

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, Стилиди Иван Сократович).

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор РАН

Грачев Алексей Николаевич

Официальные оппоненты:

Завалишина Лариса Эдуардовна, доктор биологических наук, профессор кафедры патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ельчанинов Андрей Владимирович, доктор медицинских наук, доцент по специальности «клеточная биология» (медицинские науки), заведующий лабораторией роста и развития научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского».

Ведущая организация:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) имени Н.П. Напалкова»

Защита диссертации состоится 28 марта 2024 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115522 г. Москва, Каширское шоссе, д.23).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115522, г. Москва Каширское шоссе, д.24) и на сайте www.ronc.ru

Автореферат разослан «.....».....202_ года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

В структуре онкологических заболеваний рак предстательной железы (РПЖ) 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. Успех применения данных препаратов отчасти определил важность микроокружения опухоли в прогрессии заболевания. На сегодняшний день применение иммунотерапевтических препаратов для лечения РПЖ ограничено. Отчасти это опосредовано тем, что данные об иммунном инфильтрате РПЖ и его роли в прогрессии заболевания немногочисленны и противоречивы. И, если для лечения гормоночувствительного локализованного РПЖ существует большое число эффективных терапевтических препаратов и пациенты с таким типом РПЖ характеризуются хорошим прогнозом, то методы лечения пациентов с метастатическим и гормонорезистентным РПЖ весьма ограничены. Такие пациенты являются кандидатами для проведения иммунотерапии. Следует отметить также, что длительная гормонотерапия РПЖ может приводить к развитию более злокачественного, гормонрезистентного фенотипа опухоли. В связи с чем исследования, направленные на изучение механизмов взаимодействия клеток микроокружения и опухоли предстательной железы, а также поиск иммунотерапевтических мишеней для данной нозологии представляют большой интерес.

Результаты многочисленных исследований показали, что макрофаги являются наиболее многочисленной популяцией опухоль-ассоциированных иммунных клеток, причем повышенная инфильтрация данных клеток в строме опухоли является маркером неблагоприятного прогноза для большинства солидных опухолей. Ввиду своей функциональной пластичности макрофаги в строме опухоли могут выполнять различные функции. 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 первого типа и в ответ на действие патоген-ассоциированных молекулярных структур. M1 макрофаги участвуют в воспалении, обладают цитотоксической и противоопухолевой активностью. В ответ на действие цитокинов, секретируемых Т-клетками второго типа, а также TGF- β , витамина D3 и глюкокортикоидов формируется иммуносупрессорный M2 фенотип макрофагов. Данные клетки обладают противовоспалительными функциями, способствуют регенерации тканей. Долгое время

считалось, что в контексте опухоли M2 макрофаги являются фактором неблагоприятного прогноза, способствуя прогрессии злокачественного новообразования, в то время как M1 макрофаги обладают как прямой, так и опосредованной цитотоксической активностью и способствуют элиминации опухоли. По способу взаимодействия с клеткой-мишенью цитотоксическую активность макрофагов можно классифицировать на контакт-зависимую и протекающую вне зависимости от прямого контакта. Запуск контакт-независимой цитотоксической активности макрофагов осуществляется в ответ на провоспалительные растворимые факторы, продуцируемые другими иммунными клетками, а также растворимые патоген-ассоциированные молекулы и реализуется за счет секреции макрофагами проапоптотических эффекторных молекул. Контакт-зависимый механизм подразделяют на антитело-зависимый и антитело-независимый. Последний протекает посредством распознавания макрофагами антигенов на поверхности опухолевых клеток, а также благодаря опосредованной таргетной клетки. Данное взаимодействие приводит к фагоцитозу и продукции эффекторных проапоптотических молекул. Антитело-зависимый механизм запускается в результате связывания Fc-рецепторов на поверхности макрофагов с антителами на поверхности таргетной клетки. Реализация данного механизма преимущественно осуществляется посредством фагоцитоза.

Тот факт, что макрофаги составляют большую часть опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток и понимание их роли в опухолевой прогрессии, сделали данные клетки перспективной мишенью для противоопухолевой терапии. Интересно, что стратегия активации цитотоксической активности макрофагов в строме опухоли не получила широкого распространения и применяется только совместно с другими видами терапии. 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.

Методология и методы исследования

В качестве методологической основы исследования был использован комплексный подход с применением современных клеточных и молекулярно-биологических технологий и методов исследования:

1. Для анализа цитотоксической активности макрофагов и формирования толерантности опухолевых клеток к данному воздействию автором исследования была разработана клеточная модель. Разработанная модель позволяет изучать контакт-зависимые и независимые от прямого контакта механизмы цитотоксической активности макрофагов, а также получать клоны опухолевых клеток, устойчивые к данному воздействию.

2. Анализ характеристик полученных устойчивых сублиний и исходных опухолевых клеток проводился *in vitro* и *in vivo*.

3. Полученные опухоли подкожных ксенографтов подвергали визуальной оценке, взвешиванию, гистологическому и иммуногистохимическому (ИГХ) окрашиванию.

4. Методы исследований *in vitro* включали в себя анализ динамики роста клеток, тест на образование колоний в условиях разреженной популяции, тест на миграцию клеток по градиенту концентраций факторов роста, вестерн-блот анализ, иммуноферментный и иммуноцитохимический анализ, тест чувствительности к действию цитостатиков, анализ ферментативной активности желатиназ.

5. Для изучения транскриптома проводили высокопроизводительное секвенирование с использованием геномных технологий (РНК секвенирование на платформе Illumina).

6. Биоинформатическая обработка результатов секвенирования транскриптома проводилась с использованием соответствующего программного обеспечения и баз данных.

7. Подтверждение результатов РНК секвенирования проводили при помощи ПЦР в режиме реального времени.

8. Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.9 (GraphPad Software Inc, США).

Научная новизна

В данном исследовании впервые на модели РПЖ изучено взаимодействие опухолевых клеток с цитотоксическими макрофагами при длительной экспозиции посредством как контакт-

зависимого, так и контакт-независимого антитело-независимого механизма. Для этого автором исследования разработана уникальная клеточная модель сокультивирования *in vitro* цитотоксических макрофагов с опухолевыми клетками. Разработанная клеточная модель позволяет как изучать механизмы цитотоксической активности макрофагов, так и получать опухолевые клетки, устойчивые к данному воздействию. Впервые описаны механизмы приобретения устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов.

Результаты проведенного исследования могут лечь в основу разработки новых иммунотерапевтических стратегий, которые помогут преодолеть проблему резистентности опухолевых клеток к иммунотерапии.

Теоретическая и практическая значимость

В данной работе показан 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.

Личный вклад

Автор самостоятельно провела тщательный анализ научной литературы по теме диссертации, изучила степень разработанности проблемы, принимала непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке плана исследования. Автором проведены экспериментальная реализация плана исследования, анализ и обобщение полученных данных, подготовлены публикации, полностью отражающие все полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены лично автором на всероссийских и международных научных конференциях.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, 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.)».

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.

Внедрение результатов исследования

Разработанная в ходе диссертационной работы клеточная модель используется в научно-исследовательской деятельности НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для изучения механизмов развития устойчивости опухолевых клеток различных нозологий к цитотоксическому действию макрофагов. Разработанная клеточная модель описана в опубликованных научных статьях, доступных для отечественных и зарубежных исследователей. Экспериментально-практический материал, полученный в работе, вносит существенный вклад в понимание механизмов опухолевой прогрессии, а также открывает новое направление исследований, направленных на повышение эффективности противоопухолевых препаратов, воздействующих на функциональную активность клеток опухолевой стромы.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 15 сентября 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.

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.).

Публикации

По материалам диссертации опубликована 31 работа, из них 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 17 тезисов в материалах научных конференций.

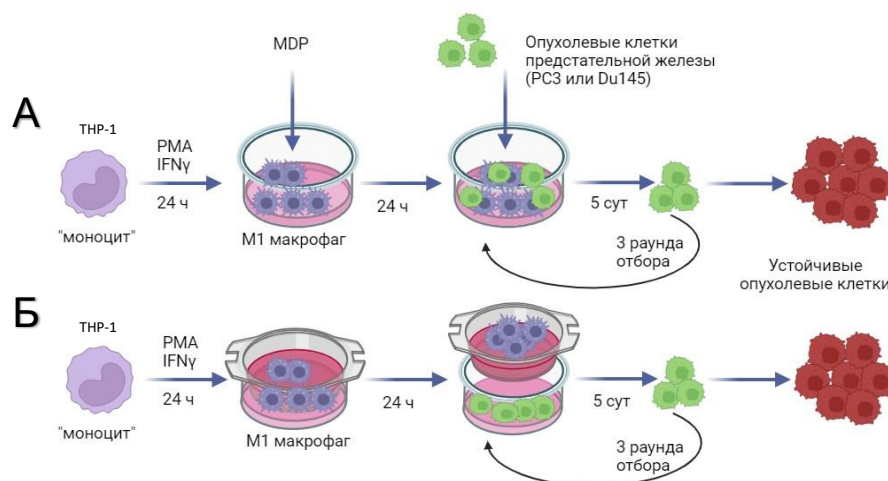
Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 146 страницах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 282 источника. Текст иллюстрирован 14 таблицами и 36 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В качестве экспериментальной модели для данного исследования использовались андроген-резистентные клеточные линии рака предстательной железы человека (PC3 и Du145). Для получения макрофагоподобных клеток использовались клеточные линии THP-1, HL-60, K562, U937. 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 клеткой-мишенью. С этой целью в первом случае опухолевые клетки сокультивировали с макрофагоподобными клетками в смешанной культуре. Для осуществления контакт-независимого механизма использовались культуральные вставки с полупроницаемой мембраной (Рисунок 1).



(А). Селекция опухолевых клеток при контакт-зависимом механизме действия макрофагов; (Б). Селекция опухолевых клеток при контакт-независимом механизме действия макрофагов

Рисунок 1 – Схема селекции устойчивых опухолевых клеток

Макрофаги получали методом дифференцировки клеток миелоидного происхождения при помощи PMA, $IFN\gamma$ и MDP (все реактивы фирмы Sigma-Aldrich). Подбор рабочих концентраций PMA, $IFN\gamma$, MDP проводился на основании литературных и собственных экспериментальных данных. Оценку продукции провоспалительных цитокинов дифференцированными миелоидными клетками оценивали методом ИФА при помощи наборов фирмы Вектор-Бест. По окончании дифференцировки перед добавлением опухолевых клеток макрофаги отмывали от дифференцирующих компонентов. Один опыт составляет 3 раунда сокультивирования: после первого раунда опухолевые клетки снова сокультивируются с вновь полученными макрофагами. Необходимость проведения именно трех раундов сокультивирования для развития устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов была выявлена экспериментальным способом. Устойчивость полученных сублиний опухолевых клеток (PC3, Du145) к цитотоксической активности определяли путем оценки их жизнеспособности в данных условиях относительно контрольных линий опухолевых клеток, не прошедших отбор.

Оценка роста опухолей *in vivo* из исходных опухолевых клеток и их устойчивых сублиний проводилась на моделях самок иммунодефицитных мышей Balb/c nude (коллекция питомника «Пушино») в возрасте 6–8 недель. Размер экспериментальных групп составлял 5 особей. Каждому животному подкожно прививалось по 5×10^6 клеток контрольных или устойчивых сублиний. 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 гистологического (гематоксилин-эозин) и ИГХ анализа с использованием первичных моноклональных антител фирмы ПраймБиоМед: Ki-67 (клон GM010) и PU.1 (клон PBM-4G6).

Функциональный анализ устойчивых сублиний опухолевых клеток *in vitro* включал анализ пролиферативной активности, тест на образование колоний в условиях разреженной популяции, тест на миграционную способность по градиенту сыворотки, анализ чувствительности опухолевых клеток к действию цисплатина при помощи МТТ-теста, анализ ферментативной активности желатиназ, приготовление белковых лизатов клеток и вестерн-блот анализ. Список используемых первичных антител для вестерн-блот анализа представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Список используемых первичных антител для вестерн-блот анализа

Наименование	Кат. Номер	Производитель, страна
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)	4696	Cell Signaling technology, США
10arvard10-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E)	4370	Cell Signaling technology, США
p38 MAPK (D13E1)	8690	Cell Signaling technology, США
10arvard10-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- β -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

Исследование экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода производили методом иммуноцитохимии (ИЦХ). В таблице 2 представлены антитела, используемые для ИЦХ.

Таблица 2 – 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

Исследование транскриптома опухолевых клеток проводили методом РНК секвенирования (RNA-seq) и ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR). Анализ данных секвенирования производился при помощи скрипта bbdutk, входящего в пакет BBTools, программы SortMeRNA, Hisat2 (v2.2.1), samtools, программных пакетов Rsubread, DESeq, 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. Функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов была проведена с использованием базы данных кластеров ортологичных групп генов (COG) (<http://gerontology-explorer.narod.ru>). Праймеры для ПЦР 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).

Исследование фенотипа стромальных иммунокомпетентных клеток РПЖ и их ассоциация с клинико-морфологическими характеристиками заболевания проводился на материале, полученном от 30 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 на основании морфологического исследования в патологоанатомическом отделе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Гистотип всех образцов – аденокарцинома. Описание исследуемой выборки представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Общая характеристика исследуемой выборки пациентов с раком предстательной железы

Показатель	Число пациентов, абс. (%)
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%)

Анализ фенотипа стромальных клеток производился методом ИГХ. Список первичных антител, используемые в анализе, указаны в таблице 4.

Таблица 4 – Список использованных первичных антител для ИГХ

Наименование	Производитель, страна	Разведение
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

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 $p < 0,05$.

Результаты исследования

Подбор миелоидных клеток

Миелоидные клетки линии THP-1, HL-60, U937 и K562 подвергали дифференцировке при помощи PMA, IFN γ и MDP. Для подтверждения M1 фенотипа измеряли уровень продукции провоспалительных цитокинов методом ИФА. Результаты проведенного

исследования показали, что макрофагоподобные клетки, полученные путем дифференцировки миелоидных клеток линий ТНР-1 и HL-60, продуцируют наибольшее количество исследуемых цитокинов. В связи с чем далее была произведена оценка цитотоксической активности макрофагоподобных клеток, полученных из линий ТНР-1 и HL-60, в условиях сокультивирования с опухолевыми клетками (Рисунок 2).

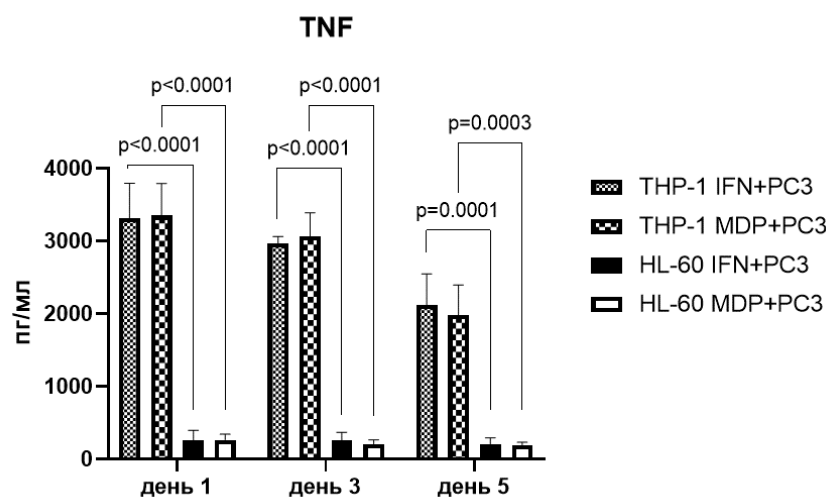
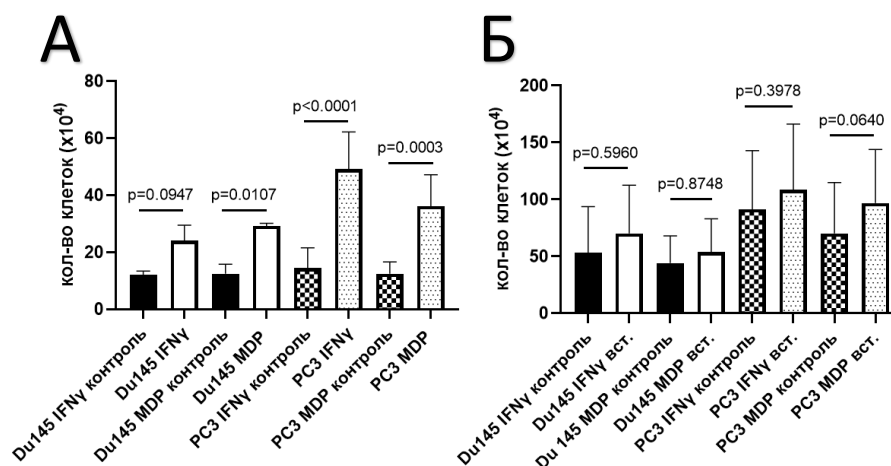


Рисунок 2 – Оценка концентрации TNF методом ИФА в культуральной среде на 1-е, 3-е и 5-е сутки сокультивирования макрофагоподобных и опухолевых клеток РС3

На основании полученных данных для дальнейшей работы была выбрана клеточная линия ТНР-1.

Получение опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов

В результате сокультивирования опухолевых клеток предстательной железы (РС3, Du145) с цитотоксическими макрофагами, полученными в результате дифференцировки клеток линии ТНР-1 были получены сублинии РС3 и Du145, обладающие большей жизнеспособностью в условиях сокультивирования с цитотоксическими макрофагами в сравнении с исходными опухолевыми клетками (Рисунок 3).



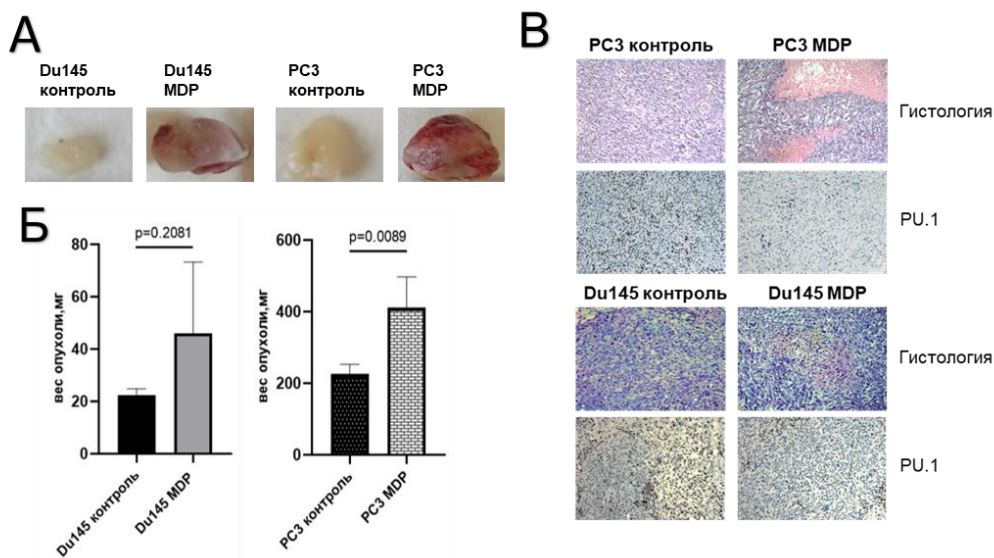
(А). Устойчивость опухолевых клеток, полученных в результате контакт-зависимого сокультивирования с макрофагами (Б). Устойчивость опухолевых клеток, полученных в результате контакт-независимого сокультивирования Контрольные клетки – это исходные клетки, которые не проходили отбор с цитотоксическими макрофагами.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

Рисунок 3 - Результаты сравнения устойчивости сублиний и исходных опухолевых клеток предстательной железы к цитотоксической активности макрофагов

Полученные результаты дают основу полагать, что при контакт-независимом механизме взаимодействия устойчивость опухолевых клеток к цитотоксическому действию макрофагов не развивается. Это предполагает принципиальное значение межклеточных взаимодействий или тесной ко-локализации при сокультивировании макрофагов и опухолевых клеток для селекции устойчивых злокачественных клонов. В связи с этим, дальнейшие исследования проводились с устойчивыми сублиниями опухолевых клеток, полученных в результате контакт-зависимого метода сокультивирования с макрофагами.

Исследования *in vivo*

Для исследования использовались устойчивые сублинии опухолевых клеток PC3 и Du145, полученные при контактном сокультивировании с макрофагами, дифференцированными при помощи PMA, IFN γ и MDP (PC3 MDP, Du145 MDP), так как эти сублинии продемонстрировали достоверно значимую разность в устойчивости к цитотоксическому действию макрофагов (Рисунок 4). Продолжительность эксперимента составляла 3 недели. Образовавшиеся опухоли использовали для определения их терминального веса (Рисунок 4А, Б), гистологического и ИГХ исследования (Рисунок 4В).



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

Рисунок 4 – Характеристики образовавшихся подкожных ксенографтов

Результаты гистологического исследования показали, 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 веретеноклеточное строение, инфильтративный периневральный рост. Все эти характеристики указывают на повышенную степень злокачественности опухоли. Результаты проведенного ИГХ исследования показали, что для опухолевых клеток всех исследуемых линий 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 ядерный антиген пролиферативной активности Ki-67, выявлено не было. Для оценки метастатического потенциала исследуемых клеток из экспериментальных животных также были извлечены легкие, печень и регионарные лимфоузлы. Далее был проведен гистологический и ИГХ анализ, в результате которого верифицируемые метастазы обнаружены не были.

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 и IFN γ (PC3 IFN γ) и PMA, IFN γ и MDP (PC3 MDP). 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 γ по сравнению с контролем (Рисунок 5А). 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 5Б). Среди них, экспрессия 148 генов была повышена, а 196 генов находились в отрицательной регуляции.

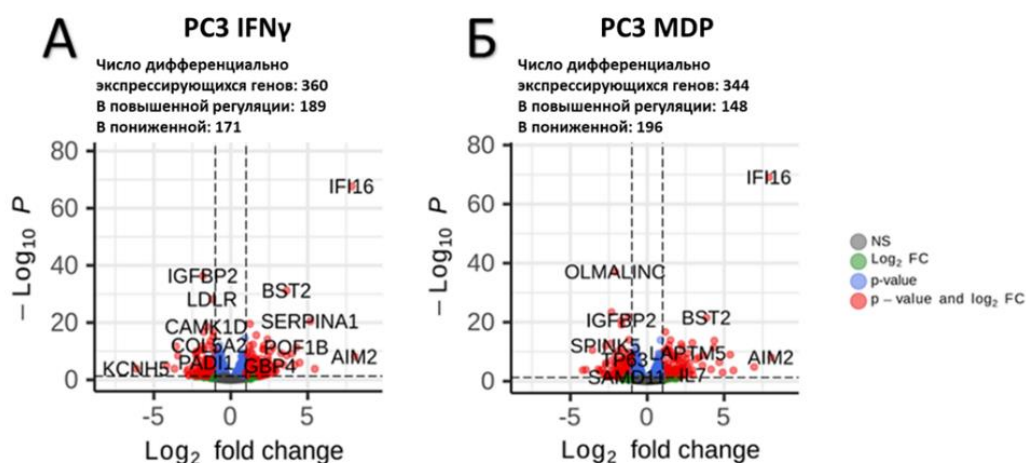


Рисунок 5 – Диаграммы рассеяния, отображающие дифференциальную экспрессию генов с достоверной разностью между библиотеками PC3 и PC3 IFN γ (А), PC3 и PC3 MDP (Б)

Необходимо отметить, что более половины генов, как повышающих, так и понижающих экспрессию были одинаковы для библиотек PC3 MDP и PC3 IFN γ . Более того, дифференциально экспрессирующихся генов с достоверно (\log_2 fold change >1, FDR corrected p-value<0.05) изменяющейся экспрессией между библиотеками PC3 IFN γ и PC3 MDP обнаружено не было. Данное наблюдение говорит в пользу того, что цитотоксическая активность макрофагов, вне зависимости от природы активирующего стимула, запускает схожие программы ухода от иммунологического надзора в опухолевых клетках.

Далее производился анализ насыщенности метаболических путей на основе базы данных KEGG. На рисунке 6 отображена насыщенность метаболических путей, общих для библиотек PC3 IFN γ и PC3 MDP, в сравнении с контролем.

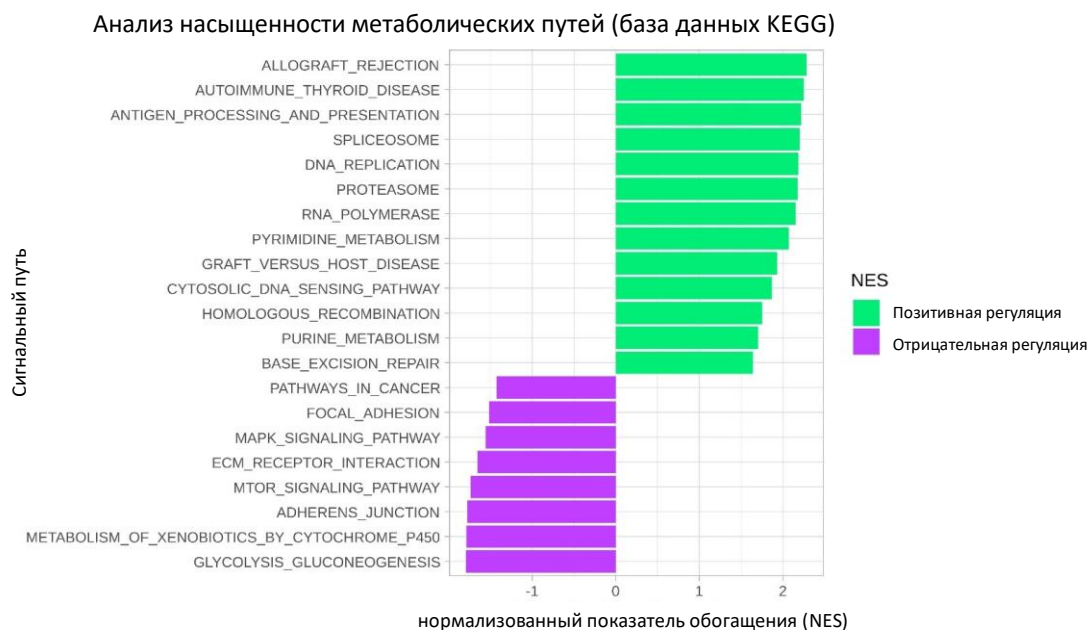


Рисунок 6 - Результаты анализа обогащения генных онтологий общих дифференциально экспрессирующихся генов для библиотек PC3 IFN γ и PC3 MDP по сравнению с контролем

В совокупности, опухолевые клетки, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, характеризовались пониженной экспрессией генов, вовлечённых в процессы клеточной коммуникации и адгезии, а также генов, ассоциированных с метаболизмом поликетидов, алкогольных соединений и ксенобиотиков. Метаболические пути с положительной степенью насыщения были ассоциированы с процессами хранения, передачи и реализации генетической информации и ответом на провоспалительные цитокины.

Затем была произведена валидация данных, полученных при помощи транскриптомного секвенирования, методом qRT-PCR. Сопоставимость данных, полученных методом RNA-seq и qRT-PCR, оценивалась при помощи определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. 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.

Проанализировав данные дифференциальной экспрессии генов библиотек PC3 IFN γ и PC3 MDP в сравнении с контролем, с учетом литературных данных, были выявлены гены - потенциальные детерминанты устойчивости к цитотоксической активности, отвечающие за формирование более злокачественного фенотипа опухолевых клеток. Далее был произведен

анализ экспрессии выбранных генов в клетках линии Du145, PC3 и их устойчивых сублиниях методом qRT-PCR. Снижение экспрессии генов *HPGD*, *SPINK5*, *IGFBP3*, *PALMD*, *ALDH3A1* и повышение экспрессии гена *FLOT1* являлось универсальной характеристикой устойчивых сублиний PC3 и Du145.

Помимо анализа дифференциально экспрессирующихся генов, кодирующих белки, на основании данных RNA-seq дополнительно проведен анализ генов длинных некодирующих РНК (днРНК), экспрессия которых достоверно изменялась с приобретением опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагов. В таблице 5 представлены топ 10 днРНК с достоверно повышенной или пониженной экспрессией в сравнении с контролем в устойчивых сублиниях PC3.

Таблица 5 - Дифференциально экспрессирующиеся гены днРНК в устойчивых опухолевых клетках линии PC3 по сравнению с контролем (по данным RNA-seq)

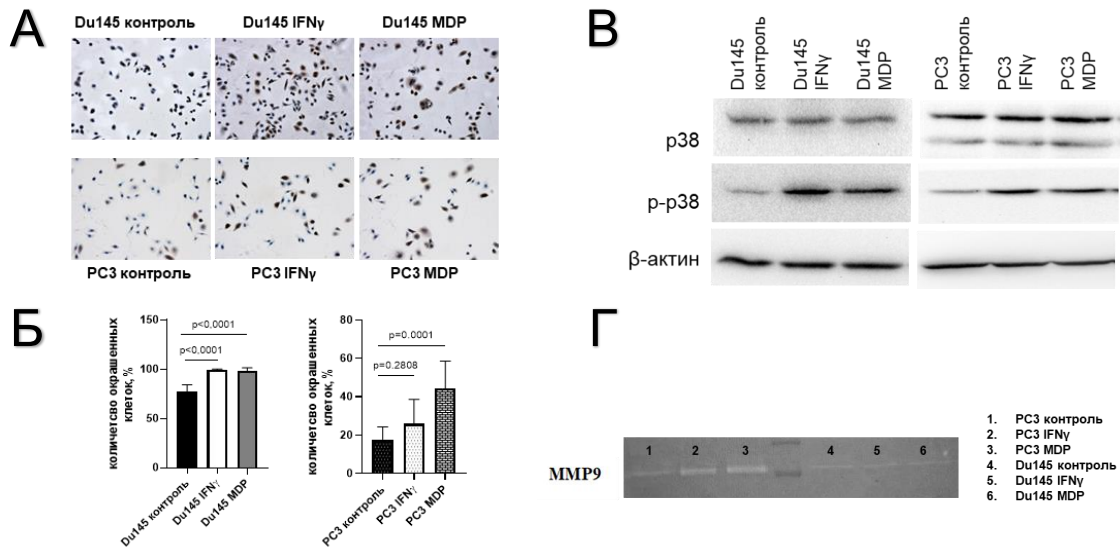
Ген	Название гена	PC3 IFN γ		PC3 MDP	
		Кратность изменения (Log2Fold change)	Достоверность (AdjPvalue)	Кратность изменения (Log2Fold change)	Достоверность (AdjPvalue)
<i>LINC02301</i>	lincRNA	2,74	0,004	2,93	0,001
<i>LINC00623</i>	lincRNA	1,82	7,85E-09	1,71	1,13E-07
<i>LCAL1</i>	lung cancer associated 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>	lncRNA LRP4 antisense RNA 1	-	-	-1,72	0,008
<i>LINC00685</i>	Antisense RNA	-1,85	0,014	-1,70	0,012
<i>HSD11B1-AS1</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

Роль большинства выявленных днРНК в опухолевой прогрессии еще не определена. Экспрессия днРНК также была исследована методом qRT-PCR в клетках линии PC3 и Du145 и их устойчивых сублиниях. Было выявлено, что уровень экспрессии днРНК *OLMALINC* и *SNHG18* статистически достоверно снижался в устойчивых сублиниях как PC3, так и Du145.

Характеристики устойчивых опухолевых клеток *in vitro*

В результате проведенных исследований был выявлен ряд особенностей, характерных для устойчивых опухолевых клеток обеих исследуемых линий. А именно, с приобретением устойчивости происходило повышение уровня экспрессии виментина, повышалась активность киназы p38 (Рисунок 7А-В). В случае клеток линии PC3 с приобретением устойчивости к цитотоксической активности макрофагов также наблюдалось увеличение уровня экспрессии желатиназы MMP9, однако для клеток линии Du145 уровень экспрессии данного белка оставался неизменным (Рисунок 7Г).



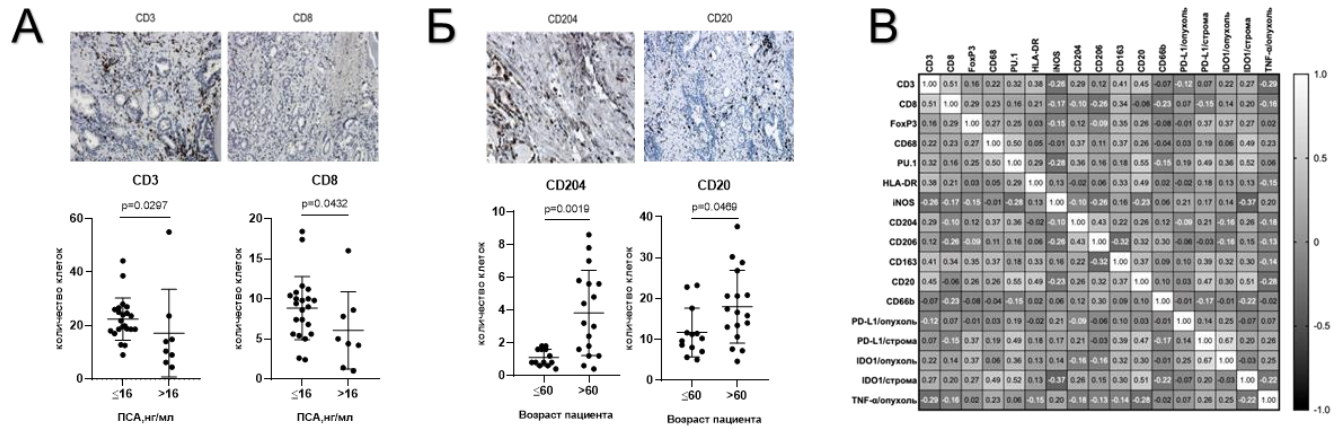
(А). Пример ИЦХ окрашивания клеточных препаратов с помощью антител к виментину. Увеличение – 100x (Б). Результаты статистического анализа экспрессии виментина в клеточных линиях PC3 и Du145 и их устойчивых субклинах (В). Вестерн-блот анализ уровня фосфорилирования белка p38 в клеточных линиях PC3 и Du145 и их устойчивых субклинах (Г). Желатиновая зимография кондиционированных сред, полученных от исследованных клеточных линий РПЖ

Рисунок 7 – Выявленные характеристики устойчивых опухолевых клеток *in vitro*

В ходе сравнительного исследования *in vitro* характеристик исходных и устойчивых субклин PC3 и Du145 статистически достоверной разности в скорости пролиферации, миграции по градиенту сыворотки, колониобразованию, чувствительности к цисплатину, уровне экспрессии белков β -катенина, гладкомышечного актина, E-кадгерина и PD-L1, а также активности киназ Erk, Akt выявлено не было.

Исследование фенотипа стромы рака предстательной железы

В результате исследования было выявлено, что у пациентов с более низким содержанием простат-специфического антигена (ПСА) в крови, уровень CD8⁺ клеток в строме был выше (Рисунок 8А). CD8 является общепринятым маркером цитотоксических Т-лимфоцитов. ПСА является стандартным клиническим и диагностическим маркером РПЖ. Также впервые была выявлена ассоциация числа иммунных клеток в строме рака предстательной железы с возрастом пациента. А именно, у пациентов более старшего возраста наблюдалось повышенное содержание CD204⁺ и CD20⁺ клеток (Рисунок 8Б). CD204 используется в качестве маркера иммуносупрессорных макрофагов, а CD20 для идентификации В-лимфоцитов. На основании результатов корреляционного анализа содержания различных маркеров стромы была выявлена ассоциация экспрессии иммуносупрессорных молекул PD-L1 и IDO1 с числом Т-регуляторных клеток и иммуносупрессорных макрофагов (Рисунок 8В).



(А). Пример ИГХ окрашивания и статистический анализ ассоциации экспрессии маркеров CD3 и CD8 в строме РПЖ с уровнем ПСА в крови пациентов (Б). Пример ИГХ окрашивания и статистический анализ ассоциации экспрессии маркеров CD204 и CD20 в строме РПЖ с возрастом пациентов (В). Корреляционный анализ содержания различных маркеров в тканях опухолей предстательной железы

Рисунок 8 – Особенности стромы рака предстательной железы

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 сублинии 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.

Практические рекомендации

Разработанную в рамках настоящего исследования клеточную модель можно использовать для изучения цитотоксической активности макрофагов и получения клонов опухолевых клеток, устойчивых к данному воздействию. Для получения макрофагоподобных клеток M1 фенотипа рекомендуется использовать клетки линии ТНР-1. Индукцию цитотоксической активности рекомендуется проводить при помощи 67 нМ РМА, 0,1 мкг/мл IFN γ и 0,1 мкг/мл MDP. Для подтверждения M1 фенотипа макрофагов в модели рекомендуется измерять количество продуцируемых провоспалительных цитокинов. Клоны опухолевых клеток, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, рекомендуется получать при контактном сокультивировании с макрофагами. Для развития устойчивости необходимо как минимум три раунда сокультивирования. Транскрипционный фактор PU.1 можно использовать в качестве пан-макрофагального маркера при анализе стромы РПЖ.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные данные расширяют представление о механизмах формирования устойчивости опухолевых клеток к цитотоксическому действию макрофагов и позволяют определить дальнейшие перспективы разработки данной темы:

- анализ вклада каждого из факторов цитотоксической активности макрофагов на формирование устойчивости опухолевых клеток и поиск потенциальных терапевтических мишеней, позволяющих вернуть чувствительность опухолевых клеток к цитотоксическому действию макрофагов;
- анализ роли днРНК и дифференциально экспрессированных генов в формировании злокачественного потенциала опухолевых клеток и разработка подходов регулирования их активности;
- разработка персонализированных подходов в лечении рака предстательной железы с применением иммунотерапевтического воздействия.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Подлесная, П.А. Механизм развития толерантности макрофагов в микроокружении опухоли / П.А. Подлесная, О.В. Ковалева, А.А. Петренко, А.Н. Грачев // Клеточные технологии

в биологии и медицине. – 2021. – №4. – С. 250-254.

2. **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. – №1. - Т.9. – С. 8-19.

3. **Podlesnaya, P.A.** Cytotoxic activity of macrophages as a tumor malignancy factor / P.A. Podlesnaya, O.V. Kovaleva, A.A. Petrenko, A.N. Gratchev // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2022. – №1. - V.174. – P. 147-151.

4. 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, № 2. – С. 29-35.

5. 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. – V. 20, No 5424780

6. Kovaleva, O. Lung Microbiome Differentially Impacts Survival of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Depending on Tumor Stroma Phenotype / O. Kovaleva, **P. Podlesnaya**, M. Rashidova, D. Samoiloa, A. Petrenko, I. Zborovskaya, V. Mochalnikova, V. Kataev, Y. Khlopko, A. Plotnikov, A. Gratchev // Biomedicines. – 2020. – V. 8, No 9. – P. 349.

7. 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.M. Mochalnikova, A. Gratchev // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22, No 1. – P. 450.

8. Kovaleva, O. Prognostic Significance of the Microbiome and Stromal Cells Phenotype in Esophagus Squamous Cell Carcinoma / O. Kovaleva, **P. Podlesnaya**, M. Rashidova, D. Samoiloa, A. Petrenko, V. Mochalnikova, V. Kataev, Y. Khlopko, A. Plotnikov, A. Gratchev // Biomedicines. – 2021. – V. 9, No 7. – P. 743.

9. Стилиди, И.С. Белки sPD-1/sPD-L1 при немелкоклеточном раке легкого и плоскоклеточном раке пищевода / И.М. Стилиди, О.В. Ковалева, А.Н. Грачев, Е.М. Чевкина, **П.А. Подлесная**, П.В. Царапаев, Э.А. Сулейманов, Н.Е. Кушлинский // Бюллетень сибирской медицины. – 2022. – Т. 21, № 3. – С. 96-104.

10. Kovaleva, O.V. Macrophage phenotype predicts RCC patient's survival and tumor microbiome composition / O.V. Kovaleva, **P. Podlesnaya**, M. Sorokin, V. Mochalnikova, V. Kataev, Y.A. Khlopko, A.O. Plotnikov, N.E. Kushlinskii, A. Gratchev // Biomedicines. – 2022. – V. 10, No 7. – P. 1516.