.J. Schuhmacher, J.T. Huse, E.C. Holland, J.C. Sutton, J.A. Joyce // *Science*. - 2016. - Vol.352, N6288. - P.aad3018
145. Zhang, W. Advances in Anti-Tumor Treatments Targeting the CD47/SIRP $\alpha$  Axis / W. Zhang, Q. Huang, W. Xiao, Y. Zhao, J. Pi, H. Xu, H. Zhao, J. Xu, C.E. Evans, H. Jin // *Frontiers in immunology*. - 2020. - Vol. 11. - P.18
146. Chao, M.P. The CD47-SIRP $\alpha$  pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications / M.P. Chao, I.L. Weissman, I.L. Majeti // *Current opinion in immunology*. - 2012. - Vol.24, N2. - P.225-32
147. Barkal, A.A. Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy / A.A. Barkal, K. Weiskopf, K.S. Kao, S.R. Gordon, B. Rosental, Y.Y. Yiu, Y.Y. George, M. Markovic, N.G. Ring, J.M. Tsai, K.M. McKenna,

P.Y. Ho, R.Z. Cheng, J.Y. Chen, J.Y. Barkal, J.Y. Ring, I.L. Weissman, R.L. Maute // *Nature immunology*. - 2018. - Vol.19, N1. - P.76-84

148. Sikic, B.I. First-in-Human, First-in-Class Phase I Trial of the Anti-CD47 Antibody Hu5F9-G4 in Patients With Advanced Cancers / B.I. Sikic, N. Lakhani, A. Patnaik, S.A. Shah, S.R. Chandana, D. Rasco, A.D. Colevas, T. O'Rourke, S. Narayanan, K. Papadopoulos, G.A. Fisher, V. Villalobos, S.S. Prohaska, M. Howard, M. Beeram, M.P. Chao, B. Agoram, J.Y. Chen, J. Huang, M. Axt, J. Liu, J.P. Volkmer, R. Majeti, I.L. Weissman, C.H. Takimoto, D. Supan, H.A. Wakelee, R. Aoki, M.D. Pegram, S.K. Padda // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. - 2019. - Vol.37, N12. - P.946-53

149. Narla, R.K. Modulation of CD47-SIRP $\alpha$  innate immune checkpoint axis with Fc-function detuned anti-CD47 therapeutic antibody / R.K. Narla, H. Modi, D. Bauer, M. Abbasian, J. Leisten, J.R. Piccotti, S. Kopytek, B.P. Eckelman, Q. Deveraux, J. Timmer, D. Zhu, L. Wong, L. Escoubet, H.K. Raymon, K. Hariharan // *Cancer immunology, immunotherapy*. - 2022. - Vol.71, N2. - P.473-89

150. Petrova, P.S. TTI-621 (SIRP $\alpha$ Fc): A CD47-Blocking Innate Immune Checkpoint Inhibitor with Broad Antitumor Activity and Minimal Erythrocyte Binding / P.S. Petrova, N.N. Viller, M. Wong, X. Pang, G.H. Lin, K. Dodge, V. Chai, H. Chen, V. Lee, V. House, N.T. Vigo, D. Jin, T. Mutukura, M. Charbonneau, T. Truong, S. Viau, L.D. Johnson, E. Linderoth, E.L. Sievers, S. Maleki Vareki, R. Figueredo, M. Pampillo, J. Koropatnick, S. Trudel, N. Mbong, L. Jin, J.C. Wang, R.A. Uger // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2017. - Vol.23, N4. - P.1068-79

151. Ansell, S.M. Phase I Study of the CD47 Blocker TTI-621 in Patients with Relapsed or Refractory Hematologic Malignancies / S.M. Ansell, M.B. Maris, A.M. Lesokhin, R.W. Chen, I.W. Flinn, A. Sawas, M.D. Minden, D. Villa, M.M. Percival, A.S. Advani, J.M. Foran, S.M. Horwitz, M.G. Mei, J. Zain, K.J. Savage, C. Querfeld, O.E. Akilov, L.S. Johnson, T. Catalano, P.S. Petrova, R.A. Uger, E.L. Sievers, A. Milea, K. Roberge, Y. Shou, O.A. O'Connor // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2021. - Vol. 27, N 8. - P. 2190-9

152. Beatty, G.L. A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma / G.L. Beatty, D.A. Torigian, E.G. Chiorean, B. Saboury, A. Brothers, A. Alavi, A.B. Troxel, W. Sun, U.R. Teitelbaum, R.H. Vonderheide, P.J. O'Dwyer // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2013. - Vol.19, N22. - P.6286-95

153. Vonderheide, R.H. Phase I study of the CD40 agonist antibody CP-870,893 combined with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors / R.H. Vonderheide, J.M. Burg, R. Mick, J.A. Trosko, D. Li, M.N. Shaik, A.W. Tolcher, O. Hamid // *Oncoimmunology*. - 2013. - Vol.2, N1. - P.e23033

154. Nowak, A.K. A phase 1b clinical trial of the CD40-activating antibody CP-870,893 in combination with cisplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma / A.K. Nowak, A.M. Cook, A.M. McDonnell, M.J. Millward, J. Creaney, R.J. Francis, A. Hasani, A. Segal, A.W. Musk, B.A. Turlach, M.J. McCoy, B.W. Robinson, R.A. Lake // *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. - 2015. - Vol.26, N12. - P.2483-90

155. McCarthy, E.F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas / E.F. McCarthy, W.B. Coley // *The Iowa orthopaedic journal*. - 2006. - Vol. 26. - P.154-8

156. Ji, N. Percutaneous BCG enhances innate effector antitumor cytotoxicity during treatment of bladder cancer: a translational clinical trial / N. Ji, N. Mukherjee, E.E. Morales, M.E. Tomasini, V. Hurez, T.J. Curiel, G. Abate, D.F. Hoft, X.R. Zhao, J. Gelfond, S. Maiti, L.J.N. Cooper, R.S. Svatek // *Oncoimmunology*. - 2019. - Vol.8, N8. - P.1614857

157. Singh, M. Effective innate and adaptive antimelanoma immunity through localized TLR7/8 activation / M. Singh, H. Khong, Z. Dai, X.F. Huang, J.A. Wargo, Z.A. Cooper, J.P. Vasilakos, P. Hwu, W.W. Overwijk // *Journal of immunology*. - 2014. - Vol. 193, N 9. - P. 4722-31

158. Adams, S. Topical TLR7 agonist imiquimod can induce immune-mediated rejection of skin metastases in patients with breast cancer / S. Adams, L. Kozhaya, F. Martiniuk, T.C. Meng, L. Chiriboga, L. Liebes, T. Hochman, N. Shuman, D. Axelrod, J. Speyer, Y. Novik, A. Tiersten, J.D. Goldberg, S.C. Formenti, N. Bhardwaj, D. Unutmaz, S. Demaria // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2012. - Vol.18, N24. - P.6748-57

159. Ribas, A. Overcoming PD-1 Blockade Resistance with CpG-A Toll-Like Receptor 9 Agonist Vidutolimod in Patients with Metastatic Melanoma / A. Ribas, T. Medina, J.M. Kirkwood, Y. Zakharia, R. Gonzalez, D. Davar, B. Chmielowski, K.M. Campbell, R. Bao, H. Kelley, A. Morris, D. Mauro, J.E. Wooldridge, J.J. Luke, G.J. Weiner, A.M. Krieg, M.M. Milhem // *Cancer discovery*. - 2021. - Vol.11, N12. - P.2998-3007

160. Barkal, A.A. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy / A.A. Barkal, R.E. Brewer, M. Markovic, M. Kowarsky, S.A. Barkal, B.W. Zaro, V. Krishnan, J. Hatakeyama, O. Dorigo, L.J. Barkal, I.L. Weissman // *Nature*. - 2019. - Vol.572, N7769. - P.392-6

161. Lobera, M. Selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group / M. Lobera, K.P. Madauss, D.T. Pohlhaus, Q.G. Wright, M. Trocha, D.R. Schmidt, E. Baloglu, R.P. Trump, M.S. Head, G.A. Hofmann, M. Murray-Thompson, B. Schwartz, S. Chakravorty, Z. Wu, P.K. Mander, L. Kruidenier, R.A. Reid, W. Burkhart, B.J. Turunen, J.X. Rong, C. Wagner, M.B. Moyer, C. Wells, X. Hong, J.T. Moore, J.D. Williams, D. Soler, S. Ghosh, M.A. Nolan // *Nature chemical biology*. - 2013. - Vol.9, N5. - P.319-25

162. Guerriero, J.L. Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages / J.L. Guerriero, A. Sotayo, H.E. Ponichtera, J.A. Castrillon, A.L. Pourzia, S. Schad, S.F. Johnson, R.D. Carrasco, S. Lazo, R.T. Bronson, S.P. Davis, M. Lobera, M.A. Nolan, A. Letai // *Nature*. - 2017. - Vol.543, N7645. - P.428-32
163. Kuper, H. Infections as a major preventable cause of human cancer / H. Kuper, H.O. Adami, D. Trichopoulos // *Journal of internal medicine*. - 2000. - Vol.248, N3. - P.171-83
164. Maeda, H. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer / H. Maeda, T. Akaike // *Biochemistry. Biokhimiia*. - 1998. - Vol.63, N7. - P.854-65
165. Hudson, J.D. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity / J.D. Hudson, M.A. Shoaibi, R. Maestro, A. Carnero, G.J. Hannon, D.H. Beach // *The Journal of experimental medicine*. - 1999. - Vol.190, N10. - P.1375-82
166. Lesovaya, E. Glucocorticoid Receptor Function, Blocks Atrophogene REDD1, and Protects Skin from Steroid Atrophy Rapamycin Modulates / E. Lesovaya, S. Agarwal, B. Readhead, E. Vinokour, G. Baida, P. Bhalla, K. Kirsanov, M. Yakubovskaya, L.C. Platanius, J.T. Dudley, I. Budunova // *The Journal of investigative dermatology*. - 2018. - Vol.138, N9. - P.1935-44
167. Kopylova, E. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data / E. Kopylova, L. Noé, H. Touzet // *Bioinformatics*. - 2012. - Vol.28, N24. - P.3211-7
168. Kim, D. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements / D. Kim, B. Langmead, S.L. Salzberg // *Nature methods*. - 2015. - Vol. 12, N 4. - P. 357-60
169. Li, H. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools / H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin // *Bioinformatics*. - 2009. - Vol.25, N16. - P.2078-9
170. Goldsmith, J.R. Bayesian strategy for interpreting pooled data from epidemiological studies / J.R. Goldsmith, J.G. Wendel // *Public health reviews*. - 1988. - Vol.16, N3-4. - P.189-205
171. Love, M.I. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 / M.I. Love, W. Huber, S. Anders // *Genome biology*. - 2014. - Vol.15, N12. - P.550
172. Kim, D. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements / D. Kim, B. Langmead, S.L. Salzberg // *Nat Methods*. - 2015. - Vol.12, N4. - P.357-60
173. Tamási, V. Role of xenobiotic metabolism in cancer: involvement of transcriptional and miRNA regulation of P450s / V. Tamási, K. Monostory, R.A. Prough, A. Falus // *Cellular and molecular life sciences*. - 2011. - Vol.68, N7. - P.1131-46
174. Quintero-Fabián, S. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer / S. Quintero-Fabián, R. Arreola, E. Becerril-Villanueva, J.C. Torres-Romero, V. Arana-Argáez, J. Lara-

Riegos, M.A. Ramírez-Camacho, M.E. Alvarez-Sánchez // *Frontiers in oncology*. - 2019. - Vol.9. - P.1370

175. Wang, F. Effect of microserum environment stimulation on extraction and biological function of colorectal cancer stem cells / F. Wang, J. Zhao, C. Zhang, B. Yang, T. Tian, M. Tian, N. Meng, W. Xie, G. Liu, X. Zhu, M. Su, Z. He, Y. Liu, D. Tang, Y. Li // *Discover. Oncology*. - 2023. - Vol.14, N1. - P.156

176. Banyard, J. The role of EMT and MET in cancer dissemination / J. Banyard, D.R. Bielenberg // *Connective tissue research*. - 2015. - Vol.56, N5. - P.403-13

177. Yeung, K.T. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis / K.T. Yeung, J. Yang // *Molecular oncology*. - 2017. - Vol.11, N1. - P.28-39

178. Mercogliano, M.F. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Blockade: An Opportunity to Tackle Breast Cancer / M.F. Mercogliano, S. Bruni, P.V. Elizalde, R. Schillaci // *Frontiers in oncology*. - 2020. - Vol.10. - P.584

179. Mizokami, A. Tumor necrosis factor-alpha represses androgen sensitivity in the LNCaP prostate cancer cell line / A. Mizokami, A. Gotoh, H. Yamada, E.T. Keller, T. Matsumoto // *The Journal of urology*. - 2000. - Vol.164, N3. - P.800-5

180. Rodríguez-Berriguete, G. Clinical significance of both tumor and stromal expression of components of the IL-1 and TNF- $\alpha$  signaling pathways in prostate cancer / G. Rodríguez-Berriguete, B. Sánchez-Espiridión, J.R. Cansino, G. Olmedilla, P. Martínez-Onsurbe, M. Sánchez-Chapado, R. Paniagua, B. Fraile, M. Royuela // *Cytokine*. - 2013. - Vol.64, N2. - P.555-63

181. Bouraoui, Y. Pro-inflammatory cytokines and prostate-specific antigen in hyperplasia and human prostate cancer / Y. Bouraoui, M. Ricote, I. García-Tuñón, G. Rodríguez-Berriguete, M. Touffehi, N.B. Rais, B. Fraile, R. Paniagua, R. Oueslati, M. Royuela // *Cancer detection and prevention*. - 2008. - Vol.32, N1. - P.23-32

182. Schalper, K.A. Differential Expression and Significance of PD-L1, IDO-1, and B7-H4 in Human Lung Cancer / K.A. Schalper, D. Carvajal-Hausdorf, J. McLaughlin, M. Altan, V. Velcheti, P. Gaule, M.F. Sanmamed, L. Chen, R.S. Herbst, D.L. Rimm // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2017. - Vol.23, N2. - P.370-8

183. Feder-Mengus, C. High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase gene in prostate cancer / C. Feder-Mengus, S. Wyler, T. Hudolin, R. Ruzsat, L. Bubendorf, A. Chiarugi, M. Pittelli, W.P. Weber, A. Bachmann, T.C. Gasser, T. Sulser, M. Heberer, G.C. Spagnoli, M. Provenzano // *European journal of cancer*. - 2008. - Vol.44, N15. - P.2266-75

184. Provenzano, M. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression and malignant transformation in prostate cancer / M. Provenzano, C. Feder-Mengus, S. Wyler, T. Hudolin, R. Ruzsat,

W.P. Weber, T. Sulser, A. Bachmann, M. Heberer, G.C. Spagnoli // *Journal of Clinical Oncology*. - 2008. - Vol.26, N15. - P.5149

185. Reck, M. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer / M. Reck, D. Rodríguez-Abreu, A.G. Robinson, R. Hui, T. Csőszi, A. Fülöp, M. Gottfried, N. Peled, A. Tafreshi, S. Cuffe, M. O'Brien, S. Rao, K. Hotta, M.A. Leiby, G.M. Lubiniecki, Y. Shentu, R. Rangwala, J.R. Brahmer, G. Kannourakis, C. Steer, V. Ganju, K. O'Byrne, A. Tafreshi, R. Hui, O. Burghuber, P. Germonpre, M. Lambrechts, A. Robinson, M. Smylie, V. Hirsh, R. Gervais, M. Perol, J. Bennouna, D. Pouessel, M. Reck, G. Kopp, P. Brossart, T.C. Wehler, E. Spaeth-Schwalbe, L. Molnar, B. Balint, Z. Papai-Szekely, T. Csoszi, A. Fulop, S. Soter, Z. Szalai, S. Tehenes, S. O'Reilly, L. Coate, S. Cuffe, S. Gottfried, N. Peled, M. Wollner, Y. Bar, S. Ariad, O. Merimsky, G. Carteni, P. Bidoli, C. Gridelli, C. Marchetti, M. Tiseo, M. Chiara Garassino, L. Bonanno, F. Grossi, F. De Marinis, F. Ardizzoni, F. Horiike, F. Satouchi, N. Katakami, A. Sekine, Y. Torii, K. Nakagawa, I. Okamoto, M. Maemondo, S. Umemura, K. Nosaki, H. Saka, K. Aoe, K. Hotta, H. Sakai, H. Sugawara, T. Takahashi, K. Kishi, N. Yamamoto, J. de Langen, R. Sullivan, M.G. Garcia Campelo, O.J. Vidal, R. Bernabe Caro, R. Rubio Viqueira, M. Domine Gomez, M. Rodriguez-Abreu, E. Felip, M. Nicolson, R. Lal, D.A. Fennel, V. Potter, G. Middleton, M.E. O'Brien, C. Ottensmeir, R. Califano, J. Gandhi, H.I. Tahsildar, M.J. Guarino, R. Patel, K. Dragnev, G. Giaccone, S. Rao, E. Avery, R. Sanborn, W.E. Lawler, K. Konduri, F. Robert, J. Riess, E.B. Garon, T.B. Leal, T.B. Morgensztern, H. Ahuja, A.M. Vanderwalde, S.E. Reichert, P.A. Bun, R. Pirker, W. Shih // *The New England journal of medicine*. - 2016. - Vol.375, N19. - P.1823-33

186. Nakao, S. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth / S. Nakao, T. Kuwano, C. Tsutsumi-Miyahara, S. Ueda, Y.N. Kimura, S. Hamano, K.H. Sonoda, Y. Saijo, T. Nukiwa, R.M. Strieter, T. Ishibashi, M. Kuwano, M. Ono // *The Journal of clinical investigation*. - 2005. - Vol.115, N11. - P.2979-91

187. Fujimoto, J. Clinical implications of expression of interleukin-8 related to myometrial invasion with angiogenesis in uterine endometrial cancers / J. Fujimoto, I. Aoki, S. Khatun, H. Toyoki, T. Tamaya // *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. - 2002. - Vol.13, N3. - P.430-4

188. Wang, H. CD68(+) HLA-DR(+) M1-like macrophages promote motility of HCC cells via NF- $\kappa$ B/FAK pathway / H. Wang, X. Wang, X. Li, Y. Fan, G. Li, C. Guo, F. Zhu, L. Zhang, Y. Shi // *Cancer letters*. - 2014. - Vol.345, N1. - P.91-9

189. Ikwegbue, P.C. Interplay between heat shock proteins, inflammation and cancer: a potential cancer therapeutic target / P.C. Ikwegbue, P. Masamba, L.S. Mbatha, B.E. Oyinloye, A.P. Kappo // *American journal of cancer research*. - 2019. - Vol.9, N2. - P.242-9



190. Riddy, D.M. Comparative genotypic and phenotypic analysis of human peripheral blood monocytes and surrogate monocyte-like cell lines commonly used in metabolic disease research / D.M. Riddy, E. Goy, P. Delerive, R.J. Summers, P.M. Sexton, C.J. Langmead // *PloS one*. - 2018. - Vol.13, N5. - P.e0197177
191. Aguiari, G. K562 erythroid and HL60 macrophage differentiation downregulates polycystin, a large membrane-associated protein / G. Aguiari, R. Piva, E. Manzati, E. Mazzoni, G. Augello, E. Chiari, S. Moretti, L.M. Neri, del L. Senno // *Experimental cell research*. - 1998. - Vol.244, N1. - P.259-67
192. Egeblad, M. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression / M. Egeblad, Z. Werb // *Nature reviews. Cancer*. - 2002. - Vol.2, N3. - P.161-74
193. Gialeli, C. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting / C. Gialeli, A.D. Theocharis, N.K. Karamanos // *The FEBS journal*. - 2011. - Vol.278, N1. - P.16-27
194. Gong, Y. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression / Y. Gong, U.D. Chippada-Venkata, W.K. Oh // *Cancers*. - 2014. - Vol.6, N3. - P.1298-327
195. Du, L. High Vimentin Expression Predicts a Poor Prognosis and Progression in Colorectal Cancer: A Study with Meta-Analysis and TCGA Database / L. Du, J. Li, L. Lei, H. He, E. Chen, J. Dong, J. Yang // *BioMed research international*. - 2018. - Vol. 2018. - P.6387810
196. Yamashita, N. Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer / N. Yamashita, E. Tokunaga, H. Kitao, Y. Hisamatsu, K. Taketani, S. Akiyoshi, S. Okada, S. Aishima, M. Morita, Y. Maehara // *Journal of cancer research and clinical oncology*. - 2013. - Vol. 39, N5. - P.739-46
197. Tadokoro, A. Vimentin Regulates Invasiveness and Is a Poor Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Cancer / A. Tadokoro, N. Kanaji, D. Liu, H. Yokomise, R. Haba, T. Ishii, T. Takagi, N. Watanabe, N. Kita, N. Kadowaki, S. Bandoh // *Anticancer research*. - 2016. - Vol.36, N4. - P.1545-51
198. Mogre, S. Biomarker Potential of Vimentin in Oral Cancers / S. Mogre, V. Makani, S. Pradhan, P. Devre, S. More, M. Vaidya, C. Dmello // *Life*. - 2022. - Vol.12, N2. - P.150
199. Kidd, M.E. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer / M.E. Kidd, D.K. Shumaker, K.M. Ridge // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. - 2014. - Vol.50, N1. - P.1-6
200. Blakley, P.M. Effects of gestational exposure to Tordon 202c on fetal growth and development in CD-1 mice / P.M. Blakley, J.S. Kim, G.D. Firneisz // *Journal of toxicology and environmental health*. - 1989. - Vol.28, N3. - P.309-16

201. Dayoub, A. Inactivation of PTEN and ZFH3 in Mammary Epithelial Cells Alters Patterns of Collective Cell Migration / A. Dayoub, A.I. Fokin, M.E. Lomakina, J. James, M. Plays, T. Jacquin, N.M. Novikov, R.S. Vorobyov, A.A. Schegoleva, K.D. Rysenkova, J. Gaboriaud, S.V. Leonov, E.V. Denisov, A.M. Gautreau, A.Y. Alexandrova // *International journal of molecular sciences*. - 2022. - Vol.24, N1. - P.313
202. Kidd, M.E. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer / M.E. Kidd, D.K. Shumaker, K.M. Ridge // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. - 2014. - Vol.50, N1. - P.1-6
203. Blakley, P.M. Effects of gestational exposure to Tordon 202c on fetal growth and development in CD-1 mice / P.M. Blakley, J.S. Kim, G.D. Firneisz // *Journal of toxicology and environmental health*. - 1989. - Vol.28, N3. - P.309-16
204. Sharma, P. Intermediate Filaments as Effectors of Cancer Development and Metastasis: A Focus on Keratins, Vimentin, and Nestin / P. Sharma, S. Alsharif, A. Fallatah, B.M. Chung // *Cells* 2019. - Vol.8, N5. - P.497
205. Chen, J. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer / J. Chen, C.C. Jiang, L. Jin, X.D. Zhang // *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. - 2016. - Vol.27, N3. - P.409-16
206. Jiang, X. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition / X. Jiang, J. Zhou, A. Giobbie-Hurder, J. Wargo, F.S. Hodi // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2013. - Vol.19, N3. - P.598-609
207. Rouse, J. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins / J. Rouse, P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, A.R. Nebreda // *Cell*. - 1994. - Vol.78, N6. - P.1027-37
208. Raingeaud, J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine / J. Raingeaud, S. Gupta, J.S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R.J. Ulevitch, R.J. Davis // *The Journal of biological chemistry*. - 1995. - Vol.270, N13. - P.7420-6
209. Donnelly, S.M. P38 MAPK contributes to resistance and invasiveness of HER2-overexpressing breast cancer / S.M. Donnelly, E. Paplomata, B.M. Peake, E. Sanabria, Z. Chen, R. Nahta // *Current medicinal chemistry*. - 2014. - Vol.21, N4. - P.501-10
210. Esteva, F.J. Prognostic significance of phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase and HER-2 expression in lymph node-positive breast carcinoma / F.J. Esteva, A.A. Sahin, T.L.

Smith, Y. Yang, L. Pusztai, R. Nahta, T.A. Buchholz, A.U. Buzdar, G.N. Hortobagyi, S.S. Bacus // *Cancer*. - 2004. - Vol.100, N3. - P.499-506

211. Knizhnik, A.V. Arf6 promotes cell proliferation via the PLD-mTORC1 and p38MAPK pathways / A.V. Knizhnik, O.V. Kovaleva, A.V. Komelkov, L.S. Trukhanova, V.A. Rybko, I.B. Zborovskaya, E.M. Tchevkina // *Journal of cellular biochemistry*. - 2012. - Vol. 113, N 1. - P. 360-71

212. Cai, X. Inflammatory factor TNF- $\alpha$  promotes the growth of breast cancer via the positive feedback loop of TNFR1/NF- $\kappa$ B (and/or p38)/p-STAT3/HBXIP/TNFR1 / X. Cai, C. Cao, J. Li, F. Chen, S. Zhang, B. Liu, W. Zhang, X. Zhang, L. Ye // *Oncotarget*. - 2017. - Vol.8, N35. - P.58338-52

213. Maolake, A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces prostate cancer cell migration in lymphatic metastasis through CCR7 upregulation / A. Maolake, K. Izumi, A. Natsagdorj, H. Iwamoto, S. Kadomoto, T. Makino, R. Naito, R. Shigehara, Y. Kadono, K. Hiratsuka, G. Wufuer, K.L. Nastiuk, A. Mizokami // *Cancer science*. - 2018. - Vol.109, N5. - P.1524-31

214. Chen, S.H. Mesothelin binding to CA125/MUC16 promotes pancreatic cancer cell motility and invasion via MMP-7 activation / S.H. Chen, W.C. Hung, P. Wang, C. Paul, K. Konstantopoulos // *Scientific reports*. - 2013. - Vol.3. - P.1870

215. Saad, H.M. The Potential Role of MUC16 (CA125) Biomarker in Lung Cancer: A Magic Biomarker but with Adversity / H.M. Saad, G.F. Tourky, H.M. Al-Kuraishy, A.I. Al-Gareeb, A.M. Khattab, S.A. Elmasry, A.A. Alsayegh, A.A. Hakami, A. Alsulimani, J.M. Sabatier, M.W. Eid, H.M. Shaheen, A.A. Mohammed, G.E. Batiha, M. De Waard // *Diagnostics*. - 2022. - Vol.12, N12. - P.2985

216. Lakshmanan, I. MUC16 induced rapid G2/M transition via interactions with JAK2 for increased proliferation and anti-apoptosis in breast cancer cells / I. Lakshmanan, M.P. Ponnusamy, S. Das, S. Chakraborty, D. Haridas, P. Mukhopadhyay, S.M. Lele, S.K. Batra // *Oncogene*. - 2012. - Vol.31, N7. - P.805-17

217. Wolczyk, D. TNF- $\alpha$  promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts / D. Wolczyk, M. Zaremba-Czogalla, A. Hryniewicz-Jankowska, R. Tabola, K. Grabowski, A.F. Sikorski, K. Augoff // *Cellular oncology*. - 2016. - Vol.39, N4. - P.353-63

218. Kim, S. Berberine suppresses TNF-alpha-induced MMP-9 and cell invasion through inhibition of AP-1 activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells / S. Kim, J.H. Choi, J.B. Kim, S.J. Nam, J.H. Yang, J.H. Kim, J.E. Lee // *Molecules*. - 2008. - Vol.13, N12. - P.2975-85

219. Wu, Y. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion / Y. Wu, B.P. Zhou // *British journal of cancer*. - 2010. - Vol.102, N4. - P.639-44

220. Sobo-Vujanovic, A. Inhibition of Soluble Tumor Necrosis Factor Prevents Chemically Induced Carcinogenesis in Mice / A. Sobo-Vujanovic, L. Vujanovic, A.B. DeLeo, F. Concha-

Benavente, R.L. Ferris, Y. Lin, N.L. Vujanovic // *Cancer immunology research*. - 2016. - Vol.4, N5. - P.441-51

221. Suganuma, M. Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice / M. Suganuma, S. Okabe, M.W. Marino, A. Sakai, E. Sueoka, H. Fujiki // *Cancer research*. - 1999. - Vol.59, N18. - P.4516-8

222. Liu, Z.G. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death / Z.G. Liu, H. Hsu, D.V. Goeddel, M. Karin // *Cell*. - 1996. - Vol.87, N3. - P.565-76

223. Anguiano, B. Protective effects of iodine on rat prostate inflammation induced by sex hormones and on the DU145 prostate cancer cell line treated with TNF / B. Anguiano, L. Álvarez, E. Delgado-González, Z. Ortiz-Martínez, C. Montes de Oca, G. Morales, C. Aceves // *Molecular and cellular endocrinology*. - 2023. - Vol.572. - P.111957

224. Wang, X. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes / X. Wang, Y. Lin // *Acta pharmacologica Sinica*. - 2008. - Vol.29, N11. - P.1275-88

225. Su, Z. Understanding the functional role of membrane confinements in TNF-mediated signaling by multiscale simulations / Z. Su, K. Dhusia, Y. Wu // *Communications biology*. - 2022. - Vol.5, N1. - P.228

226. Kucka, K. Oligomerization and Its Relevance for Signaling by Receptors of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily / K. Kucka, H. Wajant // *Receptor Frontiers in cell and developmental biology*. - 2020. - Vol. 8. - P.615141

227. Cruceriu, D. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches / D. Cruceriu, O. Baldasici, O. Balacescu, I. Berindan-Neagoe // *Cellular oncology*. - 2020. - Vol.43, N1. - P.1-18

228. Larionova, I. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers / I. Larionova, G. Tuguzbaeva, A. Ponomaryova, M. Stakheyeva, N. Cherdyntseva, V. Pavlov, E. Choinzonov, J. Kzhyshkowska // *Frontiers in oncology*. - 2020. - Vol.10. - P.566511

229. Zhang, J. High Infiltration of Tumor-Associated Macrophages Influences Poor Prognosis in Human Gastric Cancer Patients, Associates with the Phenomenon of EMT / J. Zhang, Y. Yan, Y. Yang, L. Wang, M. Li, J. Wang, X. Liu, X. Duan, J. Wang // *Medicine*. - 2016. - Vol.95, N6. - P.e2636

230. Jayasingam, S.D. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice / S.D. Jayasingam, M. Citartan, T.H. Thang, A.A. Mat Zin, K.C. Ang, E.S. Ch'ng // *Frontiers in oncology*. - 2019. - Vol. 9. - P.1512

231. Liao, C. SPINKs in Tumors: Potential Therapeutic Targets / C. Liao, Q. Wang, J. An, M. Zhang, J. Chen, X. Li, L. Xiao, J. Wang, Q. Long, J. Liu, X. Guan // *Frontiers in oncology*. – 2022. - Vol.12. - P.833741
232. Sun, S. Inhibition of the Tumor Suppressor Gene SPINK5 via EHMT2 Induces the Oral Squamous Cell Carcinoma Development / S. Sun, G. Su, X. Zheng // *Mol Biotechnol*. - 2023. - Vol.65, N4. - P.625
233. Latonen, L. In Vivo Expression of miR-32 Induces Proliferation in Prostate Epithelium / L. Latonen, M. Scaravilli, A. Gillen, S. Hartikainen, F.P. Zhang, P. Ruusuvuori, P. Kujala, M. Poutanen, T. Visakorpi // *The American journal of pathology*. - 2017. - Vol.187, N11. - P.2546-57
234. Arima, K. Downregulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase by interleukin-1 $\beta$  from activated macrophages leads to poor prognosis in pancreatic cancer / K. Arima, Y. Komohara, Y. Bu, M. Tsukamoto, R. Itoyama, K. Miyake, T. Uchihara, Y. Ogata, S. Nakagawa, H. Okabe, K. Imai, D. Hashimoto, A. Chikamoto, Y.I. Yamashita, H. Baba, T. Ishimoto // *Cancer science*. - 2018. - Vol.109, N2. - P.462-70
235. Fan, Y. Sp1-Induced SETDB1 Overexpression Transcriptionally Inhibits HPGD in a  $\beta$ -Catenin-Dependent Manner and Promotes the Proliferation and Metastasis of Gastric Cancer / Y. Fan, L. Yang, Y. Ren, Y. Wu, L. Li // *Journal of gastric cancer*. - 2022. - Vol.22, N4. - P.319-38
236. Yao, S. Down-regulation of HPGD by miR-146b-3p promotes cervical cancer cell proliferation, migration and anchorage-independent growth through activation of STAT3 and AKT pathways / S. Yao, J. Xu, K. Zhao, P. Song, Q. Yan, W. Fan, W. Li, C. Lu // *Cell death & disease*. - 2018. - Vol.9, N11. - P.1055
237. Dashzeveg, N. Palmdelphin, a novel target of p53 with Ser46 phosphorylation, controls cell death in response to DNA damage / N. Dashzeveg, N. Taira, Z.G. Lu, J. Kimura, K. Yoshida // *Cell death & disease*. - 2014. - Vol.5, N5. - P.e1221
238. Agostini-Dreyer, A. Endogenous IGFBP-3 Mediates Intrinsic Apoptosis Through Modulation of Nur77 Phosphorylation and Nuclear Export / A. Agostini-Dreyer, A.E. Jetzt, H. Stires, W.S. Cohick // *Endocrinology*. - 2015. - Vol.156, N11. - P.4141-51
239. Cai, M.Y. Low Level of PALMD Contributes to the Metastasis of Uveal Melanoma / M.Y. Cai, Y.L. Xu, H. Rong, H. Yang // *Frontiers in oncology*. - 2022. - Vol.12. - P.802941
240. Yan, J. Aldehyde dehydrogenase 3A1 associates with prostate tumorigenesis / J. Yan, J. De Melo, J.C. Cutz, T. Aziz, D. Tang // *British journal of cancer*. - 2014. - Vol.110, N10. - P.2593-603
241. Fan, F. ALDH3A1 driving tumor metastasis is mediated by p53/BAG1 in lung adenocarcinoma / F. Fan, R. Yin, L. Wang, S. Zhao, D. Lv, K. Yang, S. Geng, N. Yang, X. Zhang, H. Wang // *Journal of Cancer*. - 2021. - Vol.12, N16. - P.4780-90

242. Qu, Y. ALDH3A1 acts as a prognostic biomarker and inhibits the epithelial mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma through IL-6/STAT3 signaling pathway / Y. Qu, Y. He, Y. Yang, S. Li, W. An, Z. Li, X. Wang, Z. Han, L. Qin // *Journal of Cancer*. - 2020. - Vol.11, N9. - P.2621-31
243. Guan, Y. Overexpression of flotillin-1 is involved in proliferation and recurrence of bladder transitional cell carcinoma / Y. Guan, H. Song, G. Zhang, X. Ai // *Oncology reports*. - 2014. - Vol.32, N2. - P.748-54
244. Lin, C. Knockdown of FLOT1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of FOXO3a / C. Lin, Z. Wu, X. Lin, C. Yu, T. Shi, Y. Zeng, X. Wang, J. Li, L. Song // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2011. - Vol.17, N10. - P.3089-99
245. Zhang, S.H. High Expression of FLOT1 Is Associated with Progression and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma / S.H. Zhang, C.J. Wang, L. Shi, X.H. Li, J. Zhou, L.B. Song, W.T. Liao // *PloS one*. - 2013. - Vol.8, N6. - P.e64709
246. Lin, C. Knockdown of FLOT1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of FOXO3a / C. Lin, Z. Wu, X. Lin, C. Yu, T. Shi, Y. Zeng, X. Wang, J. Li, L. Song // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2011. - Vol.17, N10. - P.3089-99
247. Jang, D. Sumoylation of Flotillin-1 promotes EMT in metastatic prostate cancer by suppressing Snail degradation / D. Jang, H. Kwon, M. Choi, J. Lee, Y. Pak // *Oncogene*. - 2019. - Vol.38, N17. - P.3248-60
248. Zhang, L. FLOT1 promotes tumor development, induces epithelial-mesenchymal transition, and modulates the cell cycle by regulating the Erk/Akt signaling pathway in lung adenocarcinoma / L. Zhang, Y. Mao, Q. Mao, W. Fan, L. Xu, Y. Chen, L. Xu, J. Wang // *Thoracic cancer*. - 2019. - Vol.10, N4. - P.909-17
249. Kurrle, N. Function of Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Endocytosis: Role of Tyrosine Phosphorylation and Oligomerization / N. Kurrle, B. John, M. Meister, R. Tikkanen // *Protein Phosphorylation in Human Health*. - 2012. - P.307-41
250. Tano, K. Long non-coding RNAs in cancer progression / K. Tano, N. Akimitsu // *Frontiers in genetics*. - 2012. - Vol.3. - P.219
251. Carlevaro-Fita, J. Cancer LncRNA Census reveals evidence for deep functional conservation of long noncoding RNAs in tumorigenesis / J. Carlevaro-Fita, A. Lanzós, L. Feuerbach, C. Hong, D. Mas-Ponte, J.S. Pedersen, R. Johnson // *Communications biology*. - 2020. - Vol.3, N1. - P.3-56

252. Schmitt, A.M. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways / A.M. Schmitt, H.Y. Chang // *Cancer cell*. - 2016. - Vol.29, N4. - P.452-63
253. Huarte, M. The emerging role of lncRNAs in cancer / M. Huarte // *Nature medicine*. - 2015. - Vol.21, N11. - P.1253-61
254. He, Y. Construction of an Immune-Related lncRNA Signature That Predicts Prognosis and Immune Microenvironment in Osteosarcoma Patients / Y. He, H. Zhou, H. Xu, H. You, H. Cheng // *Frontiers in oncology*. - 2022. - Vol. 12. - P.769202
255. Fan, H. MKL1-induced lncRNA SNHG18 drives the growth and metastasis of non-small cell lung cancer via the miR-211-5p/BRD4 axis / H. Fan, J. Yuan, Y. Li, Y. Jia, J. Li, X. Wang, X. Li // *Cell death & disease*. - 2021. - Vol.12, N1. - P.128
256. Zheng, R. Long Noncoding Ribonucleic Acid SNHG18 Promotes Glioma Cell Motility via Disruption of  $\alpha$ -Enolase Nucleocytoplasmic Transport / R. Zheng, Q. Yao, X. Li, B. Xu // *Frontiers in genetics*. - 2019. - Vol.10. - P.1140
257. Zheng, R. Upregulation of Long Noncoding RNA Small Nucleolar RNA Host Gene 18 Promotes Radioresistance of Glioma by Repressing Semaphorin 5A / R. Zheng, Q. Yao, C. Ren, Y. Liu, H. Yang, G. Xie, S. Du, K. Yang, Y. Yuan // *International journal of radiation oncology, biology, physics*. - 2016. - Vol.96, N4. - P.877-87
258. Sadanandam, A. Secreted semaphorin 5A suppressed pancreatic tumour burden but increased metastasis and endothelial cell proliferation / A. Sadanandam, S.S. Sidhu, S. Wullschleger, S. Singh, M.L. Varney, C.S. Yang, A.E. Ashour, S.K. Batra, R.K. Singh // *British journal of cancer*. - 2012. - Vol.107, N3. - P.501-7
259. Chung, S.T. Osteoprotegerin mediates tumor-promoting effects of Interleukin-1beta in breast cancer cells / S.T. Chung, D. Geerts, K. Roseman, A. Renaud, L. Connelly // *Molecular cancer*. - 2017. - Vol.16, N1. - P.27
260. Biriken, D. Modulation of proliferation, apoptosis and IFN $\lambda$  inflammation of Caco-2 epithelial cells and THP-1 macrophage-like monocytes in LPS stimulated co-culture model / D. Biriken, N. Yazihan // *Bratislavske lekarske listy*. - 2021. - Vol.122, N2. P.138-44
261. Tsuruo, T. Establishment and properties of vincristine-resistant human myelogenous leukemia K562 / T. Tsuruo, H. Iida, E. Ohkochi, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai // *Gan*. - 1983. - Vol.74, N5. - P.751-8
262. McDermott, M. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies / M. McDermott, A.J. Eustace, S. Busschots, L. Breen, J. Crown, M. Clynes, N. O'Donovan, B. Stordal // *Frontiers in oncology*. - 2014. - Vol.4. - P.40

263. Ye, S.L. High expression of CD8 predicts favorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma: A cohort study / S.L. Ye, X.Y. Li, K. Zhao, T. Feng // *Medicine*. - 2017. - Vol.96, N15. - P.e6472
264. Guo, M. Expression and clinical significance of LAG-3, FGL1, PD-L1 and CD8+T cells in hepatocellular carcinoma using multiplex quantitative analysis / M. Guo, F. Yuan, F. Qi, J. Sun, Q. Rao, Z. Zhao, P. Huang, T. Fang, B. Yang, J. Xia // *Journal of translational medicine*. - 2020. - Vol.18, N1. - P.306
265. Chang, W.J. IFN $\lambda$  inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer / W.J. Chang, Y. Du, X. Zhao, L.Y. Ma, G.W. Cao // *World journal of gastroenterology*. - 2014. - Vol.20, N16. - P.4586-96
266. Sugimoto, T. Follicular Lymphoma: The Role of the Tumor Microenvironment in Prognosis / T. Sugimoto, T. Watanabe // *Journal of clinical and experimental hematopathology*. - 2016. - Vol.56, N1. - P.1-19
267. Petitprez, F. PD-L1 Expression and CD8+ T-cell IFN $\lambda$  are Associated with Clinical Progression in Patients with Node-positive Prostate Cancer / F. Petitprez, N. Fossati, Y. Vano, M. Freschi, E. Becht, R. Lucianò, J. Calderaro, T. Guédet, L. Lacroix, P.M.V. Rancoita, F. Montorsi, W.H. Fridman, C. Sautès-Fridman, A. Briganti, C. Doglioni, M. Bellone // *European urology focus*. - 2019. - Vol.5, N2. - P.192-6
268. Kaur, H.B. Association of tumor-IFN $\lambda$  T-cell density with molecular subtype, racial ancestry and clinical outcomes in prostate cancer / H.B. Kaur, L.B. Guedes, J. Lu, L. Maldonado, L. Reitz, J.R. Barber, A.M. De Marzo, J.J. Tosoian, S.A. Tomlins, E.M. Schaeffer, C.E. Joshu, K.S. Sfanos, T.L. Lotan // *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*. - 2018. - Vol.31, N10. - P.1539-52
269. Flammiger, A. High tissue density of FOXP3+ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer / A. Flammiger, L. Weisbach, H. Huland, P. Tennstedt, R. Simon, S. Minner, C. Bokemeyer, G. Sauter, T. Schlomm, M. Trepel // *European journal of cancer*. - 2013. - Vol.49, N6. - P.1273-9
270. Kuźnicki, J. Purification of myosin from Ehrlich ascites tumour cells (phosphorylation of its light chain and heavy chain) / J. Kuźnicki, A. Filipek // *The International journal of biochemistry*. - 1988. - Vol.20, N11. - P.1203-9
271. Koliijn, K. Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Prostate Cancer Demonstrates Enhanced Immune Evasion Marked by IDO1 Expression / K. Koliijn, E.I. Verhoef, M. Smid, R. Böttcher, G.W. Jenster, R. Debets, G.J. van Leenders // *Cancer research*. - 2018. - Vol.78, N16. - P.4671-9



272. Kovaleva, O.V. Immunosuppressive Phenotype of Esophagus Tumors Stroma / O.V. Kovaleva, M.A. Rashidova, D.V. Samoiloa, P.A. Podlesnaya, V.V. Mochalnikova, A. Gratchev // Analytical cellular pathology. - 2020. - Vol.2020. - P.5424780
273. Kovaleva, O.V. Macrophage Phenotype in Combination with Tumor Microbiome Composition Predicts RCC Patients' Survival: A Pilot Study. O.V. Kovaleva, P. Podlesnaya, M. Sorokin, V. Mochalnikova, V. Kataev, Y.A. Khlopko, A.O. Plotnikov, I.S. Stilidi, N.E. Kushlinskii, A. Gratchev // Biomedicines. - 2022. - Vol.10, N7. - P.1516
274. Barros, M.H. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages / M.H. Barros, F. Hauck, J.H. Dreyer, B. Kempkes, G. Niedobitek // PloS one. - 2013. - Vol.8, N11. - P.e80908
275. Hu, W. Alternatively activated macrophages are associated with metastasis and poor prognosis in prostate adenocarcinoma / W. Hu, Y. Qian, F. Yu, W. Liu, Y. Wu, X. Fang, W. Hao // Oncology letters. - 2015. - Vol.10, N3. - P.1390-6
276. Pellinen, T. Stromal FAP Expression is Associated with MRI Visibility and Patient Survival in Prostate Cancer / T. Pellinen, K. Sandeman, S. Blom, R. Turkki, A. Hemmes, K. Välimäki, J. Eineluoto, A. Kenttämies, S. Nordling, O. Kallioniemi, A. Rannikko, T. Mirtti // Cancer research communications. - 2022. - Vol.2, N3. - P.172-81
277. Erlandsson, A. M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer / A. Erlandsson, J. Carlsson, M. Lundholm, A. Fält, S.O. Andersson, O. Andrén, S. Davidsson // The Prostate. - 2019. - Vol.79, N4. - P.363-9
278. Yuan, Y. Characterization of transcriptome profile and clinical features of a novel immunotherapy target CD204 in diffuse glioma / Y. Yuan, Q. Zhao, S. Zhao, P. Zhang, H. Zhao, Z. Li, Y. Du, X. Tian, J. Lu // Cancer medicine. - 2019. - Vol.8, N8. P.3811-21
279. Suárez-Sánchez, F.J. Tumor-IFNitrating CD20+ B Lymphocytes: Significance and Prognostic Implications in Oral Cancer Microenvironment / F.J. Suárez-Sánchez, P. Lequerica-Fernández, J.P. Rodrigo, F. Hermida-Prado, J. Suárez-Canto, T. Rodríguez-Santamarta, F. Domínguez-Iglesias, J.M. García-Pedrero, J.C. de Vicente // Cancers. - 2021. - Vol.13, N3. - P.395
280. Thüring, M. The Prognostic Value of Indoleamine-2,3-Dioxygenase Gene Expression in Urine of Prostate Cancer Patients Undergoing Radical Prostatectomy as First Treatment of Choice / M. Thüring, R. Knuchel, L. Picchetta, D. Keller, T.S. Schmidli, M. Provenzano // Frontiers in immunology. - 2020. - Vol.11. - P.1244
281. Zahm, C.D. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and expression in prostate cancer following targeted immunotherapy / C.D. Zahm, L.E. Johnson, D.G. McNeel // Cancer immunology, immunotherapy. - 2019. - Vol.68, N10. - P.1661-9

282. Källberg, E. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity influence tumor growth in the TRAMP prostate cancer model / E. Källberg, P. Wikström, A. Bergh, F. Ivars, T. Leanderson // The Prostate. - 2010. - Vol.70, N13. - P.1461-70