

На правах рукописи

ПОНОМАРЕВ АЛЕКСАНДР ВАСИЛЬЕВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ДВУХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ АРАНОЗЫ НА ЗАЩИТНЫЕ
СИСТЕМЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

МОСКВА – 2019

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).

Научные руководители:

доктор биологических наук
кандидат фармацевтических наук

Мисюрин Андрей Витальевич
Барышникова Мария Анатольевна

Официальные оппоненты:

Орел Надежда Федоровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии и паллиативной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Шмаров Максим Михайлович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «19» марта 2020 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2020 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Метастатическая меланома является наиболее агрессивным злокачественным новообразованием кожи. Для лечения метастатической меланомы применяют химиотерапию, таргетную терапию, хирургию и иммунотерапию. Несмотря на то, что химиотерапия является признанным методом лечения метастатической меланомы, к противоопухолевым препаратам часто развивается лекарственная устойчивость, которая приводит к неэффективности терапии. Поэтому поиск способов преодоления лекарственной резистентности продолжает оставаться актуальной задачей.

Для лечения меланомы кожи зарегистрирована лекарственная форма аранозы «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций». В лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России создана новая лекарственная форма аранозы – «липосомальная» (Козеев, 2012). Известно, что липосомальные формы противоопухолевых препаратов способны преодолевать множественную лекарственную устойчивость. Однако механизм, с помощью которого это происходит, до сих пор до конца не ясен.

В исследованиях (Грищенко, 2014) было показано, что «липосомальная» араноза *in vitro* оказывает воздействие на клеточные линии, устойчивые к аранозе «лиофилизату для приготовления раствора для инъекций» (араноза-лио).

Возможно, липосомы вызывают гибель опухолевых клеток за счет воздействия на сигнальные пути, обеспечивающие защиту опухолевых клеток, в частности, на те, в которые вовлечены сигнальные белки p53 и NF-κB. Кроме того, мы предположили, что химиотерапия разными лекарственными формами аранозы может оказывать воздействие на иммунную противоопухолевую защиту.

В последние годы значительное развитие получила иммунотерапия опухолей. Разрешены к применению или находятся на последних фазах клинических испытаний новые иммунотерапевтические препараты для лечения меланомы, в том числе блокаторы взаимодействия молекул PD-1 с PD-L1/PD-L2.

Данные препараты показывают хорошие результаты по сравнению с традиционной химиотерапией опухолей (Guan, 2016). Было замечено, что их эффективность зависит от наличия или отсутствия молекулы PD-L1 в опухоли (Patel, 2015). Возможно, иммунологические механизмы, индуцирующие экспрессию PD-L1, могут также быть связаны с лекарственной устойчивостью к химиотерапии. Часто не понятно, будет ли химиотерапия способствовать иммуногенности опухоли, или же, наоборот, окажет иммуносупрессивный эффект, который может нивелировать положительное воздействие иммунотерапии. Для большинства таких комбинаций требуются тщательные клинические исследования.

Цель работы

Изучение воздействия на защитные системы опухолевых клеток разных лекарственных форм препарата из класса нитрозомочевины аранозы («липосомальной» и «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций»).

Задачи исследования

1. Изучить мутационный статус *TP53* в клеточных линиях метастатической меланомы человека.
2. Изучить изменение экспрессии мРНК *TP53* и *MDM2* в клеточных линиях метастатической меланомы человека при воздействии «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» форм аранозы.
3. Изучить изменение экспрессии мРНК *NFkB1*, *NFkB2*, *MyD88* в клеточных линиях метастатической меланомы человека при воздействии «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» форм аранозы.
4. Изучить изменение экспрессии мРНК *PD-L1*, *PD-L2* в клеточных линиях метастатической меланомы человека при воздействии «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» форм аранозы.

Методы и методология исследования

Методологическую основу исследования составили труды российских ученых в области исследования сигнальных путей клеточной гибели и

механизмов развития лекарственной устойчивости Б.П. Копнина, А.Ю. Барышникова, Д.Ю. Блохина, Т.А. Богуш и др. При проведении исследования использованы методы: работа с клеточными культурами, FISH диагностика, секвенирование по Сенгеру, количественная ПЦР, проточная цитофлуориметрия. Применялись математические методы анализа и обработки результатов, полученных в ходе экспериментальной работы.

Научная новизна

В настоящей работе впервые показано, что лекарственные формы аранозы («липосомальная» и «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций») при одинаковом действующем веществе по-разному влияют на экспрессию мРНК сигнальных белков *MDM2* и *NFκB1* в клеточных линиях метастатической меланомы: араноза «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» статистически значимо повышает экспрессию мРНК *MDM2* – фактора резистентности опухоли к химиотерапии по сравнению с «липосомальной», воздействие «липосомальной» аранозы повышает экспрессию мРНК *NFκB1* – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК метилированием по сравнению с «лиофилизатом для приготовления раствора для инъекций». Впервые показано, что араноза «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» повышает экспрессию мРНК *PD-L2* в клеточных линиях метастатической меланомы по сравнению с «липосомальной».

Теоретическая и практическая значимость

Получены новые данные о механизме действия препарата из группы производных нитрозомочевины аранозы. Араноза «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» запускает механизмы устойчивости к химиотерапии, через повышение экспрессии мРНК *MDM2*, и к цитотоксическим лимфоцитам, через повышение экспрессии мРНК *PD-L2*. Однако, в липосомальной лекарственной форме аранозы, наоборот, запускает механизмы, способствующие чувствительности клеток к терапии, через повышение экспрессии мРНК *NFκB1* – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК, и снижает экспрессию мРНК *PD-L2*, что может повысить чувствительность опухоли

к цитотоксическим лимфоцитам. Полученные результаты могут быть использованы для обоснования применения липосомальной формы аранозы для лечения метастатической меланомы.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно провел тщательный анализ научной литературы, изучил степень разработанности проблемы, на основании чего были сформулированы цель и задачи исследования.

Соискатель самостоятельно планировал и выполнял эксперименты, осуществлял статистический анализ полученных результатов. Все научные результаты, содержащиеся в диссертации, получены автором лично и представляют собой законченное самостоятельное научное исследование.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – онкология («биологические науки») и области исследования п.2. «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)».

Положения, выносимые на защиту

1. Мутации и делеции гена *TP53* не являются фактором чувствительности к аранозе для клеточных линий меланомы.
2. Уровень экспрессии мРНК генов *TP53*, *MyD88*, *NFkB2*, *PD-L1* в клетках меланомы не имеет существенных различий после воздействия «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» аранозы.
3. Экспрессия мРНК *MDM2* выше после воздействия на клетки меланомы «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» по сравнению с «липосомальной» аранозой.
4. Экспрессия мРНК *NFkB1* выше после воздействия на линии меланомы «липосомальной» аранозы по сравнению с «лиофилизатом для приготовления раствора для инъекций».

5. Экспрессия мРНК *PD-L2*, отвечающего за уклонение от иммунного надзора, выше после воздействия на клетки меланомы «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» по сравнению с «липосомальной» аранозой.

Внедрение результатов исследования

Материалы диссертационной работы были представлены на XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» имени А.Ю. Барышникова, Москва, 2018. Материалы работы могут быть использованы для обоснования дальнейшего изучения возможностей применения липосомальной формы аранозы для лечения метастатической меланомы.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 2 апреля 2019 года на совместной научной конференции лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, лаборатории клеточного иммунитета, лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов, лаборатории иммунофармакологии, лаборатории разработки лекарственных форм, лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ ЭДиТО, лаборатории клинической иммунологии опухолей НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

Материалы диссертационных исследований изложены в 5 научных работах, из них 3 статьи опубликованы в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 236 источников, в том числе 213 – на иностранном языке. Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста, содержит 19 рисунков и 12 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали 19 клеточных линий метастатической меланомы кожи человека из банка клеточных культур лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Это клеточные линии mel P, mel Kor, mel Mtp, mel Il, mel Is, mel Si, mel Me, mel Gus, mel Z, mel Ksen, mel Hn, mel Gi, mel Ibr, mel R, mel Rac, mel Ch, mel Bgf, mel H, mel Cher. Они различались по степени дифференцировки и наличию или отсутствию мутаций BRAF, NRAS [Михайлова, 2017]. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамина, пенициллин (25 000 Ед) – стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ (полная среда). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

Исследуемым противоопухолевым препаратом была араноза в двух лекарственных формах:

1) «араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 500 мг» (араноза-лио), производства филиала «Наукопрофи» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (табл. 1)

2) «липосомальная» лекарственная форма аранозы (липосомальная араноза), предоставленная лабораторией разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (табл. 2).

Кроме лекарственных форм аранозы исследовали воздействие на клетки пустых липосом того же состава и концентрации, которые использовались для липосомальной аранозы.

Таблица 1 – Состав аранозы, лиофилизата для приготовления раствора для инъекций, на 1 флакон

Компонент	Количество, г
Араноза субстанция	0,5
Поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский	0,5
Кислота сорбиновая	0,004

Таблица 2 – Состав липосомальной аранозы на 1 флакон

Компонент	Количество, г
Фосфатидилхолин	1,0
Холестерин	0,1
ФЭ-ПЭГ-2000	0,05
Араноза субстанция	0,2
Сорбиновая кислота	0,008

Для оценки цитотоксической активности использовали МТТ-тест, впервые предложенный Т. Мосманном [Mossman, 1983]. Оптическую плотность раствора формазана определяли на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций Multiskan EX (Thermo Labsystems) при длине волны 540 нм. Вычисления проводились в программе MS Excel.

Методом FISH-гибридизации изучили состояние короткого плеча 17-й хромосомы, кодирующей белок p53. Для постановки FISH-гибридизации применялись зонды ONp53(17p13)/SE17 (Kreatech), согласно инструкции производителя.

Секвенирование экзонов гена *TP53* проводили с использованием набора реактивов BigDye Terminator 3.1v Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) с учетом рекомендаций производителя. Для проведения секвенирующей реакции в прямом направлении использовали праймеры:

Праймеры для секвенирования экзонов 5 и 6 - 5-6F TGTTCACTTGTGCCCTGACT и 5-6R GGAGGGCCACTGACAACCA

Праймеры для секвенирования экзона 7 - 7F ACTGGCCTCATCTTGGGCCT
и 7R GTCAGAGGCAAGCAGAGGCT

Праймеры для секвенирования экзона 8 - 8F
TAAATGGGACAGGTAGGACC и 8R TCCACCGCTTCTTGTCTGC.

После проведения секвенирующих реакций продукты ПЦР очищали при помощи набора BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). Продукты секвенирующей реакции разделяли и анализировали с использованием генетического анализатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

Для подготовки клеточного материала и выделения общей РНК клетки снимали с культуральных флаконов 0,02% раствором Версена, объемом 2 мл, содержащим 0,25 трипсина. Клетки находились в трипсине 2 мин. Добавляли 10 мл буфера STE и центрифугировали в течение 5 мин при 800 об/мин. Удаляли супернатант, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл физиологического раствора и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК. Выделение РНК из предварительно обработанных образцов производилось по протоколу, предложенному Р. Chomczynski и N. Sacchi [Chomczynski, 2006].

Уровень экспрессии мРНК генов *TP53*, *MDM2*, *NFkB1*, *NFkB2*, *MyD88*, *PD-L1*, *PD-L2* оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием двукратной реакционной смеси (40 мМ Tris-HCl, 100 мМ KCl, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидов и 0,2 мМ β-меркаптоэтанола) и Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 мкл кДНК, 250 нМ прямого, 250 нМ обратного праймера и 140 нМ флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с использованием программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *TP53*, *MDM2*, *NFkB1*, *NFkB2*, *MyD88*, *PD-L1* и *PD-L2*, доступных на интернет-ресурсе <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (табл. 3). В каждом образце был исследован уровень экспрессии анализируемых генов. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

Таблица 3 – Праймеры, зонды и последовательности нуклеотидов

Праймеры и зонды	Последовательности нуклеотидов
TP53-QR	CGCACCTCAAAGCTGTTCCG
TP53-QF	GCATGAACCGGAGGCCCATC
TP53probe	R6G-CTGGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGA-BHQ1
MDM2-QR	GTGCACCAACAGACTTTAATAACTTCA
MDM2-QF	TGTAACCACCTCACAGATTCCAGCTT
MDM2probe	R6G-AACAAGAGACCCTGGTTAGACCAAAGCCA-BHQ1
NFKB1-QR	AATTGGGCATGAGCTTCTGA
NFKB1-QF	TGGAAACTAGTGAACCAAAACCTT
NFKB1probe	R6G-CCTGAAATCAAAGATAAAGAAGAAGTGCA-BHQ1
NFKB2-QR	ATCCAGGCACTCAGGGCTTC
NFKB2-QF	CTGTGCCCCAGCTGTTGCAT
NFKB2probe	R6G-CCTGACTTTGAGGGACTGTATCCAGTACA-BHQ1
MYD88-QR	CCT TGT ACT TGA TGG GGA TCA G
MYD88-QF	AAT GTG ACT TCC AGA CCA AAT TTG C
MYD88probe	R6G-CTCAGCCTCTCTCCAGGTGCCCATCAGAAG-BHQ1
PDL1 QR	TCCACAACCAAAATTCTTTG
PDL1 QF	TGCCGACTACAAGCGAATTA
PDL2 QR	CCTTTAGGATGTGAGTGTTT
PDL2 QF	CTGGGACTACAAGTACCTGA

Данные эксперименты проводили на приборе DTLite («ДНК-технология», Россия). Программа проведения реакций была следующей: предварительная обработка в течение 5 мин при 94 °С и 45 циклов денатурации в течение 10 с при 94 °С с последующим отжигом праймеров и синтезом в течение 12 с при 60 °С.

Для реакции иммунофлуоресценции клетки разносили в пробирки по 50 мкл (300 тыс. клеток) и добавляли по 20 мкл антител к PD-L1 (CD274FITC, 558065, BD Pharmingen™) и к PD-L2 (CD273APC, 557926, BD Pharmingen™).

Инкубировали в течение 30 минут, после чего дважды отмывали в PBS. Подсчет проводили на проточном цитофлуориметре FACSCantoII, с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson).

Для статистического анализа данных использовались непараметрические критерии. Для сравнения уровня экспрессии генов *TP53*, *MDM2*, *MyD-88*, *NFkB1*, *NFkB2*, *PD-L1* и *PD-L2* в клетках меланомы при воздействии различных лекарственных форм аранозы использовался критерий Уилкоксона, в том случае если выборка была более 5. В иных расчетах применялся критерий Манна-Уитни. Для статистического анализа данных FISH-исследования, брались значения превышающие 5%, так как меньшие значения делеций могут быть ложноположительными. Для анализа и построения графиков применялась программа STATISTICA v.7. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение ИК50 исследуемых препаратов

С помощью МТТ-теста определили чувствительность клеточных линий метастатической меланомы к двум лекарственным формам аранозы. Клеточные линии имели разную чувствительность к исследуемым препаратам. Все клеточные линии были более чувствительны к липосомальной аранозе, чем к аранозе-лио $p=0,0002$. Методом Fish-гибридизации изучили состояние короткого плеча 17-й хромосомы, кодирующей белок p53. Оказалось, что практически все клеточные линии были неоднородны по наличию делеций короткого плеча 17-й хромосомы (табл. 4). Также методом секвенирования по Сенгеру изучили наличие точечных мутаций *TP53* в клеточных линиях метастатической меланомы (табл. 4). С помощью критерия Манна-Уитни был проведен поиск связи между значением ИК50 препаратов и наличием генетических изменений в клеточных линиях. Не обнаружено статистически значимой связи наличия делеций *TP53* и значения ИК50 для аранозы-лио ($p=0,0869$) и липосомальной аранозы ($p=0,5022$) (табл. 4).

Таблица 4 – ИК50 аранозы и экспрессия *TP53* в клеточных линиях метастатической меланомы

Клеточные линии	ИК50 аранозы-лио, мкг/мл	ИК50 липосомальной аранозы, мкг/мл	Наличие мутации ДНК-связывающего домена	Процент клеток с делециями локуса гена <i>TP53</i> от общей популяции
mel Kor	500	225	отсутствие	0
mel Rac	1250	600	отсутствие	0
mel Is	1300	650	отсутствие	0
mel Si	1350	700	не определено	0
mel Hn	1500	900	+	85
mel R	1500	850	не определено	50
mel Gi	1550	900	отсутствие	0
mel H	1800	900	не определено	33
mel Il	1900	900	отсутствие	50
mel Ibr	2000	750	+	15
mel Me	2000	900	не определено	0
mel Mtp	2000	900	не определено	0
mel Gus	2000	800	отсутствие	0
mel Bgf	2000	900	не определено	50

Изменение уровня экспрессии мРНК *TP53* и *MDM2* в клеточных линиях метастатической меланомы после воздействия лекарственных форм аранозы

Перед изучением уровня экспрессии мРНК клеточные линии инкубировали 24 ч с исследуемыми препаратами: аранозой-лио (ИК50), липосомальной аранозой (ИК50), пустыми липосомами (< ИК10), в качестве контроля использовали необработанные клетки. Исследовалось 13 клеточных линий меланомы человека. Среди них были клеточные линии с мутациями BRAF: mel Bgf, mel Cher, mel H, mel Hn, mel Ibr, mel Il, mel Is, mel R, mel Ch и линии с BRAF дикого типа: mel Kor, mel Mtp, mel Me, mel Gus.

Обнаружено, что липосомальная араноза вызвала повышение экспрессии мРНК *TP53* по сравнению с аранозой-лио. Но это повышение не было статистически значимым ($p=0,5543$) (рис.1).

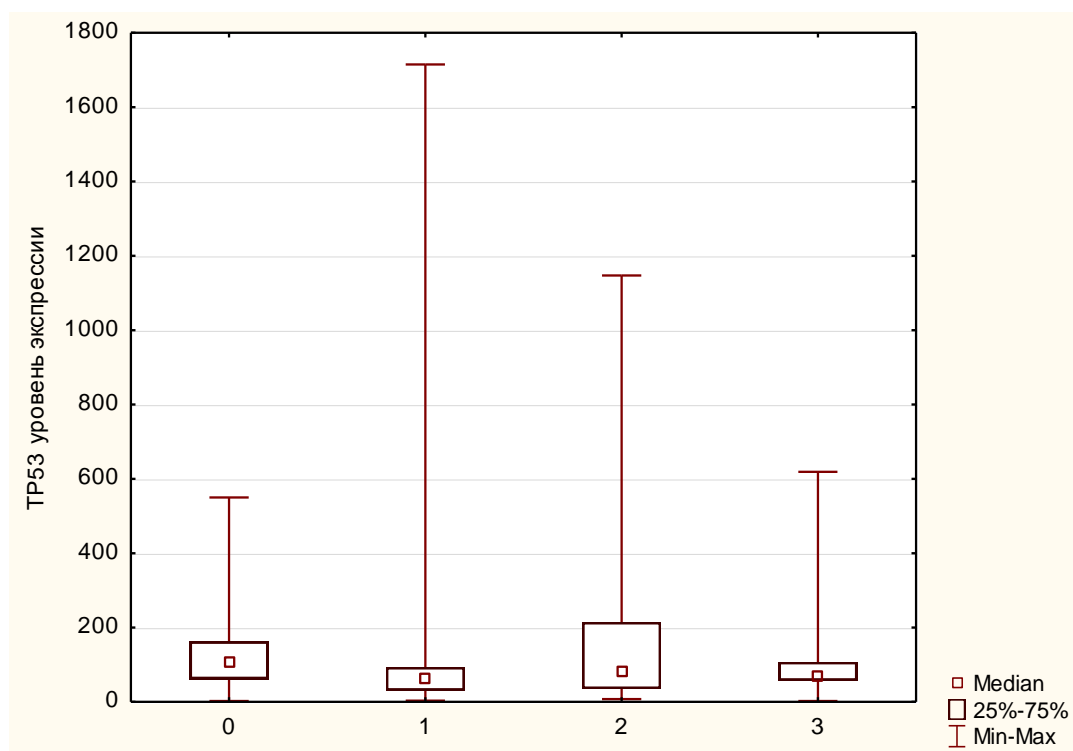


Рисунок 1 – Изменение уровня экспрессии мРНК *TP53* после воздействия исследуемыми препаратами, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3.

Далее изучили изменение уровня экспрессии мРНК *MDM2*. Мы увидели, что уровень экспрессии *MDM2* повысился после инкубации со всеми исследуемыми лекарственными формами, а также с пустыми липосомами. При этом можно видеть более сильную экспрессию мРНК *MDM2* после воздействия аранозы-лио, по сравнению с липосомальной, что было статистически значимо ($p=0,0464$) (рис. 2). По данным литературы повышение экспрессии *MDM2* может способствовать резистентности к химиотерапии [Hientz, 2017].

При разделении клеток в зависимости от наличия мутации *BRAF* оказалось, что более высокая экспрессия мРНК при аранозе-лио по сравнению с липосомальной сохранялась как в группе клеток с *BRAF* дикого типа, так и в группе с *BRAF*-мутациями. Но статистически значимое ($p=0,0421$) различие

между воздействием аранозы-лио и липосомальной аранозой было группе клеток с *BRAF* дикого типа.

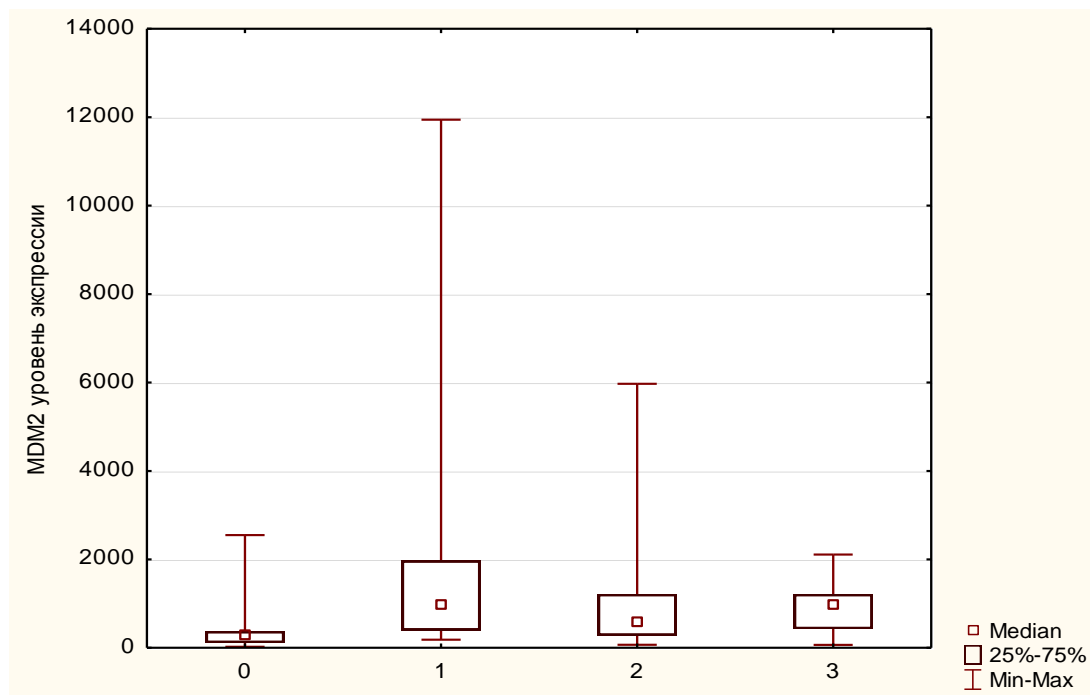


Рисунок 2 – Изменение уровня экспрессии мРНК *MDM2* после воздействия исследуемыми препаратами, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3.

Изменение уровня экспрессии мРНК *MyD88*, *NFκB2* и *NFκB1* в клеточных линиях метастатической меланомы после воздействия лекарственных форм аранозы

Перед изучением уровня экспрессии мРНК клеточные линии инкубировали 24 ч с исследуемыми препаратами: аранозой-лио (ИК50), липосомальной аранозой (ИК50), пустыми липосомами (< ИК10), в качестве контроля использовали необработанные клетки. Исследовалось 13 клеточных линий меланомы человека. Среди них были клеточные линии с мутациями *BRAF*: mel Bgf, mel Cher, mel H, mel Hn, mel Ibr, mel Il, mel Is, mel R, mel Ch и линии с *BRAF* дикого типа: mel Kor, mel Mtp, mel Me, mel Gus.

Активация Toll-подобных рецепторов на клетках меланомы человека индуцируется воспалительными факторами. Экспрессия мРНК *MyD88* при этом повышается примерно в 8 раз [Goto, 2008]. Нами обнаружено, что араноза-лио,

липосомальная араноза повышают экспрессию мРНК *MyD88* по сравнению с необработанными клетками. При этом липосомальная араноза вызывала более высокую экспрессию мРНК *MyD88* по сравнению с аранозой-лио, но это не было статистически значимо ($p=0,9721$). Лишь на некоторых линиях наблюдается значительное усиление экспрессии. Толл-рецепторы в целом задействованы не очень существенно.

При изучении экспрессии мРНК *NFkB2*, обнаружено, что все виды воздействий не вызывали существенных отличий в экспрессии от необработанных клеток. Интересные данные получены при изучении изменения экспрессии мРНК *NFkB1*. Из рисунка 3 видно, что араноза-лио и пустые липосомы не повышают экспрессию *NFkB1*, но повышение наблюдается при воздействии липосомальной аранозы. При этом уровень экспрессии *NFkB1* после воздействия липосомальной аранозы значимо выше ($p=0,0331$), по сравнению с аранозой-лио. При разделении клеток в зависимости от наличия мутации *BRAF* данная тенденция усиления экспрессии *NFkB1* от воздействия липосомальной аранозой сохранялась только в группе клеток с мутациями *BRAF*. В этой группе более отчетлива проявляется разница между воздействием аранозы-лио и липосомальной ($p=0,0209$).

В ряде исследований показано, что опухолевые клетки отличаются от нормальных пониженной экспрессией *NFkB1*, что помогает им в выживании [Voce, 2015]. В исследовании [Schmitt, 2011] было показано, что *NFkB1* является эффекторным белком цитотоксического ответа на повреждения ДНК через метилирование. Известно, что действие аранозы в качестве производного нитрозомочевины реализуется через метилирование ДНК. В ответ на метилирование ДНК *NFkB1* вызывает ингибирование экспрессии анти-апоптотических генов, находящихся под контролем *NFkB*. Интересно, что мы наблюдаем эффект повышения экспрессии *NFkB1* именно от липосомальной формы аранозы, а не от свободной аранозы-лио.

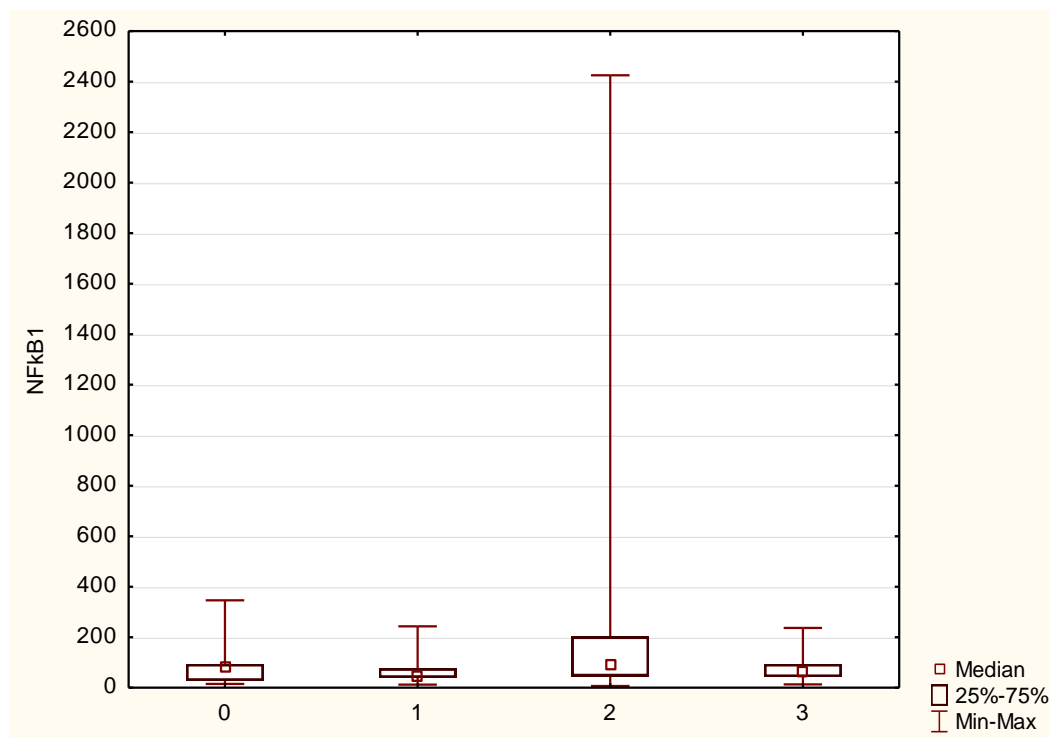


Рисунок 3 – Изменение уровня экспрессии мРНК *NFkB1* после воздействия исследуемыми препаратами, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3.

Изменение экспрессии PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы после воздействия лекарственных форм аранозы

Клеточные линии метастатической меланомы кожи человека инкубировали в течение 24 ч с лекарственными формами аранозы – аранозой-лио и липосомальной, а также с «пустыми» липосомами, после чего оценивали изменение экспрессии мРНК и белков PD-L1 и PD-L2. Данное исследование проводилось на 11 клеточных линиях меланомы: mel Hn, mel Ibr, mel Il, mel Is, mel Si, mel Cher, mel H, mel Gus, mel Bgf, mel Me, mel Mtp, mel Kor (табл. 5). Из таблицы 5 видно, что некоторые клеточные линии имеют высокий базовый уровень мРНК PD-L1 или PD-L2 (mel Cher, mel Bgf, mel Me).

Анализ изменения уровня экспрессии мРНК *PD-L1* показал, что в данном случае не обнаруживается значимого изменения экспрессии после всех видов воздействий и отсутствует статистически значимое отличие между аранозой-лио и липосомальной ($p=0,1580$).

Для мРНК *PD-L2* обнаруживается тенденция к увеличению экспрессии после воздействия аранозы-лио и пустых липосом и снижению экспрессии после воздействия липосомальной аранозы (рис. 4). При этом экспрессия мРНК *PD-L2* статистически значимо выше после воздействия аранозы-лио по сравнению с липосомальной ($p=0,0164$). Когда клетки разделили по наличию или отсутствию мутации *BRAF*, оказалось, что изменения экспрессии, видимые при суммировании всех клеток, повторяются в обеих группах, но отчетливее проявляются в группе с мутациями *BRAF*.

Таблица 5 – Изменение экспрессии мРНК *PD-L1* и *PD-L2* в клеточных линиях метастатической меланомы человека

Клеточная линия	Экспрессия мРНК, % относительно гена ABL							
	Необработанные клетки		Араноза-лио		Липосомальная араноза		Пустые липосомы	
	<i>PD-L1</i>	<i>PD-L2</i>	<i>PD-L1</i>	<i>PD-L2</i>	<i>PD-L1</i>	<i>PD-L2</i>	<i>PD-L1</i>	<i>PD-L2</i>
mel Hn	8,84	0,39	50,00	0,00	10,88	0,00	131,95	0,00
mel Ibr	0,68	0,63	2,92	3,12	8,84	1,46	1,56	2,06
mel II	5,44	0,73	21,76	13,40	7,69	2,92	18,95	15,39
mel Is	0,63	0,00	0,78	0,01	0,36	0,26	0,90	0,04
mel Si	1,79	6,25	0,78	0,01	0,36	0,26	0,90	0,04
mel Cher	70,71	20,31	123,11	40,61	5,44	1,18	214,35	151,57
mel H	11,66	1,10	246,23	174,11	26,79	4,12	6,70	20,31
mel Gus	4,12	16,49	0,78	17,68	8,84	7,18	10,88	263,90
mel Bgf	12,50	75,79	1,27	107,18	0,96	3,35	12,50	123,11
mel Me	23,33	81,23	5,44	17,68	5,08	7,69	7,18	21,76
mel Mtp	8,8	13,40	1,46	4,42	0,01	1,67	1,10	1,10
mel Kor	0,01	0,01	3,85	0,01	10,15	0,06	15,39	0,01

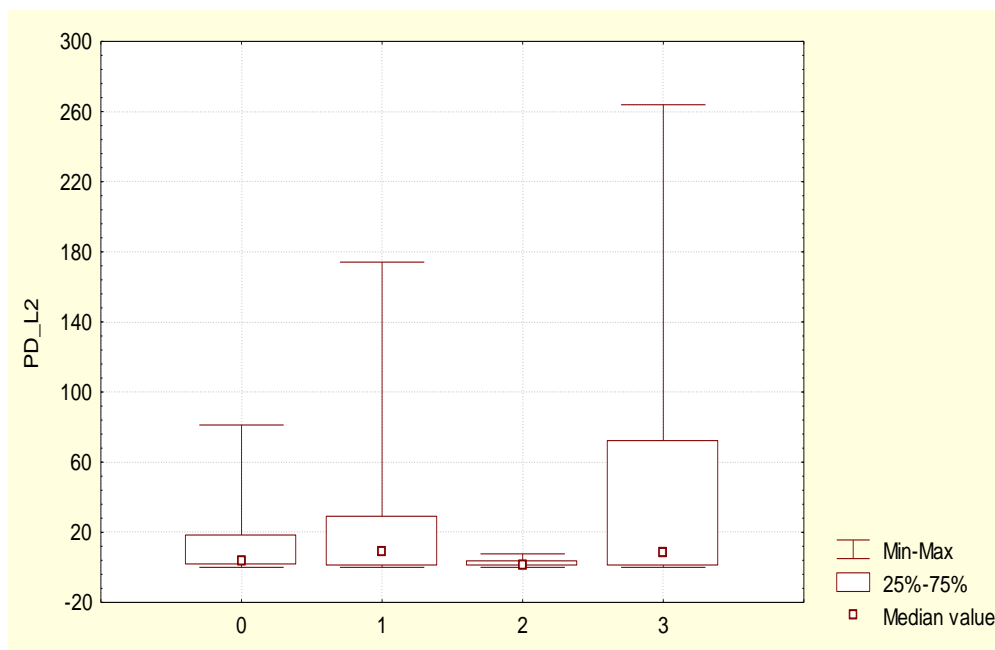


Рисунок 4 – Изменение уровня экспрессии мРНК и *PD-L2* после воздействия исследуемыми препаратами, где контроль – 0, аранзо-лио – 1, липосомальная аранзо – 2, пустые липосомы – 3.

Изучена экспрессия поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы человека на 6 линиях после инкубации с препаратами (ИК50) в течение 48 часов (табл. 6). Их экспрессия в необработанных препаратами клеточных линиях чаще всего не высокая или отсутствует. Положительная экспрессия хотя бы одного из исследуемых белков (PD-L2) детектируется только на 2 линиях из 6 (mel Bgf, mel Si). И только в этих двух линиях происходили изменения экспрессии белка под воздействием препаратов, схожие по тенденции со значениями для мРНК. В других четырех линиях, независимо от значений мРНК, экспрессия белка была незначительна или отсутствовала (табл. 6). Существует мнение, что при меланоме воспаление усиливает экспрессию PD-L1 на клетках опухоли [Taube, 2012]. Для клеточной культуры, количество воспалительных цитокинов, скорее всего, невелико или они отсутствуют. Поэтому большинство клеточных линий меланомы могли терять за ненадобностью поверхностную экспрессию данных белков.

Таблица 6 – Изменение экспрессии поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы человека

Клеточная линия	Антиген-положительные клетки, %					
	Необработанные клетки		Араноза-лио		Липосомальная араноза	
	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2
mel Bgf	0,5	86,2	1,4	87,2	4	6
mel Si	0,6	5,1	2,4	18	1,5	6
mel Ibr	0,2	0,8	0,7	3,7	0,3	2,6
mel Mtp	0,8	0,1	1,1	0,7	1,4	1,3
mel II	0,2	0,1	0,3	0,2	0,4	0,2
mel H	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2

В таблице 7 представлена оценка воздействия разных лекарственных форм аранозы – липосомальной и лиофилизата для приготовления раствора для инъекций. Показано, что лекарственные формы по-разному воздействуют на исследованные в работе сигнальные пути. Араноза-лио повышает экспрессию мРНК *MDM2* и *PD-L2*. А липосомальная араноза повышает экспрессию мРНК *NFkB1* и снижает экспрессию мРНК *PD-L2*.

Таблица 7 – Отличительные эффекты воздействия различных лекарственных форм аранозы на клеточные линии метастатической меланомы человека

Мишени	Араноза-лио	Липосомальная араноза
Сигнальные белки (мРНК)	<i>MDM2</i> ↑ (для BRAF–)	<i>NFkB1</i> ↑ (для BRAF+)
Ингибиторы иммунного ответа (мРНК)	<i>PD-L2</i> ↑	<i>PD-L2</i> ↓

Заключение

В работе изучалось влияние двух лекарственных форм аранозы на сигнальные пути, ответственные за выживаемость опухолевых клеток и их устойчивость к лекарственным препаратам. Исследования проводили на 19 клеточных линиях диссеминированной меланомы человека. Известно, что данные клеточные линии более чувствительны к липосомальной форме аранозы по сравнению с аранозой-лио. Данное явление было подтверждено нами с помощью МТТ-теста. Это свойство липосомальной аранозы могло бы оказаться крайне полезным в клинике. Но преимущество липосомальных форм остается неясным в связи с недостаточностью данных о молекулярных механизмах их действия. Для уточнения этих механизмов нами были произведены данные исследования.

Нами не было обнаружено связи устойчивости линий меланомы к аранозе с делециями 17p как для аранозы-лио, так и для липосомальной аранозы. Не было обнаружено статистически значимых отличий в экспрессии мРНК генов *TP53*, *MyD88*, *NFkB2*, *PD-L1* в клетках меланомы после воздействия аранозы-лио и липосомальной аранозы. При этом отмечено, что более высокая экспрессия мРНК *MDM2* была после воздействия аранозы-лио, по сравнению с липосомальной, что было статистически значимо. Стоит отметить, что повышение экспрессии *MDM2* может способствовать резистентности к химиотерапии. Нами показано, что липосомальная араноза вызывает статистически значимое повышение уровня экспрессии *NFkB1* по сравнению с аранозой-лио. В исследовании [Schmitt 2011] показано, что *NFkB1* является эффекторным белком цитотоксического ответа на повреждения ДНК через метилирование. Известно, что действие аранозы в качестве производного нитрозомочевины реализуется через метилирование ДНК. В ответ на метилирование ДНК *NFkB1* вызывает ингибирование экспрессии анти-апоптотических генов, находящихся под контролем *NFkB*. Интересно, что мы наблюдаем эффект повышения экспрессии *NFkB1* именно от липосомальной формы аранозы, а не от свободной аранозы-лио. Обнаружено, что экспрессия мРНК *PD-L2* статистически значимо выше после воздействия аранозы-лио по сравнению с липосомальной. Известно, что повышенная экспрессия *PD-L1* и *PD-*

L2 в опухолевых клетках может способствовать защите опухоли от иммунного ответа. В случае первичных образцов опухоли от пациентов в литературе обнаруживается высокая корреляцию уровня белка PD-L1 и PD-L2 (иммуногистохимия) и мРНК (количественная ПЦР). Это подтверждает значимость полученных нами данных по изменению экспрессии мРНК после воздействия различными лекарственными формами аранозы. В случае клеточных культур нами обнаружено, что только в линиях, где по каким-то причинам сохраняется конститутивная поверхностная экспрессия PD-L1 или PD-L2, тенденция изменений после воздействия препаратов схожа с тенденцией для мРНК. Для этих клеточных линий не обнаружено существенных изменений для PD-L1 после всех видов воздействий, но обнаружена более низкая экспрессия PD-L2 после воздействия липосомальной аранозы, по сравнению с аранозой-лио.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что две лекарственные формы аранозы – липосомальная и араноза-лио – в определенных случаях оказывают различное воздействие на внутриклеточные сигнальные пути в клетках метастатической меланомы. Араноза-лио запускает механизмы устойчивости к химиотерапии, через повышение экспрессии мРНК *MDM2*, и к цитотоксическим лимфоцитам, через повышение экспрессии мРНК *PD-L2*. Липосомальная араноза, наоборот, запускает механизмы, способствующие чувствительности клеток к терапии, через повышение экспрессии мРНК *NFkB1* – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК, и повышает чувствительность к цитотоксическим лимфоцитам через снижение экспрессии мРНК *PD-L2*.

ВЫВОДЫ

1. Мутации *TP53* обнаружены только в 22% исследованных клеточных линий метастатической меланомы кожи и не являются фактором чувствительности к аранозе.
2. Отсутствует связь между делециями короткого плеча 17-й хромосомы и чувствительностью клеточных линий метастатической меланомы кожи к аранозе.

3. Уровень экспрессии мРНК *TP53*, *MyD88*, *NFkB2*, *PD-L1* в клетках меланомы не имел статистически значимых различий между воздействиями «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» аранозы.

4. В воздействии «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» аранозы на клеточные линии меланомы человека имеются отличия, выявляющие преимущества липосомальной формы.

5. Уровень экспрессии мРНК *MDM2* в клетках меланомы после воздействия аранозы «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» выше по сравнению с «липосомальной» формой ($p=0,0464$).

6. Уровень экспрессии мРНК *NFkB1* в клетках меланомы после воздействия «липосомальной» формы аранозы выше по сравнению с «лиофилизатом для приготовления раствора для инъекций» ($p=0,0331$).

7. Уровень экспрессии мРНК *PD-L2* в клетках меланомы после воздействия аранозы «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» выше по сравнению с «липосомальной» формой ($p=0,0164$).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) Пономарев, А.В. Связь делеций и точечных мутаций гена *p53* с резистентностью клеточных линий метастатической меланомы кожи человека к аранозе / А.В. Пономарев, А.А. Солодовник, А.С. Мкртчян, Ю.П. Финашутина, А.А. Турба, В.А. Мисюрин, А.В. Мисюрин, М.А. Барышникова // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – № 1(17). – С. 64-69.

2) Пономарев, А.В. Изменение экспрессии мРНК *MDM2* и *NFkB1* в клеточных линиях меланомы человека при воздействии 2 лекарственных форм аранозы / А.В. Пономарев, В.А. Мисюрин, А.А. Рудакова, О.С. Бурова, А.В. Мисюрин, М.А. Барышникова // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – № 3(16). – С. 52-58.

3) Пономарев, А.В. Изменение экспрессии *PD-L1* и *PD-L2* в клеточных линиях меланомы человека при воздействии различных лекарственных форм

аранозы и «пустых» липосом / А.В. Пономарев, В.А. Мисюрин, А.А. Рудакова, А.В. Мисюрин, М.А. Барышникова // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – № 2(16). – С. 74-81.