

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

*На правах рукописи*

**КОВАЛЕВА ОЛЬГА ВЛАДИМИРОВНА**

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРОБИОМА И ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК  
СТРОМЫ В ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ**

3.1.6 Онкология, лучевая терапия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

**Научный консультант:**  
доктор биологических наук  
**Чевкина Елена Максимовна**

Москва – 2022г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1    ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1    Рак легкого.....	15
1.2    Рак пищевода.....	17
1.3    Хроническое воспаление и онкологические заболевания.....	18
1.4    Микроокружение опухоли.....	22
1.4.1    Макрофаги стромы.....	22
1.4.2    Т-клетки стромы.....	31
1.4.3    В-клетки стромы.....	33
1.4.4    Эндотелиальные клетки.....	33
1.5    Микробиом.....	34
1.5.1    Микробиом легкого.....	34
1.5.1.1    Микробиом легкого в норме и при неонкологических заболеваниях.....	35
1.5.1.2    Микробиом рака легкого.....	36
1.5.2    Микробиом пищевода.....	39
1.6    Взаимодействие стромы и микробиома в опухолевой прогрессии.....	41
1.6.1    Влияние стромы на развитие и прогрессию опухолей.....	42
1.6.2    Влияние микробиома на развитие и прогрессию опухолей.....	46
1.6.2.1    Прямое влияние микробиома.....	46
1.6.2.2    Цитотоксическая активность.....	49
1.6.2.3    Влияние микробиома на толерантность макрофагов.....	51
1.6.3    Влияние стромы и микробиома на терапию опухолей.....	52
1.7    Заключение.....	54
ГЛАВА 2    МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	55
2.1    Список используемых растворов, реагентов и сред.....	55
2.2    Список используемых растворов.....	57
2.3    Список используемых приборов.....	58
2.4    Выделение нуклеиновых кислот.....	59
2.4.1    Выделение плазмидной ДНК.....	59
2.4.2    Выделение тотальной ДНК.....	59
2.4.3    Выделение тотальной РНК.....	59
2.5    Аналитический электрофорез ДНК в агарозном геле.....	59



2.6	Молекулярное клонирование .....	60
2.6.1	Использованные генетические конструкции.....	60
2.6.2	Рестрикция .....	61
2.6.3	Выделение фрагментов ДНК для клонирования из агарозного геля .....	61
2.6.4	Лигирование.....	61
2.6.5	Трансформация компетентных клеток.....	62
2.6.6	Получение рекомбинантных белков .....	62
2.7	Обратная транскрипция .....	63
2.8	Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.....	63
2.9	Получение моноклональных антител.....	64
2.9.1	Иммунизация .....	64
2.9.2	Получение гибридом.....	64
2.10	Иммуноферментный анализ .....	65
2.11	Метагеномное секвенирование .....	65
2.11.1	Приготовление библиотек .....	65
2.11.2	Биоинформатический анализ .....	65
2.12	Транскриптомное секвенирование .....	66
2.12.1	Приготовление библиотек.....	66
2.12.2	Биоинформатический анализ .....	66
2.13	Анализ белков.....	67
2.13.1	Приготовление клеточных лизатов .....	67
2.13.2	Вестерн-блот гибридизация .....	67
2.13.3	Анализ желатиназной активности .....	68
2.14	Клеточные линии.....	68
2.14.1	Трансфекция .....	68
2.14.2	Инфицирование клеток.....	69
2.15	Получение культур опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов.....	69
2.16	Исследование клеточных характеристик <i>in vitro</i> .....	71
2.16.1	Анализ динамики роста клеток.....	71
2.16.2	Тест на образование колоний в условиях разреженной популяции.....	71
2.16.3	Тест на направленную миграцию .....	71
2.17	Оценка роста опухолей <i>in vivo</i> .....	71
2.18	Гистология и иммуногистохимия.....	72
2.18.1	Приготовление срезов.....	72

2.18.2	Гистологическое окрашивание .....	72
2.18.3	Иммуногистохимическое окрашивание.....	72
2.18.4	Иммунофлуоресценция .....	74
2.19	Статистическая обработка результатов .....	74
<b>ГЛАВА 3</b>	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>76</b>
3.1	Анализ фенотипа иммунокомпетентных клеток стромы опухолей легкого.....	76
3.1.1	Анализ фенотипа клеток воспалительного инфильтрата опухолей легкого.....	77
3.1.1.1	Получение антител к PU.1 .....	79
3.1.1.2	Получение антител к CHID1 .....	81
3.1.2	Клиническая и прогностическая значимость макрофагов различных фенотипов в опухолях НМРЛ.....	83
3.1.3	Клиническая и прогностическая значимость маркеров макрофагов, экспрессирующихся в опухолевых клетках НМРЛ .....	94
3.1.4	Клиническая и прогностическая значимость Т- и В-клеток в опухолях НМРЛ..	101
3.1.5	Клиническая и прогностическая значимость эндотелиальных клеток в опухолях НМРЛ .....	106
3.1.6	Комплексный анализ прогностической значимости опухолевых и стромальных маркеров при НМРЛ .....	107
3.2	Таксономический состав микробиома опухолей НМРЛ.....	108
3.3	Комплексный анализ микробиологической и иммунологической составляющих опухолевой стромы в прогрессии опухолей легкого.....	114
3.4	Анализ фенотипа иммунокомпетентных клеток стромы опухолей пищевода.....	119
3.4.1	Клиническая и прогностическая значимость макрофагов различных фенотипов в опухолях плоскоклеточного рака пищевода .....	120
3.4.2	Клиническая и прогностическая значимость маркеров макрофагов, экспрессирующихся в опухолевых клетках ПРП .....	125
3.4.3	Клиническая и прогностическая значимость Т-клеток в опухолях пищевода ....	128
3.5	Таксономический состав микробиома опухолей плоскоклеточного рака пищевода..	130
3.6	Комплексный анализ микробиологической и иммунологической составляющих опухолевой стромы в прогрессии опухолей пищевода .....	133
3.7	Механизмы отбора опухолевых клеток под воздействием цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета.....	140
3.7.1	Получение модели опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток.....	140

3.7.2	Определение основных клеточных характеристик полученных клеточных линий	
in vitro	.....	143
3.7.2.1	Исследование динамики роста полученных культур	143
3.7.2.2	Исследование клоногенности полученных культур	144
3.7.2.3	Анализ миграционной способности клеток	145
3.7.2.3	Анализ уровня секреции матриксных металлопротеиназ (ММП)	146
3.7.2.4	Динамика роста опухолей in vivo	147
3.7.2.5	RNA seq	149
3.7.2.6	Анализ сигнальных путей, потенциально вовлеченных в регуляцию пролиферации	154
3.8	Механизм развития толерантности макрофагов в микроокружении опухоли	155
ГЛАВА 4	ОБСУЖДЕНИЕ	160
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	.....	179
ВЫВОДЫ	.....	181
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	.....	182
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	.....	184

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Злокачественность опухоли и ее способность к метастазированию в значительной степени зависит от ее микроокружения. В ходе прогрессии опухоли возникает взаимодействие между неопластическими клетками и стромой, которое может осуществляться непосредственно через межклеточные контакты или паракринно. Уже возникшая солидная опухоль состоит не только из неопластических клеток, но и поддерживающей ее стромы, в состав которой входят различные типы клеток, а также внеклеточный матрикс [1]. Изменение микроокружения опухолевых клеток дает им возможность роста и инвазии. Одними из основных клеточных популяций, составляющих опухолевое микроокружение, являются эндотелиальные и иммунные клетки (макрофаги, нейтрофилы и лимфоциты) [1]. В частности, макрофаги, ассоциированные с опухолью (МАО), являются основной частью опухолевого инфильтрата и могут составлять 50% от ее массы [2]. Эти клетки производят различные цитокины и ростовые факторы, влияющие и/или определяющие развитие опухоли.

Практически все современные исследования МАО посвящены функциональному анализу молекулярных маркеров макрофагов второго типа, что считается необходимым для понимания механизма их функционирования и выяснения, какие из функций МАО способствуют росту опухоли. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, считаются ключевыми клетками врожденного иммунитета, участвующими в уходе опухоли из-под иммунологического надзора. Это подтверждается эпидемиологическими данными, которые показывают, что повышенное количество макрофагов 2 типа в популяции МАО коррелирует с негативным прогнозом заболевания для многих типов опухолей. Однако последние исследования показывают, что большую прогностическую ценность имеет соотношение макрофагов 1 типа и макрофагов 2 типа (M1/M2) в популяции МАО, а также их локализация внутри опухоли [3]. Также показано, что большое количество M2 в опухолях коррелирует со снижением чувствительности к таргетной терапии EGFR ингибиторами [4]. Для рака пищевода, как и для других опухолей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), повышенное количество макрофагов, ассоциированных с опухолью, может коррелировать как с плохим, так и с хорошим прогнозом.

Для различных опухолей, например для опухолей ЖКТ, характерно сильное влияние микробиологической составляющей, которая развивается из нормальной микробиологической флоры под воздействием опухолевых факторов. До относительно недавнего времени легкие считались стерильным органом, в отличие от органов ЖКТ. Однако все больше исследований показывает, что это не так. Микробиоту легкого человека составляют порядка 10–100 клеток бактерий на 1000 клеток легкого [5], которые являются его неотъемлемой частью как при нормальном функционировании, так и при патологии.

Теории бактериально-опосредованного канцерогенеза выдвигались с середины 20-го века, когда McCoy и Mason впервые предположили связь между *Enterococcus* и карциномой сигмовидной кишки [6]. Sears и Pardoll сформулировали гипотезу «альфа-жучка», в которой такие виды, как *Bacteroides fragilis*, играют центральную проонкогенную роль, вырабатывая энтеротоксины и способствуя тем самым возникновению колоректального рака [7]. Впоследствии Tjalsma et al. в 2012 году предложили модель «водитель-пассажир», в которой «бактерии-водители» (например, *B. fragilis*) запускают многоэтапный процесс злокачественной трансформации, включая воспаление и повышенную клеточную пролиферацию [8]. Расширением этой теории является «ключевая гипотеза» Hajishengallis et al., в которой ключевые патогены, даже при низкой численности, способствуют колонизации дополнительными патогенами. За этим следует инверсия ответной реакции хозяина, что приводит к формированию дисбаланса комменсальной микробиоты и стимуляции воспалительного ответа [9], который, в свою очередь, может способствовать развитию или прогрессии опухоли.

Таким образом, различные компоненты микробиома могут вносить свой вклад в развитие уже сформировавшихся опухолей, как путем непосредственного влияния на опухолевые клетки, так и посредством влияния на опухолевое микроокружение. Основными клеточными типами опухолевой стромы, реагирующими на бактерии, являются макрофаги и нейтрофилы. В условиях опухолевого микроокружения происходит интеграция противовоспалительных сигналов, поступающих от опухолевых клеток и провоспалительных сигналов от бактерий. Как происходит эта интеграция, как развивается микробиота опухоли, какой именно фенотип приобретают клетки стромы, и каким образом это влияет на течение заболевания, на данный момент неизвестно. Это обуславливает актуальность представленного исследования.

### **Степень разработанности**

Согласно последним статистическим данным, злокачественные опухолевые заболевания почти во всех странах мира занимают второе место среди причин смерти населения. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) является одним из самых распространенных, неблагоприятно текущих (основные мишени метастазирования – кости и мозг) и сложно поддающихся лечению онкологических заболеваний. Данное заболевание является большой медицинской и социальной проблемой, в лучшем случае приводя к инвалидности. Как и для многих других онкопатологий, одной из проблем НМРЛ остается поздняя диагностика. Многие больные умирают в течение года после постановки диагноза, поскольку в большинстве случаев НМРЛ выявляется уже на поздних стадиях. Рак пищевода находится на шестом месте по смертности среди злокачественных опухолевых заболеваний. Около 70% больных умирают в течение года после постановки диагноза, поскольку в большинстве случаев рак пищевода (как и НМРЛ) выявляется на поздних стадиях. В отличие от других вышеупомянутых типов опухолей,

механизмы развития рака пищевода не сегодняшний день изучены слабо, и механизмы его возникновения не ясны.

Известно, что процесс хронического воспаления со временем может приводить к возникновению опухолей. Рак пищевода и рак легкого в данном случае не являются исключениями. Также возникновению и прогрессии опухоли способствует ее микроокружение. При развитии опухоли происходит непрерывное взаимодействие опухолевых клеток со стромальными, и в большинстве случаев именно стромальный компонент опухоли приводит к ее прогрессии и метастазированию [10]. Строма опухоли состоит из мезенхимальных клеток (в частности, фибробластов и миофибробластов), окруженных внеклеточным матриксом, содержащим различные структурные белки и сигнальные молекулы. Другой клеточной популяцией, составляющей опухолевое микроокружение, являются эндотелиальные и иммунные клетки (макрофаги, нейтрофилы и лимфоциты). Практически все современные исследования посвящены функциональному анализу молекулярных маркеров макрофагов второго типа, что считается необходимым для понимания механизма действия макрофагов, ассоциированных с опухолью, и выяснения, какие из функций MAO способствуют росту опухоли. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, считаются ключевыми клетками врожденного иммунитета, принимающими участие в развитии опухолей.

Все современные научные тенденции посвящены макрофагам, ассоциированным с опухолью (так называемыми альтернативно активированными или M2), в то время как другой тип данных клеток - классически активированные макрофаги (M1) исследованы в меньшей степени. Для них, в отличие от M2 макрофагов, крайне плохо описаны молекулярные маркеры и недостаточно исследований, характеризующих их количество, локализацию и фенотип в опухолях.

Для M2 макрофагов в опухолях легкого наблюдается вполне устоявшаяся не сегодняшний день парадигма. А именно, повышенное количество макрофагов, ассоциированных с опухолью, коррелирует с плохим прогнозом [3]. Также показано, что большое количество M2 макрофагов в опухолях коррелирует со снижением чувствительности к таргетной терапии [4]. Известно, что на фенотип макрофагов опухолевые клетки могут влиять дистанционно, например, посредством miРНК, содержащихся в экзосомах, выделяемых опухолевыми клетками [11]. Также показано, что повышенное количество макрофагов, ассоциированных с опухолью, коррелирует с плохим прогнозом для опухолей пищевода.

Таким образом, при изучении микроокружения опухолей внимание исследователей привлекают прежде всего различные типы эукариотических клеток, начиная от стромальных фибробластов и клеток иммунной системы, заканчивая эндотелиальными клетками и адипоцитами. Однако для многих солидных опухолей важную роль играет также и микробиом,

причем это не ограничено органами ЖКТ, для которых его присутствие является нормой. В частности, недавно была охарактеризована нормальная микробиота легких, которые долгое время считались стерильными органом. Микроорганизмы могут принимать как непосредственное участие в опухолевой трансформации, так и создавать неспецифический хронический воспалительный фон, который, как уже говорилось, может участвовать в процессе возникновения опухолей. Например, показано повышение количества двух родственных видов бактерий *Firmicutes* и *TM7* в опухолях легкого. Более того, два рода бактерий *Veillonella* and *Megasphaera* встречались в опухолях легкого значительно чаще других [12].

По аналогии с *Helicobacter pylori* для желудка, показано, что *Campylobacter spp.* может принимать участие в развитии токсин-опосредованного воспаления и приводить к развитию аденокарциномы пищевода [13]. Однако интересно отметить, что *Helicobacter pylori* сама по себе может защищать от развития аденокарциномы пищевода [14]. Также показана роль другого представителя микробиоты в развитие рака пищевода. *Fusobacterium nucleatum* при раке пищевода ассоциирована с более коротким периодом выживаемости пациентов, а также может вносить потенциальный вклад в агрессивность опухоли путем активации различных цитокинов [15].

Также существует обратная зависимость между количеством ДНК *F. nucleatum* и плотностью CD3+ Т-клеток [16]. Активность *F. nucleatum* приводит к запуску ряда процессов, в результате которых повышается экспрессия миРНК21, которая, в свою очередь, играет опухоль-промотирующую роль, усиливая пролиферацию клеток карциномы [17]. Возможно, *F. nucleatum* также оказывают ингибирующее действие на иммунный ответ Т-клеток, что приводит к развитию более агрессивных опухолей. Дальнейшее изучение влияния *F. nucleatum* на иммунный ответ может скорректировать существующие методы иммунотерапии опухолей. Также, концентрация *F. nucleatum* может служить в качестве прогностического биомаркера колоректальных опухолей [18].

Микробиота легких представляет собой динамичную систему, которая зависит от множества факторов. Разные участки легких могут быть охарактеризованы специфичным микробным «пейзажем», который зависит от аборигенной микробиоты, иммунного статуса хозяина и факторов внешней среды. Микробиота легких может существенно меняться при различных заболеваниях легких и дыхательных путей. В целом большинство заболеваний можно охарактеризовать дисбактериозом и превалированием патогенных видов микроорганизмов.

Относительно недавно также была подтверждена роль микроорганизмов в образовании злокачественных опухолей легкого и протекании онкологических процессов. Так, была показана связь между злокачественными опухолями легкого и *Mycobacterium tuberculosis*, активность которых стимулирует синтез фактора некроза опухолей, что стимулирует онкологические

процессы [19]. Современные исследования подтвердили ассоциацию повышенного содержания *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter spp.*, и *Escherichia coli* с развитием опухолей легкого [20]. По сравнению с контрольными образцами нормальной ткани в случаях онкологических заболеваний легкого наблюдается повышенное содержание представителей *Granulicatella*, *Abiotrophia*, *Streptococcus* [21]. При онкологических заболеваниях в легких может наблюдаться развитие патогенных микроорганизмов, таких как *Legionella* и *Moraxella* (например *Moraxella catarrhalis*). Микробиота опухолей легких оказывает влияние на протекание заболеваний на многих уровнях. Так, при дисбактериозе легких наблюдается повышение концентрации активных форм кислорода, что приводит к учащению двойных разрывов ДНК, и, как следствие, воспалительным процессам. В ряде случаев aberrantные микроорганизмы в составе микробиоты легких вызывают повышенный синтез интерлейкинов. К примеру, установлена связь между активностью *Haemophilus influenzae* и выработкой интерлейкина IL-17, что стимулирует развитие опухолей [22].

Изучение микробиоты легких при онкологических заболеваниях осложнено в связи с отсутствием контрольных образцов. Тем не менее, анализ микробиома, ассоциированного со злокачественными опухолями, может позволить выявить микроорганизмы, присутствие которых специфично для определенных процессов или популяций. Изучение микробиоты легких на разных стадиях онкологических заболеваний необходимо для исследования влияния микроорганизмов на клиническую картину на разных стадиях процесса. Также, изучение микробиоты опухолей легкого позволит выявить микроорганизмы, которые можно рассматривать в качестве биомаркеров онкологических заболеваний [23].

Подводя итоги, нужно сказать, в течение последних лет в ведущих лабораториях было показано, что опухолевые клетки нельзя рассматривать отдельно от опухолевого микроокружения. Однако самые последние исследования показывают, что опухолевое микроокружение нельзя рассматривать без его микробиологической составляющей. Даже для таких типов опухолей, как рак молочной железы (который в первичном рассмотрении никак не ассоциирован с микробиотой), показан немаловажный вклад бактериального компонента в развитие патологии [24]. Таким образом, именно комплексное изучение опухолевых клеток, клеток опухолевого микроокружения, опухолевых экзосом и микробиоты поможет лучше понять индивидуальные механизмы возникновения и прогрессии опухоли и разработать персонализированные терапевтические подходы.

### **Цель исследования**

Целью данного исследования является изучение фундаментальных механизмов взаимодействия микробиологического и клеточного компонентов опухолевой стромы и их вклада в опухолевую прогрессию.



### **Задачи исследования**

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Провести комплексный анализ микробиома в опухолях пищевода и легкого методом направленного секвенирования гена 16S рРНК.
2. Изучить клеточный состав и фенотип иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы в опухолях пищевода и легкого методом иммуногистохимии.
3. Провести анализ взаимосвязи между бактериальным и клеточным компонентами опухолевой стромы.
4. Изучить формирование цитотоксичности и/или толерантности макрофагов под воздействием бактерий опухолевой стромы.
5. Изучить механизмы отбора опухолевых клеток под действием цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета.

### **Научная новизна**

В данной работе впервые проведено комплексное изучение микробиологического и клеточного компонентов опухолевой стромы при немелкоклеточном раке легкого и плоскоклеточном раке пищевода. Описаны новые прогностические маркеры НМРЛ и рака пищевода. Описан детальный состав микробиологической составляющей исследуемых опухолей. Впервые показана ассоциация общей бактериальной нагрузки с фенотипом иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы и прогностическая значимость данных показателей. Впервые при помощи модельной системы и на клиническом материале изучено влияние микробиома опухоли на пролиферацию клеток опухоли. При помощи модельной системы изучены сигнальные пути, активируемые в макрофагах, ассоциированных с опухолью, бактериями опухолевой стромы. Также изучены сигнальные пути, посредством которых опухолевые клетки способны избегать цитотоксического действия макрофагов. Используемые методические подходы включают большое количество современных молекулярно-биологических и клеточных технологий, в том числе и уникальных, разработанных автором работы. Вместе с тем, все использованные методы уже хорошо зарекомендовали себя при решении фундаментальных и прикладных задач в практике научно-исследовательских лабораторий. Таким образом, впервые получен ряд приоритетных научных результатов о влиянии различных компонентов опухолевой стромы на процесс опухолевой прогрессии и перспективы их использования в противоопухолевой терапии.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В рамках данной работы впервые использован междисциплинарный подход, сочетающий микробиологические, генетические, клеточно-биологические методы и модельные системы, к изучению роли стромы в патогенезе опухолей пищевода и легкого. Получен ряд приоритетных данных, свидетельствующих о ранее не известных взаимодействиях различных составляющих опухолевого микроокружения. Большая часть полученных результатов опубликована как в отечественных, так и в зарубежных научных журналах и имеет большое теоретическое значение, существенно расширяя уровень наших знаний о механизмах опухолевой иммуносупрессии, а также о влиянии опухолевого микробиома на ее формирование. Полученные результаты могут служить основой для дальнейших исследований молекулярных механизмов опухолевой прогрессии. Ряд данных может иметь также практическое значение при создании новых диагностических наборов для определения качественного и количественного состава микробиома в образцах опухолей. Определение бактериальной нагрузки в опухолях позволит более точно предсказывать эффект проводимой терапии. Помимо этого, полученные данные, а именно выявленные в ходе работы новые молекулярные маркеры опухолевой стромы, могут быть использованы в клинической практике для определения прогноза заболевания и в качестве мишеней для терапии данных опухолей.

### **Методология и методы исследования**

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

1. При формировании выборок образцов опухолей от пациентов с онкологическими заболеваниями все образцы были аннотированы всеми необходимыми клиническими и патоморфологическими данными.
2. Выделение нуклеиновых кислот из парафиновых и замороженных образцов тканей проводилось при помощи коммерческих наборов.
3. Определение состава микробиома опухолей проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК.
4. Биоинформатическая обработка результатов высокопроизводительного 16S метагеномного секвенирования проводилась с использованием соответствующих приложений и баз данных.
5. Для подтверждения результатов секвенирования и для определения количества бактерий в образцах тканей применялась количественная ПЦР с использованием гидролизуемых зондов.

6. Анализ экспрессии маркеров клеток воспалительного инфильтрата в образцах тканей легкого и пищевода проводился методом иммуногистохимии.

7. Для получения моноклональных антител к маркерам клеток воспалительного инфильтрата использовались следующие молекулярно-биологические методы исследования: молекулярное клонирование, полимеразная цепная реакция, трансформация бактериальных клеток, выделение и очистка рекомбинантных белков, иммунизация с последующим получение антител методом гибридомной технологии.

8. Анализ количества пролиферирующих макрофагов и макрофагов смешанного фенотипа в образцах тканей легкого проводился методом иммунофлуоресценции.

9. Статистический анализ данных проводился с использованием GraphPad Prizm.9. Микробное разнообразие в образцах (альфа-разнообразие) оценивали с помощью индексов Chao1, ACE, Шеннона и обратного индекса Симпсона. Микробное сходство между образцами (бета-разнообразие) оценивали с помощью индекса Брея-Кертиса. Для визуализации полученных данных использовали приложение MicrobiomeAnalyst. Различия состава микробиома между образцами опухолей и условно нормальной тканью, а также между другими группами сравнения оценивали с помощью критерия Вилкоксона для парных выборок или непараметрического критерия Манна-Уитни.

При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Анализ выживаемости проводился путем построения кривых дожития по методу Каплана – Майера. Сравнение достоверности различий проводили при помощи логарифмического рангового критерия. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

10. Для анализа цитотоксичности и/или толерантности макрофагов и устойчивости опухолевых клеток были использованы различные клеточные модели, разработанные автором исследования (применимые как для первичных клеток, так и для клеточных линий).

11. Для изучения транскриптома проводили высокопроизводительное секвенирование с использованием геномных технологий (RNAseq).

12. Подтверждение результатов изучения транскриптома проводили с использованием различных молекулярно-биологических методов, включая ПЦР в режиме реального времени, Вестерн-блот анализ, иммуноферментный анализ и др.

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

1. Перспективным и удобным для использования маркером макрофагов, ассоциированных с опухолью, является транскрипционный фактор PU.1.

2. Макрофагальные маркеры зачастую экспрессируются опухолевыми клетками и могут использоваться для определения прогноза заболевания, в частности CHID1 и iNOS для НМРЛ.

3. Нормальная и опухолевая ткань отличаются по качественному и количественному составу резидентного микробиома.

4. Оценка общей бактериальной нагрузки в сочетании с фенотипом клеток опухолевой стромы является перспективным прогностическим маркером опухолей различной локализации.

5. Цитотоксическая активность макрофагов способствуют отбору более злокачественных клонов опухолевых клеток.

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

Работа выполнена в соответствии с принятыми стандартами молекулярно-биологических и клеточных исследований; полученные автором новые данные согласуются с имеющимися в литературе отдельными данными по изучению микробиома опухолей и фенотипа воспалительного инфильтрата клеток опухолевой стромы. Достоверность полученных данных основана на адекватном выборе и корректном использовании в исследовании современных методов анализа, полученные результаты обработаны с использованием современных методов математической статистики. Автор принимал непосредственное участие во всех этапах выполнения научно-исследовательской работы. По материалам диссертации опубликовано 36 статей в зарубежных и отечественных журналах (из них статей в журналах списка ВАК – 15). Результаты исследования были представлены и обсуждены на 13 научных конференциях: II-VI всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 2016 г., 2017 г., 2018 г., 2019 г., 2021г.), XXII-XXV Российский Онкологический Конгресс (Москва, Россия, 2018 г., 2019 г., 2020г, 2021г.), VII Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи 2021» (Санкт-Петербург, Россия, 2021г.), VII Российский конгресс лабораторной медицины (Москва, Россия, 2021г.), XVI Международный конгресс РООУ (Москва, Россия, 2021г.), Международный форум инновационная онкология (Москва, Россия, 2021 г.)

Апробация диссертации состоялась 26 апреля 2022 года на объединенной научной конференции отдела химического канцерогенеза, лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов, лаборатории биологии стромальных клеток опухолей, лаборатории комбинированной терапии опухолей, отдела экспериментальной биологии опухолей, отдела иммунохимии, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории цитогенетики, лаборатории молекулярной биологии вирусов НИИ канцерогенеза, лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

# **ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

## **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ СОСТАВЛЯЮЩИЕ ОПУХОЛЕВОЙ СТРОМЫ В ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ**

Солидные опухоли представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, состоящую как из собственно неопластических клеток, так и рекрутированных мезенхимальных и эпителиальных клеток организма, которые формируют так называемое опухолевое микроокружение. Рассматривая микроокружение опухоли, исследователи отмечают большое количество типов клеток, его составляющих. Изучаются различные типы клеток, начиная от стромальных фибробластов и клеток иммунной системы, заканчивая эндотелиальными клетками и адипоцитами. Однако для многих солидных опухолей большую роль в их развитии играет также резидентный микробиом, способный в значительной степени повлиять на характер активации иммунокомпетентных клеток микроокружения. В настоящем обзоре литературы проанализирована информация по микробиому и клеточного состава и фенотипу иммунологической составляющих опухолевой стромы новообразований легкого и пищевода, механизмам их взаимодействия (как между собой, так и непосредственно с опухолевыми клетками), а также влиянию этого взаимодействия на прогрессию заболевания и потенциальные терапевтические возможности.

### **1.1 Рак легкого**

Рак легкого является одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей в промышленно развитых странах и составляет 13% по заболеваемости и 18% по смертности от злокачественных опухолей в мире. По данным МАИР самая высокая заболеваемость раком легкого зарегистрирована в США среди афроамериканцев – 85,8 случаев на 100 тысяч населения [25]. В России доля эпителиальных злокачественных новообразований легкого в структуре заболеваемости составляет около 15% [25]. Несмотря на появление большого числа новых терапевтических возможностей, рак легкого остается заболеванием с неблагоприятным прогнозом. Эпидемиологические исследования указывает на тесную связь этого заболевания с воздействием канцерогенов окружающей среды. Среди канцерогенных агентов, которые могут влиять на возникновение РЛ, следует, прежде всего, назвать канцерогены табачного дыма, асбест и пыль различного происхождения.

Современная международная гистологическая классификация выделяет большое количество гистологических типов опухолей легкого различного происхождения. Самыми распространенными гистологическими типами эпителиальных злокачественных опухолей легкого являются аденокарцинома и плоскоклеточный рак. В основе вышеупомянутой классификации лежат тонкие морфологические и гистологические различия между клетками

вышеперечисленных типов. Также важно отметить, что отличия фиксируются не только по морфологическим, но и по клиническим, эпидемиологическим, биохимическим и молекулярно-биологическим параметрам.

С клинической точки зрения различные виды рака легкого отличаются по темпу роста и прогнозу. Как правило, медленнее всего развивается дифференцированный плоскоклеточный рак лёгкого. Аденокарцинома также развивается сравнительно медленно, но чаще приводит к раннему поражению плевры и гематогенному метастазированию. Мелкоклеточный рак лёгкого характеризуется бурным развитием, быстрым и обильным лимфогенным и гематогенным метастазированием.

Мелкоклеточный рак легкого выделяют в особую группу, остальные же гистологические формы относят к немелкоклеточному раку легкого (НМРЛ) [26]. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), составляющий около 70% всех случаев рака легкого, был обособлен от мелкоклеточного рака (МРЛ) в 1960–80-х гг. Разделение обуславливалось существенно большей злокачественностью клинического течения мелкоклеточной формы: ее быстрым ростом, ранним и выраженным метастазированием, что определяло показания прежде всего к консервативным методам лечения. Напротив, несмотря на гистологические различия опухолей, составляющих немелкоклеточный рак, именно хирургические вмешательства (дополняемые по показаниям лучевой и химиотерапией) стали основным методом лечения НМРЛ, позволяя добиваться существенного продления жизни. Отчетливо выражено различие в частоте гистологических форм в зависимости от клинико–анатомической формы рака легкого. При центральном раке чаще встречается плоскоклеточная структура и недифференцированные формы. Наоборот, аденокарцинома, почти в четыре раза чаще наблюдается при периферическом раке (локализован в субсегментарных бронхах или паренхиме легкого) [26].

Радикальная операция по праву считается наиболее полным лечением. К сожалению, только у 10–20 % больных опухоль диагностируют в операбельной стадии. Эти цифры остаются практически неизменными последние 10–15 лет. Основным критерием эффективности хирургического лечения больных раком легкого является продолжительность жизни – 5-летняя выживаемость. Совокупная статистика данных многочисленных авторов показывает, что, несмотря на совершенствование хирургического метода, этот срок переживает не более 20–30% радикально оперированных больных, и заметной тенденции к улучшению этих результатов не наблюдается. Общеизвестно, что основными факторами, влияющими на продолжительность жизни, являются распространенность и гистологическая структура опухоли.

Химиотерапия препаратами платины занимает устойчивые позиции в лечении пациентов с распространенными формами НМРЛ. С появлением таргетных препаратов возможности лечения больных НМРЛ расширились. Установлено, что рак легкого помимо морфологической

верификации имеет различные молекулярно-генетические подтипы в зависимости от наличия мутаций. Первой выявленной мутацией стала мутация EGFR. Она встречается у 5–10% пациентов с НМРЛ, чаще некурящих, при аденокарциноме, в основном у женщин и в азиатской популяции [27]. Определенный прорыв в лечении рака легкого связан с появлением иммунотерапевтических препаратов, в частности ингибиторов иммунных контрольных точек PD-1 и PD-L1 [28]. Особенно впечатляющие результаты были достигнуты при терапии распространенного НМРЛ с прогрессированием после предшествующей химиотерапии. На сегодняшний день в распоряжении онкологов имеется достаточно широкий выбор разных препаратов. Однако выбор препарата должен быть строго индивидуальным, так как уже очевидно, что многие особенности организма могут повлиять на результаты лечения. На сегодняшний день для назначения иммунотерапевтических препаратов используется только оценка экспрессии PD-L1, что порой недостаточно для получения максимального ответа на проводимую терапию. Также известно, что изменения состава микробиома (например, вызванное приемом антибиотиков) способно значительно изменить ответ на иммунотерапию и свести к минимуму ее потенциальные возможности [29]. На сегодняшний день роль стромы опухолей легкого в прогрессии опухолей подтверждена многочисленными исследованиями. Однако большинство современных исследований не учитывают наличие микробиологической составляющей в опухолевой строме несмотря на то, что бактерии являются фактором способным в значительной степени повлиять на характер активации иммунокомпетентных клеток, что актуально для опухолей легкого. Исследование механизмов этого взаимодействия является актуальной задачей, так как позволит лучше понять патогенез опухоли и разработать новые подходы к ее терапии.

## 1.2 Рак пищевода

Рак пищевода (РП) представляет собой злокачественное заболевание с низкими показателями выживаемости и ограниченными возможностями лечения на поздних стадиях. РП является одним из самых агрессивных злокачественных новообразований. По данным Международного агентства по исследованию рака (МАИР, International Agency for Research on Cancer), в 2018 г. в мире было зарегистрировано 572 тыс. новых случаев РП (3,2 % от общего числа злокачественных новообразований (ЗНО)). В 2018 г. в мире зарегистрировано 508,6 тыс. смертей от РП (5,3 % от общего числа смертей от онкологических заболеваний, 6-ое ранговое место) [30]. Однако в большинстве государств, в том числе и в Российской Федерации, ситуация остается критической. По статистике, в период с 2010 по 2015 г. абсолютное число вновь выявленных больных раком пищевода в России выросло на 10,4 % у мужчин и на 2,1 % у женщин, что свидетельствует о выраженном гендерном различии заболеваемости [31]. В Западной Европе и США отмечается ежегодный 5% прирост заболевших раком пищевода [32]. Наиболее частыми

морфологическими формами являются плоскоклеточный рак (95%) и аденокарцинома (3%). Крайне редко встречаются карциносаркома, мелкоклеточный рак и меланома.

Успех лечения РП затруднен в связи с поздней диагностикой ввиду бессимптомного течения заболевания, а также с высокой агрессивностью опухоли. Примечательно, что почти у 50% пациентов с раком пищевода имеются отдаленные метастазы на момент постановки диагноза [33]. При лечении рака пищевода применяют хирургическое лечение, химио- и лучевую терапию, а также иммунотерапию. К препаратам таргетного воздействия относятся антагонисты VEGFR2, блокирующие путь VEGF/VEGFR2, что приводит к ингибированию ангиогенеза и препараты антител к HER2, подавляющие пролиферацию опухолевых клеток. Также к препаратам иммунотерапии относятся ингибиторы контрольных точек, направленные на сигнальный путь PD-1, препятствующие блокированию активности Т-лимфоцитов, которые начали использовать в терапии данной патологии в течение нескольких последних лет.

### **1.3 Хроническое воспаление и онкологические заболевания**

Связь воспаления и рака была предположена еще в 1863 году, когда Вирхов выдвинул гипотезу возникновения рака в результате хронического воспаления [34]. Но, если в 19 веке основной причиной возникновения опухоли считалась усиливающаяся в месте воспаления пролиферация клеток, то в настоящее время стало очевидным, что для развития злокачественного новообразования одной лишь стимуляции пролиферации недостаточно. Сегодня причинно-следственная связь между воспалением, врожденным иммунитетом и опухолью стала практически общепризнанной, несмотря на то что многие молекулярные и клеточные элементы механизма этого взаимодействия пока не ясны.

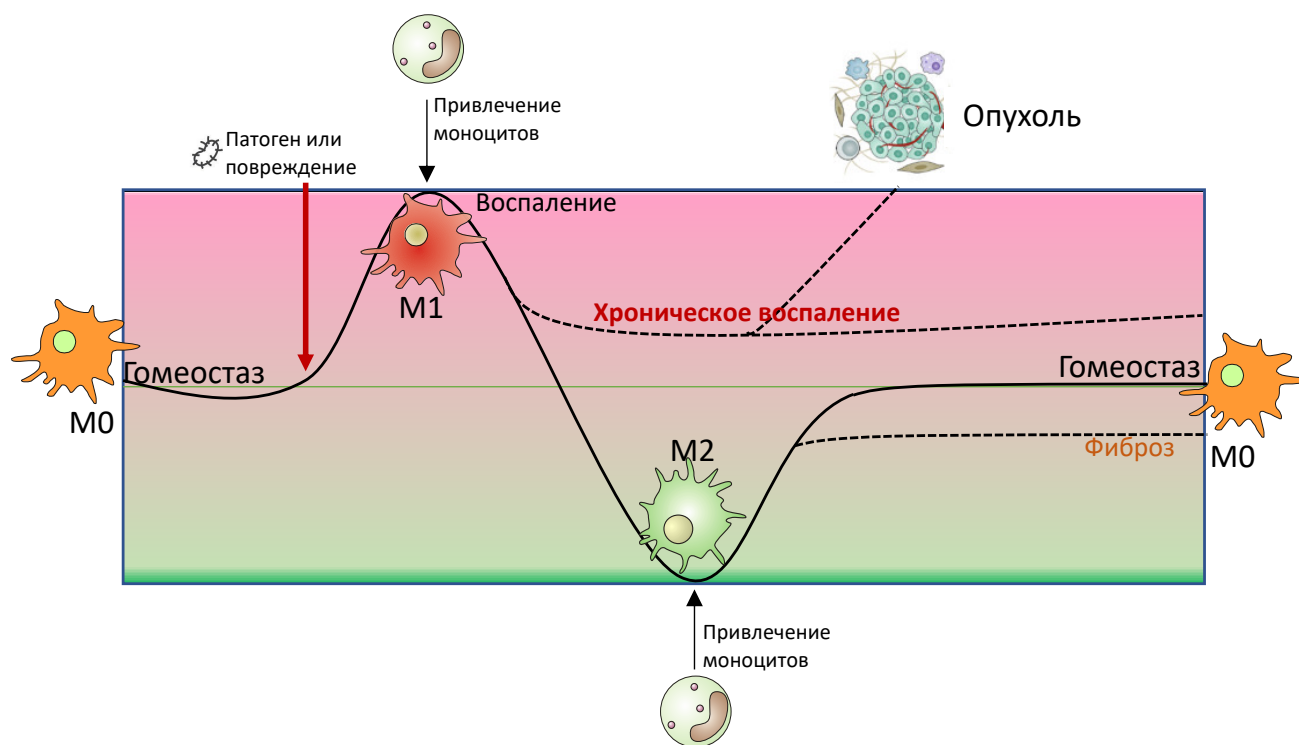
Для того чтобы понять, каким образом воспаление может приводить к развитию рака, необходимо, прежде всего, понять детали самого процесса воспаления и его роль в таких физиологических процессах как инфекция и регенерация.

В ответ на повреждение ткани в организме запускается сложный каскад молекулярных и клеточных реакций, направленных на восстановление поврежденной ткани. Спусковым механизмом воспалительной реакции является активация тромбоцитов, в результате которой в месте повреждения выбрасываются гепарин, серотонин, тромбин факторы коагуляции, белки клеточной адгезии, ростовые факторы – PDGF, трансформирующий фактор роста бета, тромбоцитарный фактор-4 (PF-4) и другие [34]. Ростовые факторы, производимые тромбоцитами, приводят к стимуляции миграции нейтрофилов, которые реагируют на выбрасываемые тромбоцитами ростовые факторы и на бактериальные продукты, находящиеся в месте повреждения. Несмотря на терминальную дифференцировку, нейтрофилы сохраняют способность производить значительные количества цитокинов и хемокинов, необходимых для привлечения эффекторных клеток [35]. Нейтрофилы стимулируют воспалительную реакцию,



производя провоспалительные цитокины TNF [36], IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  [37]. Эти цитокины действуют на эндотелий близлежащих сосудов и стимулируют адгезию лейкоцитов, которые мигрируют к точке повреждения. Кроме того, нейтрофилы могут запускать первичные механизмы регенерации, стимулируя продукцию матриксных металлопротеиназ и фактора роста кератиноцитов фибробластами [38].

Миграция моноцитов стимулируется растворимыми факторами, секретируемыми тромбоцитами и нейтрофилами: PF-4, TGF- $\beta$ , PDGF, MCP-1, -2, -3, MIP1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF и IL-1 $\beta$ . Количество моноцитов, инфильтрирующих место воспаления, достигает максимума к тому моменту, когда количество нейтрофилов уже снижается. Инфильтрирующие моноциты дифференцируются в макрофаги и дендритные клетки и активируются под действием цитокинов и ростовых факторов, производимых нейтрофилами и тромбоцитами (Рисунок 1) [39].



**Рисунок 1** – Активация макрофагов при воспалении

Активированные макрофаги являются основными источником ростовых факторов и цитокинов TGF- $\beta$ 1, PDGF,  $\beta$ EGF, TGF- $\alpha$ , TNF и IL-1, играющих ключевую роль в регуляции активности клеток, восстанавливающих поврежденную ткань. Кроме того, макрофаги сами активно участвуют в этом процессе производя компоненты внеклеточного матрикса, ферменты для его перестройки, фагоцитируя апоптотические и некротические клетки и стимулируя ангиогенез [40, 41]. При этом хемокины, регулирующие процесс регенерации, не только инициируют миграцию лейкоцитов, но и обеспечивают своевременное подавление воспалительной реакции. Так MCP-1, являющийся одним из основных факторов хемотаксиса

моноцитов, так же инициирует продукцию IL-4, что приводит к переходу воспаления из фазы Th1 в Th2. Таким образом, воспаление представляет собой самоограничивающийся процесс, причем это его свойство определяется последовательностью продукции цитокинов лейкоцитами. Так, например, ответ макрофагов на липополисахарид (LPS) можно разделить на две фазы. В первой фазе макрофаги производят большие количества провоспалительного цитокина TNF, продукция которого достигает максимума через 3 часа после начала стимуляции и блокируется внутриклеточными механизмами не позднее, чем через 6 часов. На втором этапе макрофаги начинают производить противовоспалительный цитокин IL-10, который подавляет продукцию провоспалительных цитокинов во вновь приходящих клетках. Кроме того, TNF, стимулирующий воспалительный ответ, способен подавлять продукцию IL-12, необходимого для активации Th1 клеток [42]. Благодаря наличию такой системы регуляции воспаления, очевидно, существует высокоэффективная многоуровневая система контроля нормального протекания этого процесса, которая приводит к своевременному завершению воспалительной реакции. Нарушение функционирования этой системы контроля приводит к патологии и развитию хронического воспаления.

Каким же образом макрофаги, стимулирующие воспалительную реакцию, способствуют возникновению опухолей? Статистика показывает, что большое количество (более 15%) злокачественных опухолей может быть косвенно связано с той или иной инфекцией [43-46]. Персистирующая инфекция так же, как и нарушение механизмов регуляции процесса воспаления, приводит к развитию хронического воспаления. В этой ситуации основные компоненты воспалительного инфильтрата - макрофаги и нейтрофилы - не получают ингибирующего сигнала достаточной силы и пребывают в состоянии провоспалительной активности, которое характеризуется повышенной продукцией бактерицидных соединений кислорода и азота. Будучи высокоактивными сами по себе эти соединения способны реагировать и приводить к образованию пероксонитрита, являющегося мутагеном [47]. Таким образом, при хроническом воспалении в ткани одновременно активированы 2 процесса: 1) повреждение ткани патогеном (или бактерицидной активностью макрофагов) и 2) стимуляция регенерации. Комбинация этих процессов приводит к повышенной пролиферации эпителиальных клеток на фоне высоких концентраций мутагенных соединений, что ведет к ускорению накопления таких геномных aberrаций, как точечные мутации, делеции и перестройки. Эксперименты показали, что частота мутаций гена p53, обнаруживаемая при таких хронических воспалительных заболеваниях как ревматоидный артрит или воспалительные заболевания кишечника, близка к частоте подобных мутаций в опухолях [48].

Наиболее сильная корреляция хронического воспаления и злокачественных опухолей наблюдается в случае таких воспалительных заболеваний кишечника как язвенный колит и

болезнь Крона [49]. Так же и хроническая инфекция вирусом гепатита С приводит к повышению риска развития гепатоклеточной карциномы [50]. Хроническое воспаление, вызываемое *H.pylori*, считается одной из основных причин развития рака желудка [51]. Несмотря на то, что прямое повреждение ДНК считается основным механизмом, способствующим появлению злокачественной опухоли на фоне хронического воспаления, существуют данные, позволяющие утверждать, что клетки воспалительного инфильтрата способствуют инициации опухолей и за счет секреции цитокинов. Так, производимый макрофагами MIF (macrophage inhibitory factor) подавляет активность p53 [52], что приводит к недостаточно эффективному ответу на повреждение ДНК, увеличению продолжительности жизни клеток и, как следствие, к еще более эффективному накоплению мутаций. Таким образом, можно утверждать, что нарушение функционирования контроля воспалительной реакции может приводить к инициации опухолей.

Роль иммунной системы в прогрессии опухолей более века является предметом широких дискуссий. В начале 20 столетия Пауль Эрлих выдвинул предположение, что при отсутствии иммунной системы онкологические процессы встречались бы с намного большей частотой [53]. Из-за технических ограничений дальнейшее развитие эта теория приобрела лишь спустя более 50 лет, когда Франком Бернетом в конце 60-х годов была разработана теория «иммунологического надзора», которая позднее была подтверждена Питером Медавром [54]. Следующий виток развития концепция противоопухолевого действия иммунной системы получила в 90-е годы, когда была установлена значимость интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) для отторжения искусственно-прививаемых иммунных клеток [55]. По мере развития онкоиммунологии были изучены основополагающие механизмы чрезвычайно разностороннего взаимодействия клеток иммунной системы с генетически-чужеродными агентами и собственными трансформировавшимися клетками. Центральную роль при элиминировании опухолевых клеток играют макрофаги, натуральные киллеры и Т-клетки. Цитотоксическая активность макрофагов является мощным фактором, сдерживающим прогрессию онкологических заболеваний, однако в ряде случаев в результате взаимодействия с опухолевыми клетками макрофаги «перепрограммируются», и их активность обращается в пользу опухоли (концепция иммуноредактирования). Помимо этого, под воздействием цитотоксической активности макрофагов в опухоли может происходить селекция клеток, устойчивых к данному воздействию, что, в свою очередь, способствовать отбору более злокачественных клонов и прогрессии опухолей. Проверке данной гипотезы, в частности, посвящено данное исследование. Полученные результаты исследования создают предпосылки для значительных изменений в подходе к лечению онкологических заболеваний.

## 1.4 Микроокружение опухоли

Злокачественность первичной опухоли и способность ее к прогрессии в сильной степени зависит от микроокружения – опухолевой стромы [1]. Взаимодействия между клеточными и структурными компонентами опухолевого микроокружения позволяют неопластическим клеткам приобретать инвазивные свойства и распространяться из первичного очага [10]. Состав микроокружения варьирует в зависимости от типа опухоли, но обычно включает в себя иммунные клетки, стромальные клетки, кровеносные сосуды и внеклеточный матрикс. Так, фибробласты, ассоциированные с опухолью, реорганизуют окружающий матрикс, создавая пути миграции для распространения опухолевых клеток. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, являются одной из основных частей опухолевого инфильтрата и обладают рост-стимулирующими и иммуносупрессорными функциями. Кроме того, внеклеточный матрикс опухоли также играет определяющую роль в прогрессии заболевания и принимает участие в регуляции ответа на терапию.

### 1.4.1 Макрофаги стромы

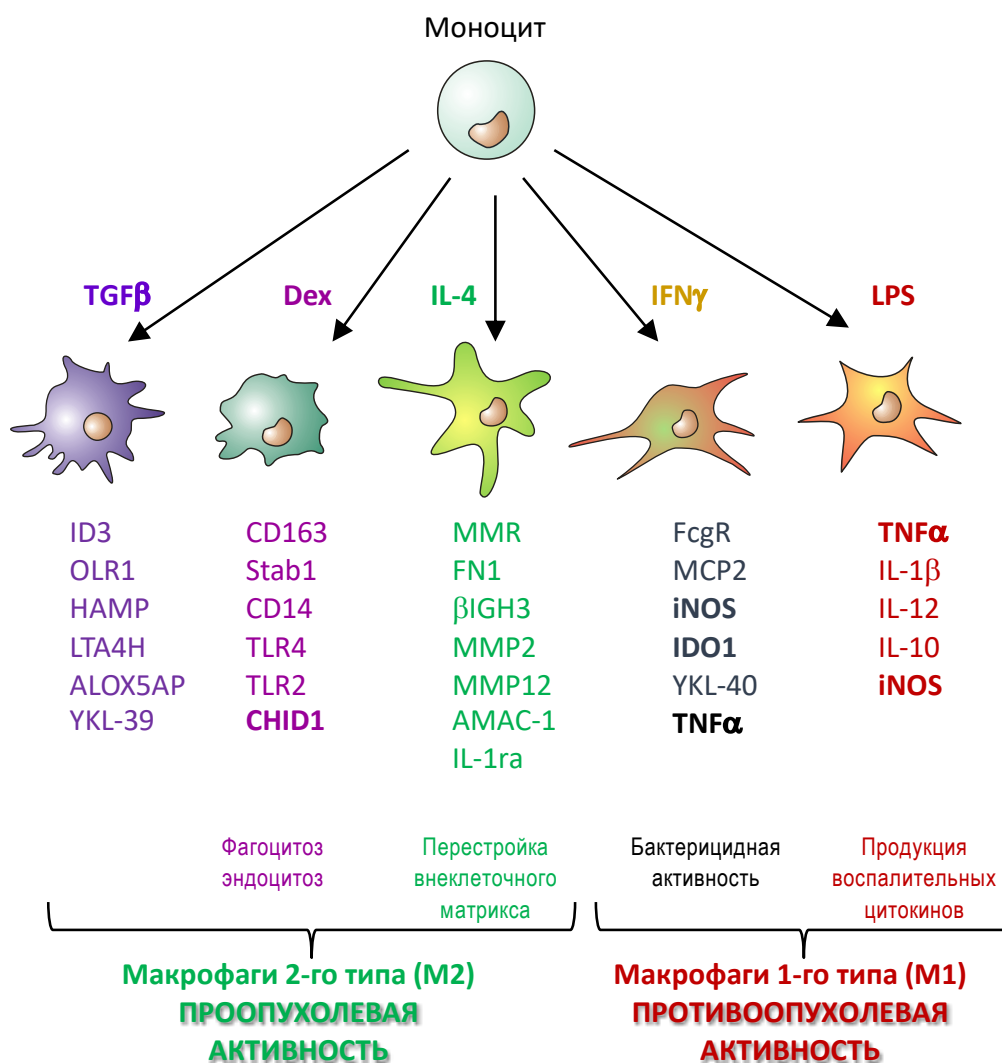
Макрофаги являются основными клетками системы врожденного иммунитета. Они происходят из моноцитов, мигрирующих из кровяного русла в ткани. Макрофаги присутствуют во многих тканях человеческого организма: в костном мозге, в соединительной ткани, в легких (альвеолярные макрофаги), в печени (купферовские клетки), в селезенке и лимфатических узлах, в серозных полостях (брюшной полости, полости плевры, полости перикарда), в костной ткани (остеокласты), в нервной ткани (микроглиальные клетки), в коже (клетки Лангерганса).

В кровотоке моноциты составляют до 11% всех белых клеток крови (лейкоцитов). Сформировавшись в костном мозге, моноцит находится там от 30 до 60 часов. После этого он делится и поступает в кровоток. Среднее время жизни моноцитов в кровотоке составляет 3 суток, в течение которых они мигрируют в ткани с последующим превращением в резидентные тканевые макрофаги. В отсутствии миграции и стимулов для дальнейшей дифференцировки моноциты погибают посредством запускаемого в них апоптоза. После выхода из кровяного русла моноцит, как правило, больше не может вернуться в циркуляцию. Важнейшая роль в процессе превращения моноцита в зрелый дифференцированный макрофаг принадлежит процессу аутофагии [56-58].

Макрофаги в различных тканях человеческого организма имеют ряд общих особенностей. При исследовании альвеолярных макрофагов было выявлено, что они поддерживают свою популяцию не только за счет образования в костном мозге, но также за счет имеющейся у них способности к делению и самоподдержанию. Данная отличительная черта макрофагов

становится очевидной в случае подавления образования данных клеток крови в костном мозге под влиянием облучения или препаратов с цитостатическим действием.

Макрофаги могут адаптировать свой фенотип к изменяющемуся микроокружению [59, 60] (Рисунок 2). Для эффективного выполнения своих функций макрофаги в процессе дифференцировки приобретают определенный фенотип, характерный для соответствующего места и времени. Подобно дихотомии Т-клеток, в процессе которой происходит их разделение на Th1 и Th2 в зависимости от производимых ими цитокинов (INF $\gamma$  и IL4 соответственно), описана и макрофагальная дихотомия, вследствие которой выделяют классически активированные M1 макрофаги, а также альтернативно активированные M2 [61, 62].



**Рисунок 2** – Варианты активации и дифференцировки макрофагов

К макрофагам первого типа активации относятся макрофаги, развивающиеся при стимуляции Th1 цитокином INF- $\gamma$  или бактериальными продуктами, такими как, например, LPS. К макрофагам второго типа активации относятся макрофаги, развивающиеся в результате

воздействия Th2 ассоциированных цитокинов IL-4, IL-13, IL-10; трансформирующего фактора роста бета и противовоспалительных факторов, таких как глюкокортикоиды и ретиноиды [63]. Макрофаги 1 типа (M1) продуцируют провоспалительные цитокины TNF и IL-1 $\beta$  и экспрессируют Fc-гамма-рецепторы на поверхности клеток [62, 64]. Макрофаги 2 типа (M2) продуцируют противовоспалительные цитокины и хемокины IL-1Ra, IL-10, CCL18 и экспрессируют различные поверхностные скавенджер-рецепторы [65-67]. Механизм активации макрофагов очень сложен и включает в себя несколько различных сигнальных каскадов [68, 69]. Однако обнаружено, что факторы, ранее рассматривавшиеся как инактивирующие (противовоспалительные факторы), порой приводят к специфичной активации макрофагов и приобретению ими новых свойств [70, 71]. Например, показано, что интерлейкин-4 приводит к повышению продукции белков внеклеточного матрикса и ферментов для его моделирования, указывая на участие макрофагов этого типа в заживлении повреждений [65]. При этом глюкокортикоиды подавляли продукцию компонентов внеклеточного матрикса и повышали экспрессию скавенджер-рецепторов, а также эндоцитозный и фагоцитозный потенциал макрофагов [60, 66]. Кроме того, было обнаружено, что независимо от типа активации макрофаги сохраняют способность реагировать на бактериальные стимулы, обеспечивая тем самым достаточную иммунную защиту организма [60]. В целом, анализ баланса про- и противовоспалительной активности первичных моноцитов-макрофагов человека является перспективной возможностью для выявления иммунопатологий.

Несмотря на то, что макрофаги были впервые описаны более 100 лет назад, многие их свойства оставались и остаются неизученными. Например, в последние годы описан новый фенотип макрофагов (M3), сочетающий в себе черты, характерные как для M1, так и для M2 макрофагов. А именно, данный тип клеток был получен *in vitro*, путем совместного культивирования мезенхимальных стволовых клеток с первичными моноцитами [72]. Такие макрофаги (M3) демонстрировали высокий уровень экспрессии CD206, являющегося маркером M2. Также они продуцировали много IL-10, мало IL-12 и TNF- $\alpha$ , что так же свойственно M2 типу поляризации макрофагов. Одновременно с этим наблюдалась активная секреция IL-6, характерного для макрофагов первого типа активации. Кроме того, они демонстрировали повышенную фагоцитарную активность. Таким образом, авторы работы выделяют новый и уникальный тип макрофагов, обладающих перспективной ролью в регенеративной медицине. Можно предположить, что концепция дихотомии макрофагальной активации имеет лишь ограниченное право на существование и должна уточняться с учетом различий макрофагальных фенотипов, образующихся в результате стимуляции макрофагов тем или иным цитокином или гормоном. На сегодняшний день в литературе описано огромное количество различных макрофагальных фенотипов [73], однако их клиническую значимость еще предстоит установить.

Большинство современных исследований посвящены функциональному анализу молекулярных маркеров макрофагов второго типа, что считается необходимым для понимания механизма действия макрофагов, ассоциированных с опухолью (МАО), и выяснения, какие из их функций способствуют росту опухоли. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, считаются основными клетками врожденного иммунитета, принимающими участие в развитии и прогрессии опухолей. Считается, что классически активированные макрофаги (M1) обладают противоопухолевой активностью и способствуют уничтожению опухолевых клеток. Для них, в отличие от M2 макрофагов, недостаточно описаны молекулярные маркеры функционирования и практически нет исследований, характеризующих их количество, локализацию и фенотип в опухолях.

Многочисленные клинические исследования показывают ассоциацию повышенной плотности M2 макрофагов с неблагоприятным прогнозом при многих солидных опухолях. Для некоторых типов опухолей, например для рака легкого, показано, что большую прогностическую ценность имеет соотношение M1/M2 фенотипов, а также их локализация [3].

Все МАО, включая как M1-подобные, так и M2-подобные подтипы, могут быть идентифицированы и количественно определены с помощью иммуногистохимического окрашивания на CD68, тогда как M1-подобные макрофаги характеризуются экспрессией дополнительных маркеров, например, iNOS и IDO1, а M2-подобные макрофаги характеризуются наличием дополнительных маркеров, таких как CD206, CD204 и CD163.

**CD68** является единственным известным скавенджер-рецептором класса D. CD68 - это гликозилированный мембранный белок I типа, входящий в семейство белков лизосомальной мембраны LAMP [74]. CD68 преимущественно экспрессируется в поздних эндосомах и лизосомах макрофагов, но также обнаруживается на поверхности дендритных клеток (ДК) и остеокластов [75, 76]. Показано, что CD68 из эндосом и лизосом способен быстро перемещаться на плазматическую мембрану [77]. CD68 широко используется в качестве общего макрофагального маркера [78], в частности, при оценке клеточного состава опухолевого микроокружения. Высокое содержание макрофагов (CD68+) в опухоли часто ассоциировано с сильной васкуляризацией и метастазированием, а также со снижением общей выживаемости, например, при раке молочной железы [79]. Следует отметить, что для тех типов опухолей, в которых большое количество опухоли ассоциированных макрофагов является индикатором плохого прогноза, так же на плохой прогноз указывает повышенная экспрессия макрофагальных ростовых факторов и хемокинов. Так CCL2 часто экспрессируется в опухолях яичников, шейки матки, мочевого пузыря, молочной железы и глиомы, при этом в случае рака молочной железы, шейки матки и мочевого пузыря повышенная экспрессия CCL2 указывает на плохой прогноз [80-

82]. M-CSF – цитокин, отвечающий за выживание и дифференцировку макрофагов, также экспрессируется клетками опухолей яичников, матки, молочной железы и простаты [45, 83-86].

**CD163** – скавенджер-рецептор для гемоглобина, опосредующий его эндоцитоз путем распознавания комплексов гемоглобин/гаптоглобин, является членом класса I, и экспрессируется в большинстве субпопуляций зрелых тканевых макрофагов в ответ на противовоспалительные цитокины, такие, как IL-6 и IL-10 [87, 88]. Помимо комплекса гемоглобин-гаптоглобин, CD163 может связывать фибронектин и некоторые PAMP вирусов и бактерий (прямо и при участии фибронектина). Помимо мембрано-связанной формы, CD163 также присутствует в плазме крови в виде растворимой формы sCD163 и обладает опсонизирующей активностью. Таким образом, CD163 является рецептором M2-макрофагов. Он принимает участие в иммунных и гомеостатических процессах и способствует ограничению продукции провоспалительных цитокинов и дифференцировке макрофагов в направлении M2. Традиционно уровень CD163+ макрофагов ассоциируется с плохим прогнозом для пациентов с НМРЛ [89-93]. Показано, что высокая экспрессия CD163 в клетках стромы у пациентов с НМРЛ достоверно коррелировала со снижением общей и безрецидивной выживаемости [91].

**CD206** (маннозный рецептор 1) экспрессируется на дендритных клетках и стромальных макрофагах различных органов (кожа, кишечник, жировая ткань и др.), является маркером альтернативно активированных макрофагов (M2). Рецептор CD206 участвует в распознавании микробных гликанов, измененных гликопротеинов плазмы крови, коллагена (включая различные коллагены внеклеточного матрикса). Повышенное содержание CD206+ опухоль ассоциированных макрофагов в солидных опухолях часто ассоциировано с неблагоприятным прогнозом заболевания, однако литературные данные противоречивы. Так CD206 активно экспрессируется на поверхности макрофагов в аденокарциноме простаты, а количество CD206+ MAO коррелирует с плохим прогнозом данного заболевания [94].

**CD204** – трансмембранный скавенджер-рецептор класса A типа 1, распознает широкий спектр эндогенных и экзогенных лигандов и играет роль в метаболизме липидов, атерогенезе, подавлении провоспалительного ответа, опосредованного Toll-подобным рецептором 4 [95]. Накапливающиеся данные показали, что CD204+ MAO связаны с агрессивным поведением при различных формах онкологических заболеваний и связаны с плохим прогнозом [96, 97]. Однако некоторые исследования показали, что высокое содержание макрофагов M1, CD204+ и CD68+ является независимыми прогностическими факторами увеличения выживаемости при НМРЛ [98].

**PU.1** относится к семейству транскрипционных факторов E26, необходимых для развития иммунной системы, и кодируется геном *Sp1*. PU.1 участвует в гемопоэзе, его экспрессия определяет развитие лимфоидных и миелоидных клеток, в особенности макрофагов,



гранулоцитов, дендритных клеток, а также играет важную роль в дифференцировке иммунных клеток по лимфоидному типу. Высокий уровень экспрессии PU.1 характерен для миелоидных клеток [99], в то время как В-клетки экспрессируют его в меньшем количестве [100]. Несколько более низкий уровень его экспрессии отмечен в гранулоцитах, мегакариоцитах, тучных клетках и незрелых клетках эритроидного ряда. Зрелые Т-лимфоциты PU.1 не экспрессируют. В контексте солидных опухолей изучение прогностической и клинической значимости экспрессии PU.1 проведено на раке молочной железы и глиомах [101, 102], причем для обеих нозологий показана ассоциация его экспрессии с прогрессией и неблагоприятным прогнозом.

Помимо традиционных маркеров макрофагов, которые активно используются в различных научных исследованиях, хочется отметить те молекулы, экспрессия которых характерна одновременно как для макрофагов, так и для других типов клеток (в частности, опухолевых). К таким молекулам можно отнести PD-L1, IDO1, iNOS, CHID1 и др.

**PD-L1** (programmed cell death ligand 1, CD274) – гликопротеин, контролирующий активность иммунной системы, взаимодействует с рецептором PD-1 на поверхности Т-клеток, вызывая их ингибирование и апоптоз, тем самым способствуя сдерживанию аутоиммунного ответа во время воспаления или противоопухолевого ответа [103-105]. Экспрессия PD-L1 наблюдается на макрофагах, дендритных клетках, В- и Т-лимфоцитах, эпителиальных, мышечных и эндотелиальных клетках, в то время как PD-1 экспрессирован в основном на CD8+ Т-клетках [103]. Известно, что помимо основной функции сигнального пути PD-1 – подавления пролиферации Т-клеток, PD-1 выполняет аналогичную функцию в В-клетках. Механизм его функционирования аналогичен механизму функционирования в Т-клетках и опосредован взаимодействием В-клеточного рецептора с антигеном [106], однако ингибирующий эффект сигнального пути PD-1 в В-клетках значительно ниже, чем в Т-клетках.

Кроме того, PD-L1 часто можно обнаружить в опухолевых клетках [107]. В то же время прогностическая роль PD-L1 неоднозначна. Различные исследования показали, что экспрессия PD-L1 связана с лучшим прогнозом [108, 109], худшим прогнозом [110] или не имеет прогностической значимости [111].

В нормальной паренхиме легких экспрессии PD-L1 не наблюдается, однако его экспрессия выявляется в альвеолярных макрофагах [107]. Уровень экспрессии PD-L1 в различных гистологических типах НМРЛ различается: наиболее высокий уровень наблюдается в образцах крупноклеточного рака по сравнению с аденокарциномой и плоскоклеточным вариантом [107].

Экспрессия PD-L1 при НМРЛ также коррелирует со степенью дифференцировки и регионарным метастазированием [107]. Кроме того, на поздних стадиях НМРЛ наблюдается тенденция к повышению уровня экспрессии PD-L1 [107]. Стоит отметить, что пациенты с

высоким уровнем экспрессии PD-L1 на ранних стадиях заболевания характеризовались более благоприятным прогнозом по сравнению с пациентами с низкой экспрессией [112]. Известно, что экспрессия PD-L1 является прогностическим маркером ответа на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета [113], однако широкое внедрение в клиническую практику иммунотерапевтических препаратов продемонстрировало, что анализа экспрессии PD-L1 в монорежиме недостаточно для достижения максимального числа объективных ответов.

**IDO1** (indolamine 2,3-dioxygenase-1) - фермент, участвующий в метаболизме триптофана с образованием *N*-формилкинурина. Гиперэкспрессия IDO1 ведет к недостатку триптофана в опухоли, что приводит к супрессии Т-эффекторных клеток и привлечению Т-клеток регуляторного фенотипа и, как следствие, к подавлению противоопухолевого иммунного ответа. Экспрессия IDO1 обнаруживается и в нормальных тканях, например, в плаценте, легких, тонком и толстом кишечниках, селезенке, печени, почках, желудке и мозге, участвуя в антимикробном и противоопухолевом ответе, регуляции иммунного ответа и антиоксидантной защите. Кроме того, IDO1 можно обнаружить в эпителиальных клетках, фибробластах, клетках эндотелия и гладких мышц, а также в опухолевых клетках под воздействием IFN- $\gamma$  [114-116].

Накоплено большое количество данных, свидетельствующих о наличии корреляции IDO1 с прогнозом заболевания. Так, было показано, что экспрессия IDO1 является маркером плохого прогноза для рака молочной железы [117], рака шейки матки [118], мультиформной глиобластомы [119], меланомы [120], рака эндометрия [121] и мочевого пузыря [122]. На примере опухолей легкого было показано, что IDO1 обнаруживается в большем количестве в опухолевых клетках, по сравнению со стромой [123].

При НМРЛ усиление катаболизма триптофана, приводящее к более высокой концентрации кинуренина в сыворотке крови, ассоциировано с более поздней стадией заболевания, худшим прогнозом и меньшей вероятностью ответа на химиотерапию [124-126]. Также необходимо отметить, что увеличение активности IDO1 может быть связано с устойчивостью к терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета, которые на сегодняшний день активно применяются в терапии НМРЛ и меланомы [127, 128].

**Синтаза оксида азота (NOS)** регулирует превращение аминокислоты L-аргинина в эндогенный оксид азота (NO) [129]. NO — это маленькая, короткоживущая молекула, необходимая для регуляции различных физиологических процессов, включая иммунные реакции, передачу нервных импульсов и вазодилатацию. Функция NO в канцерогенезе многогранна, поскольку он может как способствовать, так и препятствовать прогрессии опухолей в зависимости от различных условий. Высокий уровень NO в клетках может приводить к их апоптозу, в то время как низкий уровень вызывает пролиферацию клеток и стимулирует ангиогенез [130].

Продукция NO регулируется семейством белков NOS, которое включает нейрональную NO-синтазу (nNOS), индуцибельную NO-синтазу (iNOS) и эндотелиальную NO-синтазу (eNOS). nNOS и eNOS экспрессируются в определенных типах клеток и способствуют продукции NO в относительно небольших количествах. В отличие от них, iNOS является изоформой, экспрессия которой индуцируется воспалительными стимулами, что приводит к синтезу более высоких уровней NO в условиях хронического воспаления [131]. Таким образом, именно iNOS в основном отвечает за повышенное производство NO. Ввиду наличия тесной связи между процессами хронического воспаления и развития онкологических заболеваний, роль iNOS активно исследуется в контексте канцерогенеза. Показано, что повышенная экспрессия iNOS ассоциирована с ангиогенезом, устойчивостью к химиотерапии, метастазированием и иммунной резистентностью некоторых злокачественных опухолей, например. Такая связь обнаружена при колоректальном раке, раке молочной железы, раке мочевого пузыря, раке желудка и меланоме [132-135]. Кроме того, в ряде исследований показано, что экспрессия iNOS коррелирует с неблагоприятным прогнозом заболевания [136-138], однако в целом прогностическое значения экспрессии данного белка в опухолях остается противоречивым. Например, для колоректального рака показано, что экспрессия iNOS ассоциирована с благоприятным прогнозом заболевания [139]. Для НМРЛ опубликовано только одно исследование, свидетельствующее о том, что экспрессия iNOS в опухолях данной локализации может служить маркером хорошего прогноза [140].

Хитиназоподобные белки представляют собой белковые молекулы, структурно сходные с хитиназами (ферментами, обладающими способностью расщеплять хитин). Хитиназоподобные белки имеют хитин-связывающий домен, но не обладают ферментативной активностью. У человека идентифицировано 3 таких белка: YKL-40 (CHI3L1), YKL-39 (CHI3L2) и SI-CLP (**CHID1**). Они экспрессируются различными типами клеток как в норме, так и при патологии [141-143]. Например, YKL-40 экспрессируется различными клетками, включая макрофаги, нейтрофилы, эпителиальные и синовиальные клетки, а также клетками злокачественных опухолей различного происхождения. YKL-40 может секретироваться в межклеточное пространство или непосредственно в кровотоки, что делает его потенциальным маркером многих патологий. Показано, что данный белок повышает способность опухолевых клеток к пролиферации и инвазии на модели глиобластом и колоректального рака [144, 145]. YKL-39 представляет собой секреторный белок хондроцитов, принадлежащих к семейству гликозилгидролазы 18. Его максимальная экспрессия наблюдается в хондроцитах, синовиоцитах, легких и сердце, а также макрофагах. На сегодняшний день он может считаться маркером остеоартрита в синовиальной жидкости и сыворотки крови [146-148]. Он не обнаруживается в селезенке, поджелудочной железе и печени. YKL-39 также может экспрессироваться в

развивающемся мозге и плаценте. Также повышенный уровень экспрессии гена *YKL-39* показан у пациентов с болезнью Альцгеймера и в глиобластомах [149]. Какую функциональную роль может выполнять данный белок в глиобластомах на данный момент не известно, однако предполагается, что он может отвечать за пролиферативную способность клеток и ремоделирование внеклеточного матрикса [150]. За счет того, что данный белок является секретрируемым, на него возлагают надежды как на потенциальный маркер глиобластом. Аналогичная картина наблюдается для белка CHID1. CHID1 экспрессируется в большинстве нормальных клеток и секретрируется. Существуют данные, указывающие на его экспрессию в некоторых типах опухолей (в частности, в глиобластомах), что в дальнейшем при более детальном изучении позволит использовать исследование экспрессии данного белка в качестве предиктивного опухолевого маркера. CHID1 экспрессируется альтернативно активированными макрофагами под действием IL-4 и дексаметазона, что может быть актуально в контексте канцерогенеза. В любом случае роль данного белка в развитии и прогрессии опухолей, в том числе и НМРЛ, еще предстоит установить.

Одним из первых цитокинов, описанных как важнейшие медиаторы опухолевых клеток, был провоспалительный **фактор некроза опухоли (TNF- $\alpha$ )**. TNF- $\alpha$  – ключевой хемокин воспаления, который участвует в активации клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе. Основными источниками TNF- $\alpha$  являются макрофаги и Т-клетки, его экспрессия индуцируется в ответ на действие провоспалительных факторов, таких как LPS, вирусные и бактериальные антигены, энтеротоксины, анафилотоксин C5a, IL-1, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TGF- $\beta$  и сам TNF- $\alpha$ . Основными ингибиторами экспрессии TNF- $\alpha$  принято считать IL-6 и IL-10. TNF- $\alpha$  имеет растворимую (sTNF- $\alpha$ ) и связанную с мембраной (tmTNF- $\alpha$ ) формы, связывающиеся с рецепторами TNFR1 и TNFR2. Следует отметить, что рецептор 1 присутствует во всех клетках и способен активироваться как sTNF- $\alpha$ , так и tmTNF- $\alpha$ , в то время как для активации TNFR2, присутствующего только в иммунных и эндотелиальных клетках, необходим tmTNF- $\alpha$ . Связывание TNF- $\alpha$  с рецепторами ведет либо к индукции апоптоза, опосредованного активацией каспаз, либо к развитию воспаления, опосредованного запуском антиапоптотических путей и повышением экспрессии провоспалительных цитокинов, основными драйверами которых становятся активированные NF- $\kappa$ B, AP-1 и MAP-киназный каскад. Такие полярные биологические эффекты TNF- $\alpha$  опосредуют его противоречивое значение в канцерогенезе.

Показано, что уровень экспрессии TNF- $\alpha$  повышается при различных онкологических патологиях. Роль тканевой экспрессии TNF- $\alpha$  в контексте клинко-морфологических характеристик в случае рака легкого не определена, и работ, посвященных этому направлению, крайне мало. Так, Shang GS et. al, изучая экспрессию TNF- $\alpha$  методом ПЦР показали, что данный цитокин вместе с IL-6 способствуют метастазированию рака легкого [151].

Иммуногистохимическое исследование, проведенное Chandra MO et. all, выявило, что повышенная экспрессия TNF- $\alpha$  в опухолевых клетках была независимым благоприятным прогностическим маркером, в то время как высокое содержание TNF $\alpha$  в стромальных клетках опухоли было независимым предиктором снижения выживаемости у пациентов с НМРЛ [152].

#### 1.4.2 Т-клетки стромы

Т-лимфоциты играют важную роль в адаптивном иммунном ответе, и их способность распознавать широкий набор антигенов необходима для поддержания нормального гомеостаза. Однако, роль Т-клеток в противоопухолевом иммунитете остается довольно сложной для изучения ввиду ее многогранности. Активация Т-лимфоцитов требует двух независимых, обязательных взаимодействий. Первое взаимодействие происходит посредством распознавания основного комплекса гистосовместимости (МНС)/антигена на антигенпрезентирующих клетках (APCs) и соответствующего антигенспецифического Т-клеточного рецептора (TCR) на Т-клетках. С другой стороны, второе взаимодействие осуществляется путем связывания костимулирующих молекул и их рецепторов/лигандов. В отсутствие костимулирующего сигнала связывание TCR с комплексом МНС/антиген приводит к дисфункции или анергии Т-клеток. Основные костимулирующие сигналы передаются молекулами семейства В7, включая CD80 (В7-1) и CD86 (В7-2), и их рецепторов CD28 и CTLA-4, которые могут проводить положительные или отрицательные костимулирующие сигналы при инициации Т-клеточного ответа.

Так микроокружение опухоли имеет решающее значение для ее роста и состоит из различных типов иммунных клеток, которые перепрограммированы специфическим образом, чтобы уклоняться от противоопухолевого иммунитета. Процесс ухода от иммунного ответа достигается как наличием дисфункциональных антигенпрезентирующих клеток, включая дендритные клетки и макрофаги, так и повышенной экспрессией ингибирующих молекул В7 aberrantными стромальными или опухолевыми клетками [153]. Также важным механизмом ухода от иммунологического надзора является перепрограммирование Т-клеток в иммуносупрессорный фенотип (Treg), которые индуцируют выработку IL-6 и IL-10 макрофагами, что приводит, в частности, к повышенной экспрессии В7-Н4 посредством аутокринных и паракринных механизмов [154]. Кроме того, антигенпрезентирующие клетки секретируют высокие уровни TGF- $\beta$ , которые, в свою очередь, усиливают экспрессию В7 и ингибирование Т-клеток посредством регуляции клеточного цикла.

**CD3** представляет собой белковый комплекс на поверхности Т-лимфоцитов, являющийся корцептором Т-клеточного рецептора. CD3 является поверхностным маркером зрелых Т-клеток и используется для выявления общего их содержания в различных типах тканей.

**CD8** Т-клетки являются подмножеством лимфоцитов, развивающихся в тимусе, и предназначены для обнаружения антигенных пептидов, представленных молекулами МНС

класса I с последующим их лизисом. CD8<sup>+</sup> лимфоциты являются важным предиктором ответа на лечение ингибиторами контрольных точек иммунитета, поскольку они играют непосредственную роль в уничтожении опухолевых клеток [155]. Hurkmans et.al. продемонстрировали, что высокое содержание CD8<sup>+</sup> опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) является потенциальным прогностически благоприятным маркером пациентов с НМРЛ, получающих ниволумаб [156]. Emens et al. показали, что у пациентов с тройным негативным раком молочной железы с высоким уровнем CD8<sup>+</sup> TILs до начала терапии атезолизумабом наблюдались более высокие показатели выживаемости [157].

**FoxP3** принадлежит к семейству транскрипционных факторов Forkhead box (FOX), который был первоначально идентифицирован у *Drosophila melanogaster* в 1989 году. Позже было показано, что несколько членов семейства FOX играют важнейшую роль в различных аспектах иммунной регуляции [158].

Показано, что FoxP3 является одним из основных факторов развития и функционирования регуляторных Т-клеток (Treg) [159-161]. Первоначально Tregs были определены как иммуносупрессивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки, экспрессирующие на своей поверхности  $\alpha$ -субъединицу рецептора интерлейкина-2 (CD25) [162]. В настоящее время ядерная экспрессия FoxP3 считается наиболее специфичным маркером этого типа клеток [163]. FoxP3 признан маркером активности Treg в экспериментальных моделях, и данный тип клеток обладают способностью активно ингибировать CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, дендритные клетки (DC), натуральные киллеры (NK) и В-клетки [164]. Также одним из маркеров Treg является CTLA-4, который взаимодействует с IL-10 и TGF- $\beta$ , особенно в контексте прогрессии онкологических заболеваний. Tregs рекрутируются в опухоль с помощью цитокинов, в первую очередь CCL22. Также показано, что Treg-клетки увеличивают продукцию VEGF и промотируют ангиогенез [165].

Также FoxP3 может также транзиторно экспрессироваться на нерегуляторных CD4<sup>+</sup> Т-клетках человека при активации Т-клеточного антигенного рецептора (TCR). Существуют исследования, описывающие экспрессию Foxp3 в нелимфоцитарных нормальных или опухолевых клетках, однако данные исследования малочисленны и являются предметом дискуссий.

Прогностическая значимость FoxP3<sup>+</sup> клеток, инфильтрирующих различные типы опухолей, в литературе в большинстве своем определена и описана. Большинство исследователей склоняются к тому, что большое количество регуляторных Т клеток является неблагоприятным прогностическим фактором [166, 167]. Однако для некоторых типов опухолей, например для рака пищевода и колоректального рака (КРР), большое количество FoxP3<sup>+</sup> Tregs в опухолях может быть маркером хорошего прогноза [168].

### 1.4.3 В-клетки стромы

Популяция В-клеток в строме опухолей является крайне недооцененным ее компонентом. В некоторых типах опухолей В-клетки составляют до 25% от общего числа клеток. Более того, при раке молочной железы В-клетки могут составлять до 40% от общего числа стромальных клеток [169]. **CD20** является трансмембранным белком, который экспрессируется на поверхности В-клеток предшественников и зрелых В-клеток, что позволяет его использовать в различных клинических исследованиях в качестве общего В-клеточного маркера. Вклад влияния В-клеток в развитие и прогрессию опухолей изучен достаточно хорошо. Например, в случае мягкотканых сарком высокий уровень содержания В-клеток в опухолях коррелировал с более длительной общей выживаемостью в независимости от гистологического типа опухолей, в то время как корреляция между содержанием Т-клеток и общей выживаемостью отсутствовала [170]. Для большинства злокачественных опухолей показана прямая корреляция между содержанием В-клеток и прогнозом заболевания. А именно, высокое содержание В-клеток в строме является благоприятным прогностическим фактором для рака молочной железы [171], колоректального рака [172], НМРЛ [173], рака яичников [174] и меланомы [175].

### 1.4.4 Эндотелиальные клетки

Еще одной основополагающей особенностью процесса канцерогенеза является способность клеток опухоли и ее микроокружения к модулированию процесса ангиогенеза. **CD31** (PECAM-1) – это трансмембранный гликопротеин, являющийся маркером эндотелиальных клеток и участвующий в миграции лейкоцитов в воспалительный очаг, осуществляя регуляцию проницаемости и целостности капилляров [176]. Его экспрессия наблюдается в многих видах опухолей, как например, гепатоцеллюлярная карцинома [177, 178], рак почки [179], рак легкого [180], колоректальный рак [181], рак яичников [182] и др. Для некоторых других типов опухолей, например для колоректального рака, показано, что экспрессия CD31 коррелирует с низким показателем выживаемости [181, 183]. Однако имеются данные и об отсутствии прогностической значимости CD31 на примере рака яичников [182]. Кроме того, исследования показывают, что высокий уровень CD31 в опухоли коррелирует с большим размером опухоли [181, 184], большим показателем злокачественности [181, 185] и более поздней стадией заболевания [181]. Неоднозначные данные имеются о связи экспрессии CD31 с метастатическим статусом опухолей, как с регионарным метастазированием [184], так и с наличием отдаленных метастазов в отсутствие регионарных [181]. Однако опубликованы исследования, которые показывают, что высокий уровень экспрессии CD31 в образцах рака почки коррелирует с более высоким показателем общей выживаемости [179].

## 1.5 Микробиом

Организм человека содержит огромное количество микроорганизмов, видовое разнообразие которых чрезвычайно велико. Микроорганизмы присутствуют на всех слизистых оболочках организма и участвуют в широком спектре физиологических процессов. Совокупность микроорганизмов, населяющих организм человека (микробиом), оказывает сильное влияние на его здоровье. Современные исследования показывают корреляцию между спецификой состава микробиома и различными заболеваниями, включая аутоиммунные заболевания, ожирение и даже расстройства психики [186].

В настоящее время все больше внимания уделяется изучению микробных сообществ, ассоциированных с онкологическими заболеваниями различных нозологий. Накапливается все больше информации о механизмах взаимодействия микроорганизмов и опухолей, путях бактериальной индукции онкологических процессов и их клиническом значении. На сегодняшний день взаимодействие микробиома человека с развитием онкологических заболеваний получило новое название - онкобиом. За последнее десятилетие множество научных работ посвящены изучению роли бактерии *Helicobacter pylori* в развитии злокачественных опухолей желудка, и такую связь уже можно считать доказанной. Также множество работ посвящены исследованию вклада микробного сообщества кишечника и патогенных микроорганизмов в развитие колоректального рака и других опухолей ЖКТ. Изучение развития рака легкого под воздействием бактериальной составляющей долгое время оставалось в тени, однако сейчас обнаружены некоторые закономерности между данным видом рака и микробиомом [187]. Несмотря на то, что в литературе встречается подтверждение участия микроорганизмов в развитии онкологических заболеваний легких, механизмы такого взаимодействия изучены достаточно фрагментарно. Микроорганизмы могут индуцировать онкогенез посредством выработки бактериальных токсинов или других агентов, а также вызывать хронические воспалительные процессы, что, в свою очередь, часто является фактором, способствующим развитию заболеваний. В данной главе систематизированы литературные данные, посвященные вкладу микроорганизмов в развитие НМРЛ и рака пищевода, а также возможных механизмов, его опосредующих.

### 1.5.1 Микробиом легкого

В последнее время достаточно большое внимание уделяется изучению комменсальной микрофлоры человека. Сформировавшаяся позиция рассматривает микробиом человека как отдельный орган. Традиционно считается, что микробиом в первую очередь влияет на работу кишечника, кожи и слизистых. Изучению микробного сообщества легких было посвящено меньшее количество исследований, что, вероятно, связано с тем, что длительное время легкие



считались стерильными [188]. С развитием методов, не требующих культивирования биомассы, было показано, что легкие заселены уникальным микробным сообществом [189]. Результаты определения бактериальной 16s РНК методом ПЦР показали, что количественно число микроорганизмов в легких и нижних дыхательных путях существенно ниже, чем в верхних дыхательных путях, но несмотря на это, слизистая легких имеет свой резидентный микробиом [190]. Состав микробиома в здоровых легких определяется тремя основными факторами: миграция микроорганизмов из верхних отделов дыхательных путей, удаление бактерий организмом человека и локальными условиями роста для микроорганизмов [191].

#### 1.5.1.1 Микробиом легкого в норме и при неонкологических заболеваниях

Микробиом легких является относительно новым полем для исследований и на сегодняшний день изучен недостаточно подробно. Тем не менее, опираясь на результаты, полученные рядом исследовательских групп при помощи высокопроизводительного секвенирования, можно сделать вывод о том, что микробиом легких филогенетически разнообразен [192, 193]. В качестве примера микроорганизмов, которые преобладают в легких здоровых людей, можно выделить тип *Bacteroidetes* и таких его представителей, как *Prevotella* и *Veillonella spp* [193]. Также характерными представителями микробиома нижних отделов дыхательных путей являются *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Megasphaera*, *Sphingomonas* [193, 194].

Взаимосвязь различных микроорганизмов с заболеваниями легких давно очевидна. Самым наглядным примером может служить *Mycobacterium tuberculosis (MT)*. Туберкулез является инфекционной болезнью с наибольшим количеством летальных исходов по всему миру до сих пор остается большой медицинской проблемой. В 2015 году количество смертей от туберкулеза составило приблизительно 1,4 миллиона [195]. *Mycobacterium tuberculosis*, благодаря особым гликолипидам клеточной стенки (микозидам) не может быть нейтрализована макрофагами. В случае, если макрофаг поглотил микобактерию в результате фагоцитоза, *MT* может продолжать свою жизнедеятельность в эндосомах макрофагов. Также, *MT* имеет способность к образованию особых форм (L-форм) с пониженной вирулентностью, с чем связаны случаи многолетнего «бессимптомного» протекания болезни [196]. *MT* вызывает хроническое гранулезное воспаление легких, связанное с пролиферацией способных к фагоцитозу клеток (Т-лимфоциты и В-лимфоциты). Хроническое воспаление, как ассоциированное с микобактериями, так и нет, может приводить к образованию фиброзов. Некоторые гистологические исследования показывают корреляцию между раком легкого и фиброзами, образовавшимися в результате туберкулеза [197].

Помимо туберкулеза, еще одной достаточно распространенной легочной патологией является хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ). ХОБЛ также тесно связана с

определенными изменениями в микробном сообществе легких. В большинстве случаев в образцах мокроты пациентов с ХОБЛ обнаруживаются патогенные микроорганизмы, среди которых наиболее часто встречаются *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, и *Streptococcus pneumoniae*. Реже выделяются *Haemophilus parainfluenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* [198]. Персистенция этих микроорганизмов приводит к переходу заболевания в хроническую форму (хроническому воспалению). В период воспаления микробиота нижних дыхательных путей представляет собой особенно динамичную систему в связи с работой иммунной системы. В результате этой динамики во внешнюю среду попадает большое количество продуктов клеточного лизиса, таких как белки, липоолигосахариды и пептидогликаны [199]. Липоолигосахариды представляют собой мощный провоспалительный фактор, одним из продуцентов которого может являться, например, *Haemophilus influenzae*. Большое количество исследований с использованием 16s rRNA секвенирования показали значительные изменения микробиома при развитии ХОБЛ [200, 201]. Наиболее сильно отличающиеся роды бактерий между пациентами с ХОБЛ и здоровыми контролями включают *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* и *Haemophilus*.

#### 1.5.1.2 Микробиом рака легкого

Большее количество современных исследований сфокусировано на изучении микробиома пациентов с онкологическими заболеваниями. Взаимодействие злокачественных опухолей и микроорганизмов и их взаимное влияние друг на друга активно изучается по всему миру. Для некоторых типов опухолей показаны различные ассоциации с определенными видами бактерий (Таблица 1) [202].

**Таблица 1** - Микроорганизмы, ассоциированные с различными опухолями человека

Орган	Микроорганизм
Ротовая полость	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> [202, 203]
Легкое	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Acidovorax</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Granulicatella adiacens</i> [204-206]
Желудок, пищевод	<i>Helicobacter pylori</i> [207]
Поджелудочная железа	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> [208, 209]
Печень	<i>Helicobacter hepaticus</i> [210]
Кишечник	<i>Escherichia coli</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> [211, 212]

Рак легкого является одним из самых распространенных типов рака и лидирует по количеству смертей среди пациентов с онкологическими заболеваниями по всему миру. Курение – наиболее известный онкогенный фактор в этиологии развития рака легкого. Однако, известно и большое количество других факторов, индуцирующих канцерогенез в легких: системные воспалительные реакции, бактериальные и вирусные инфекции, периодонтальные заболевания и т.д. [213]. Теория о том, что злокачественные опухоли в значительном числе случаев возникают из-за хронических воспалительных процессов в результате ответа иммунной системы хозяина на патогенные инфекции была выдвинута еще Вирховым [214]. В легких в значительном числе случаев воспаление вызвано определенными патогенными и условно патогенными микроорганизмами. Так, показано, что опухолевые процессы в легких связаны и могут индуцироваться такими микроорганизмами, как *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter spp.*, *E. coli*, *Pneumococcus* [20]. Также, в образцах тканей опухолей легкого по сравнению с условно нормальной тканью наблюдается повышенное содержание представителей *Granulicatella*, *Abiotrophia*, *Streptococcus* [21]. При онкологических заболеваниях в легких может наблюдаться развитие патогенных микроорганизмов, таких как *Legionella* [186] и *Moraxella* (i.e. *Moraxella catarrhalis*) [215, 216]. Также некоторые микроорганизмы ассоциированы с определенным гистологическим типом опухолей. Представители родов *Acidovorax*, *Klebsiella*, *Rhodofera*, *Comamonas*, и *Polaromonas* обнаруживаются в большинстве случаев плоскоклеточного рака легкого и не характерны для аденокарцином. Примечательно, что фактор курения существенно сказывается на развитии данных микроорганизмов в легких [204].

Изучение корреляции между раком легкого и другими заболеваниями, вызванными бактериальными инфекциями, имеет существенное клиническое значение. Однако, интересно рассмотреть случаи, когда главной причиной возникновения рака легкого является существенное изменение в составе микробного сообщества, а не инфекция, вызванная определенным патогеном. Достаточно важными показателями в микробном сообществе являются альфа- и -бета биоразнообразие. Известно, что альфа-разнообразие (видовое богатство, измеряемое числом видов внутри сообщества, и соотношение количественных показателей участия видов в сложении сообщества) существенно выше в легких здоровых людей, чем в образцах легких пациентов при наличии в них злокачественной опухоли. Бета-разнообразие (разнообразие между сообществами), в свою очередь, напротив – не различается значительно между образцами здоровых и больных людей [217].

Исследования последних лет создают предпосылки для потенциального рассмотрения микробиоты в диагностических и прогностических целях. В исследованиях Lee и др. с помощью высокопроизводительного NGS секвенирования 16S рРНК были обнаружены различия в микробиоме легких пациентов с онкологическими процессами и доброкачественными

новообразованиями. Исследователи предположили, что такие роды микроорганизмов, как *Veillonella* и *Megasphaera*, могут использоваться в качестве биологических маркеров онкологических процессов [12].

В работах Greathouse и др. [204] показана корреляция между наличием бактерий рода *Acidovorax* и плоскоклеточным раком легкого. Авторами обнаружено, что представители *Acidovorax* ассоциируются преимущественно с данным гистологическим типом опухоли и в подавляющем большинстве не обнаруживаются у пациентов с аденокарциномой. В случае последних, более характерным представителем нетипичной для здоровых людей микробиоты является род *Pseudomonas*. Похожая ситуация наблюдается у пациентов с ХОБЛ [192].

Группой Cameron [212] показано влияние *Granulicatella adiacens* на протекание онкологических процессов в легких. Кроме того, в предыдущих работах группы описывается положительная (синергическая) связь *G. adiacens* с другими условно патогенными микроорганизмами - *Enterococcus sp.*, *Streptococcus intermedius*, *Escherichia coli*, *Streptococcus viridans*, *Acinetobacter junii*, *Streptococcus sp.*

Среди прочих перспективных биомаркеров, присутствие которых связано с онкологическими процессами – представители *Capnocytophaga*, *Selenomonas*, *Veillonella* и *Neisseria*. В работе Yan и др. показано, что повышенное содержание вышеупомянутых представителей микробиома характерно как для плоскоклеточного рака легкого, так и для аденокарциномы. Эти данные были получены на небольшой выборке пациентов (10 образцов ПКРЛ, 10 образцов АК и 10 здоровых доноров) при анализе слюны методом 16s рРНК секвенирования с подтверждением результатов с помощью ПЦР в режиме реального времени [218].

Другие исследователи показали, что составы микробных сообществ пациентов с раком легкого при наличии эмфиземы или без нее характеризовались значительно более низким содержанием протеобактерий (первичных родов *Acinetobacter* и *Acidovorax*) и более высокой распространенностью *Firmicutes* (*Streptococcus*) и *Bacteroidetes* (*Prevotella*) по сравнению с пациентами, страдающими только эмфиземой. Эти данные по мнению авторов также свидетельствуют о прикладной диагностической значимости анализа микробиома легкого [219].

Среди прочих представителей, характерных для микроокружения клеток рака легкого, следует выделить род *Granulicatella*, среди представителей которого наиболее выраженным клиническим значением обладает *Granulicatella adiacens*. Присутствие данного микроорганизма характерно для микроокружения рака легкого и особенно характерно для некурящих пациентов. Особенно стоит отметить, что для *Granulicatella adiacens* наблюдается положительная корреляционная связь с шестью другими микроорганизмами: *Enterococcus sp. 130*, *Streptococcus intermedius*, *Escherichia coli*, *Streptococcus viridans*, *Acinetobacter junii*, и *Streptococcus sp.* Данная

корреляция наблюдается только в случае рака легкого и не наблюдается в контрольной здоровой группе. Также, количество обнаруженных микроорганизмов может коррелировать со стадией заболевания, что в дальнейшем, в случае подтверждения, может послужить прогностическим маркером рака легкого [212].

В последнее время появилось большое количество исследований, посвященных исследованию микробиома для оценки эффективности противоопухолевой иммунотерапии. Например, Kaderbhai С и соавторы оценили влияние использования антибиотиков и их вклад в эффективность применения ниволумаба при терапии НМРЛ. Они показали, что потенциальные изменения микробиома, вызванные приемом антибиотиков, не оказывают влияния на терапию ниволумабом [220]. Другими исследователями показано, что первичная резистентность к ингибиторам контрольных точек иммунитета может быть связана с аномальным составом кишечного микробиома. Антибиотики подавляли клиническую эффективность данной терапии у пациентов [221].

Выявление закономерностей между терапией антибиотиками и иммунным статусом может существенно изменить подход к терапии антибиотиками для пациентов с онкологическими заболеваниями. Было показано, что лечение ампициллином, ванкомицином, неомицинсульфатом или метронидазолом повышает восприимчивость организма к развитию опухолей [222]. Авторы постулируют, что комменсальная микробиота вносит свой вклад в противоопухолевый ответ, а совместная терапия пробиотиками может усилить антипролиферативный и проапоптотический эффекты цисплатина. На данный момент в литературе встречаются противоположные данные относительно влияния антибиотиков и видового состава микробиома на эффективность противоопухолей терапии, что безусловно свидетельствует о необходимости проведения дальнейших исследований в данном направлении и их актуальности.

### **1.5.2 Микробиом пищевода**

Микробиому плоскоклеточного рака пищевода посвящено крайне ограниченное число исследований. Микробиота, естественным образом населяющие тело человека, долгое время игнорировались научным сообществом. Постулаты Коха [223], которые установили взаимоотношения между одним или несколькими микробами и болезнью, опровергли идею о том, что все микробное сообщество, в котором ни один отдельный член не был классифицирован как патоген, может способствовать патогенезу болезни. Поэтому гипотеза Lederberg's, предполагающая что исследования микробиоты человека станут "горячей" темой для исследований по всему миру, становится реальной [224]. Микробиом пищевода играет большую роль как в норме, так и при различных патологиях. Ранее считалось, что пищевод не имеет своего резидентного микробиома ввиду своего строения и функциональной нагрузки. Первое

исследование, посвященное изучению резидентного микробиома нормального пищевода, описало 41 род из 6 основных типов: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, and *TM7*. Самым распространенным родом оказался *Streptococcus* [225].

В настоящее время получены данные о микробиоме здорового пищевода, демонстрирующие его близость микробиому полости рта. Он состоит из представителей шести типов: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* и *TM7* [226]. Отличительной особенностью микробиома пищевода является отсутствие *Spirochaetes* [227]. Было обнаружено, что наибольшую распространенность в микробиоме здорового пищевода получили представители рода *Streptococcus* [228]. Интересно отметить, что микробиом аденокарциномы пищевода изучен достаточно неплохо, в то время как исследований, посвященных микробиому плоскоклеточного рака пищевода, опубликовано крайне мало.

Несколько исследований указывают на различия в микробиоме пищевода здоровых лиц и пациентов со злокачественными поражениями пищевода [229]. В частности, отмечено возрастание доли *Enterobacteriaceae*, *Akkermansia* [229], *Lactobacillus fermentum* [230] и *Fusobacterium nucleatum* [15] в микробиоме опухолей пищевода.

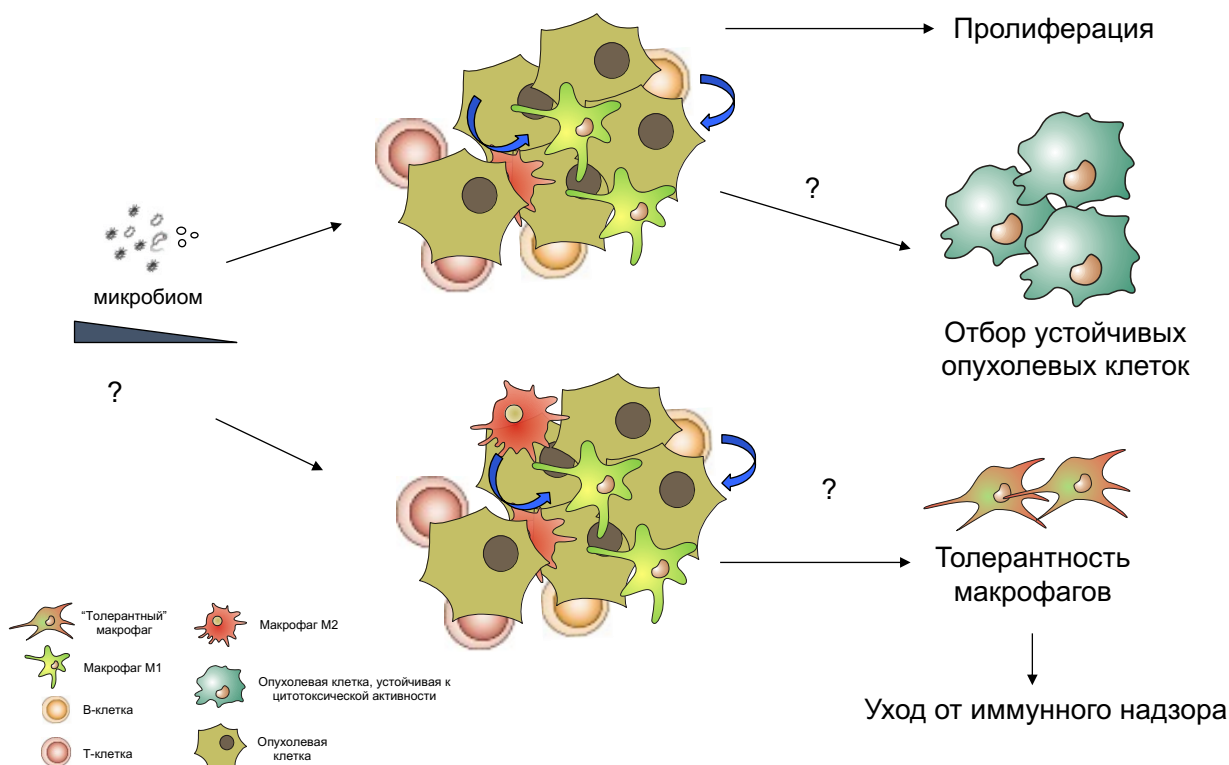
Snider E.J. et al. показали отсутствие различий в микробном альфа-разнообразии между тканями нормального пищевода и пищевода Барретта, однако доказательным стало снижение разнообразия в образцах аденокарциномы пищевода. Также они обнаружили увеличение количества представителей типа *Proteobacteria* наряду со снижением числа *Firmicutes* в образцах аденокарциномы и дисплазии высокой степени, кроме того, для этих тканей характерным стало увеличение количества *Enterobacteriaceae* и *Akkermansia*, наряду с уменьшением *Veillonella* [229]. Elliott DRF et al. обнаружили преобладание *Lactobacillus fermentum* в аденокарциноме пищевода в сравнении с тканью здоровых пациентов ( $p=0.028$ ) [230]. Li D. et al. продемонстрировали, что в сравнении с контрольной группой в образцах плоскоклеточной карциномы пищевода количество *Fusobacteria* было выше (7,01% против 1,66%,  $p=0,039$ ), а количество *Actinobacteria* было ниже (1,61% против 4,04%). Также они пришли к выводу, что мониторинг микробиоты пищевода может быть важным методом прогнозирования рецидива опухоли после эзофаготомии [231]. О роли *Fusobacterium nucleatum* как о перспективном прогностическом биомаркере рака пищевода говорили Yamamura K. et al., обнаружившие, что *F. nucleatum* в опухолевой ткани коррелирует с плохим прогнозом, а также активирует CCL20, что способствует опухолевой прогрессии [15].

Аналогично *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.* может играть роль в формировании рака пищевода посредством токсин-опосредованного воспаления [232]. Однако в настоящее время микробиом, ассоциированный с раком пищевода, изучен далеко не в полной мере.

## 1.6 Взаимодействие стромы и микробиома в опухолевой прогрессии

Так каким же образом может происходить взаимодействие микробиологического и иммунологического компонентов опухолевой стромы? В зависимости от количества бактерии могут вносить свой вклад в развитие уже сформировавшихся опухолей как путем непосредственного влияния на опухолевые клетки, так и посредством влияния на опухолевое микроокружение. Известно, что большое количество бактерий способно стимулировать пролиферацию опухолевых клеток путем активации классических пролиферативных каскадов.

Влияние микробиома на строму опухоли значительно более многогранно. Одними из основных клеток опухолевой стромы, реагирующих на бактерии, являются макрофаги. Под воздействием бактериальных компонентов возможны следующие варианты. Под воздействием бактерий опухоли резидентные макрофаги приобретают провоспалительный фенотип (M1) и способность к проявлению своей цитотоксической активности, что приводит к элиминации опухолевых клеток. Однако известно, что опухолевые клетки умеют приспосабливаться к различным неблагоприятным окружающим условиям. Поэтому они, вероятно, могут приобретать устойчивость, направленную именно против цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета. Какие механизмы это опосредуют, на данный момент не известно. Возможен и другой вариант развития событий. В опухоли могут присутствовать определенное количество или виды бактерий, которые при постоянном воздействии на резидентные макрофаги опухоли делают их не чувствительными к последующим сильным воспалительным стимулам. Таким образом в опухоли формируется популяция так называемых “толерантных” макрофагов. Это приводит к нарушению нормальной реакции данного типа клеток на патоген и локальному иммунодефициту. Это может являться механизмом ухода опухоли из-под иммунного надзора (Рисунок 3).



**Рисунок 3** – Механизмы влияние микробиома на прогрессию опухоли

### 1.6.1 Влияние стромы на развитие и прогрессию опухолей

В настоящее время взаимодействие макрофагов и опухолевых клеток изучается прежде всего в контексте макрофагов, ассоциированных с опухолью, обладающих иммуносупрессорными свойствами. Не подвергается сомнению тот факт, что большинство солидных опухолей содержит значительное количество макрофагов, ассоциированных с опухолью, и что эти клетки влияют на течение заболевания [233, 234]. В нормальных тканях вторжение патогена или повреждение запускает сложную реакцию, сопровождающуюся продукцией многочисленных ростовых факторов: TNF, M-CSF, GM-CSF, трансформирующий фактор роста бета, а также хемокинов, включая CCL2, CCL7, CCL8, CCL3, CCL4 и MIF. Эти факторы стимулируют приток моноцитов и запускают их дифференцировку. Макрофаги, в свою очередь, регулируют иммунный ответ, уничтожают патоген, стимулируют ангиогенез и регенерацию ткани [235, 236]. Опухолевые клетки зачастую производят цитокины, характерные для регенерирующей ткани, что обеспечивает эффективное привлечение моноцитов и их дифференцировку в макрофаги [35, 80, 237]. Клинические исследования показали, что количество макрофагов, ассоциированных с опухолью, коррелирует с плохим прогнозом заболевания [237]. Эта корреляция особенно сильна в случае рака молочной железы, простаты, яичников и шейки матки [237]. Особо следует отметить, что для тех типов опухолей, в которых большое количество МАО является индикатором плохого прогноза, на плохой прогноз указывает



и повышенная экспрессия макрофагальных ростовых факторов и хемокинов, а также плотность кровеносных сосудов. Так, CCL2 часто экспрессируется в опухолях яичников, мочевого пузыря, молочной железы и глиомы, при этом в случае рака молочной железы, шейки матки и мочевого пузыря повышенная экспрессия CCL2 указывает на плохой прогноз [80-82]. M-CSF – цитокин, отвечающий за выживание и дифференцировку макрофагов - также экспрессируется клетками опухолей яичников, матки, молочной железы и простаты [45, 83-86]. В случае рака молочной железы, повышенная экспрессия M-CSF коррелирует с плохим прогнозом и ассоциируется с повышенной инфильтрацией опухоли макрофагами в 90% исследованных случаев [45].

В случае нормального функционирования иммунной системы, макрофаги, инфильтрирующие опухоль, должны подавлять ее рост и приводить к уничтожению опухолевых клеток, но этого не происходит, так как цитокиновое окружение опухоли способно ингибировать противоопухолевую активность макрофагов [238, 239]. Считается доказанным, что одним из важнейших цитокинов, регулирующих локальный противоопухолевый иммунный ответ, является TGF- $\beta$ , и что подавление активности этого ростового фактора способно приводить к рассасыванию опухоли [240]. Стоит отметить, что макрофаги, ассоциированные с опухолью, способны как производить TGF- $\beta$ , так и активировать его латентную форму [241]. Также TGF- $\beta$  регулирует в макрофагах сигнальные пути, характерные не только для самого TGF- $\beta$ , но и для других членов семейства TGF- $\beta$  – BMP [242].

Однако прямое подавление противоопухолевого иммунного ответа — это не единственное следствие цитокиновой среды, создаваемой опухолевыми клетками. Привлекаемые опухолью моноциты приобретают особый фенотип и принимают активное участие в подавлении активности иммунной системы. Кроме вышеописанных цитокинов (TNF, M-CSF, IL-6), опухолевые клетки часто производят и другие цитокины, способные подавлять иммунный ответ - IL-10, IL-4, IL-13. Подобный спектр цитокинов приводит к образованию макрофагов второго типа активации (M2), что подтверждается сравнением маркеров M2 с маркерами макрофагов, ассоциированных с опухолями молочной железы. Известно, M2 способны подавлять воспалительную реакцию, стимулируют рост клеток и ангиогенез. Эти их свойства используются опухолью для эффективной прогрессии, поэтому MAO в последнее время все чаще рассматриваются как привлекательная мишень для противоопухолевой терапии.

Популяция MAO не является однородной. Гистологические исследования четко 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 M1 [243]. M1, также называемые классически активированными макрофагами, обладают свойствами стимулировать воспалительный иммунный ответ и обладают цитотоксическими свойствами.

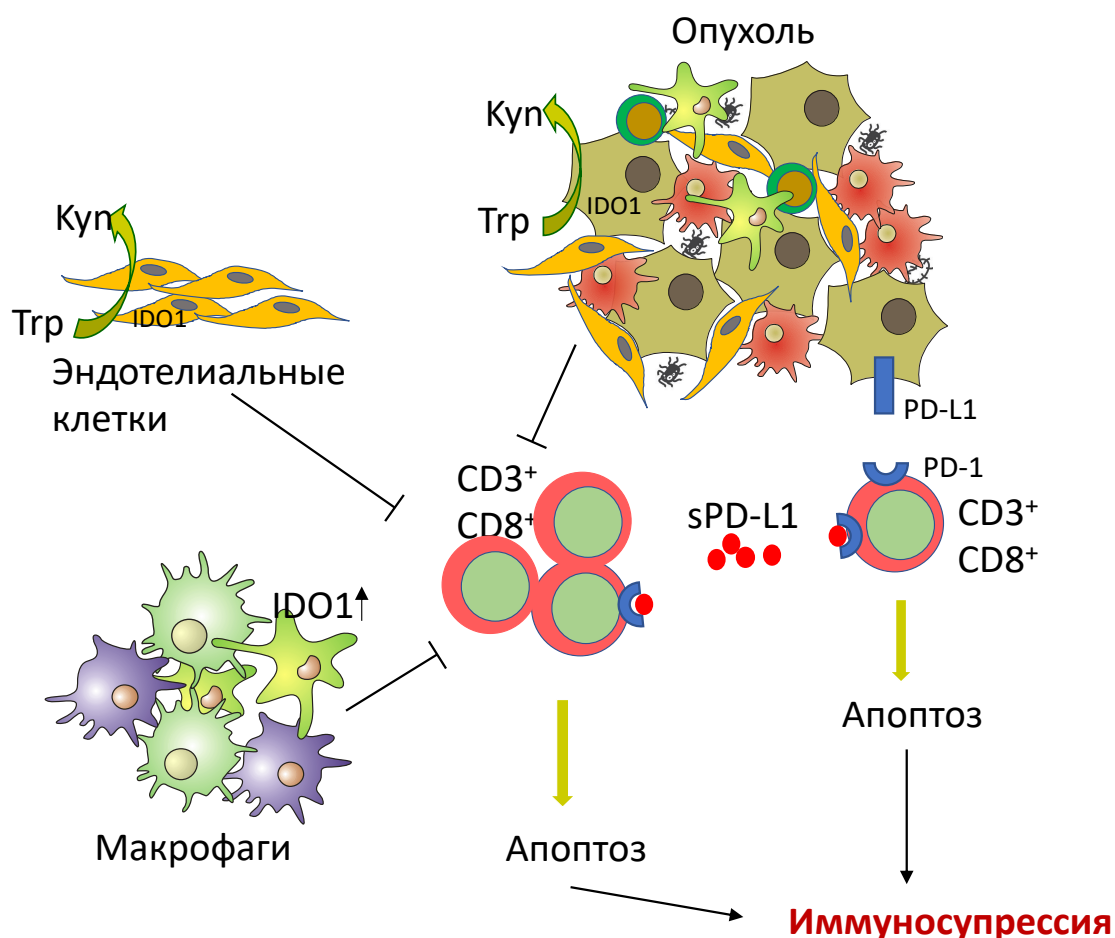
Изучение этого типа макрофагов особенно важно в настоящее время, так как препараты на основе антител, используемые для иммунотерапии опухолей, используют антитело-опосредованную цитотоксическую активность макрофагов 1 типа [244]. Одной из проблем иммунотерапии опухоли является формирование ее устойчивости к препарату, обусловленное как отбором опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов, так и снижением или потерей цитотоксической активности.

При том, что роль макрофагов на поздних стадиях развития опухоли исследована достаточно хорошо, роль макрофагов в инициации опухоли и ее прогрессии на ранних стадиях развития опухоли остается малоизученной. Считается, что макрофаги 1 типа, задача которых уничтожать опухолевые клетки, участвуют в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода, создают в микроокружении опухолевых клеток условия повышенной мутагенности и стимулируют ангиогенез [245]. Практически не изученными остаются клеточные и молекулярные механизмы этого явления.

Т-клетки наравне с макрофагами играют важную роль в прогрессии опухолей и развитии противоопухолевого иммунного ответа. Когда наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки встречают антиген, они активируются и затем дифференцируются в цитотоксические эффекторные Т-клетки, которые контролируют и уничтожают выявленный патоген. После уничтожения патогена большая часть эффекторных Т-клеток подвергается апоптозу, а меньшая часть выживает и дифференцируется в Т-клетки памяти, которые функционируют как резерв для борьбы с последующей инфекцией [246]. Однако в случае постоянной стимуляции антигеном при хронических воспалительных процессах или опухолях дифференцировка Т-клеток нарушается и приводит к гипореактивному состоянию, а именно "истощению". Истощение Т-клеток определяется как прогрессирующая потеря эффекторной функции (потеря продукции IL-2, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ ) при устойчивой экспрессии ингибирующих рецепторов, таких как PD-1, Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и муциновый домен-содержащий белок 3 (Tim-3), CTLA-4, ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3) и CD160 [246]. Для описания гипореактивности Т-клеток используются различные термины, такие как толерантность, анергия и истощение, однако именно "истощение" предложено в качестве термина для описания функционального, но гипореактивного состояния после первоначальной активации в контексте хронической инфекции или опухоли.

Иммуносупрессорные свойства опухолевой стромы проявляются не только при ее прогрессии, но и являются серьезной проблемой для эффективной иммунотерапии. К иммуносупрессорным компонентам опухолевой стромы помимо опухоль-ассоциированных макрофагов можно отнести регуляторные Т-клетки (FoxP3<sup>+</sup>), эндотелиальные клетки, миелоидные супрессорные клетки (MDSC) и др.

Миелоидные супрессорные клетки подавляют функцию натуральных клеток-киллеров и Т-клеток, вырабатывая такие цитокины, как IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  и аргиназу-1, фермент, способствующий активным форм кислорода и оксида азота (NO). MDSC привлекаются в опухоль посредством выработки вышеупомянутых цитокинов и блокируют функциональную деятельность дендритных клеток. Согласно современным данным, MDSC подавляют как приобретенный, так и врожденный иммунитет. Кроме того, MDSC могут способствовать опухолевой прогрессии, и, в частности, метастазированию и образованию новых кровеносных сосудов [247]. Также отдельно необходимо отметить иммуносупрессорные компоненты опухолевого микроокружения, а именно белки IDO1 и PD-L1 (Рисунок 4).



**Рисунок 4** – Механизмы локальной иммуносупрессии в опухолевой строме

Активация PD-1/PD-L1 пути стимулирует апоптоз антиген-специфичных Т-лимфоцитов и подавляет апоптоз регуляторных супрессорных Т-клеток, что является одним из механизмов иммуносупрессии опухоли. Активированный фермент IDO1 снижает уровень триптофана в микроокружении опухоли, что также способствует гибели эффекторных Т-клеток и привлечению Т-клеток регуляторного фенотипа [248], а также усиливает экспансию MDSC [249]. Одним из основных активаторов экспрессии IDO1 в опухоли является IFN $\gamma$  [250]. В целом влияние данных

белков на опухолевую иммуносупрессию выражается в снижении количества или инактивации Т-клеток в опухоли.

Таким образом, в результате большого количества межклеточных взаимодействий опухолевое микроокружение приобретает уникальный и индивидуальный фенотип, изучение и регуляция которого имеет перспективы для решения будущих терапевтических задач.

### **1.6.2 Влияние микробиома на развитие и прогрессию опухолей**

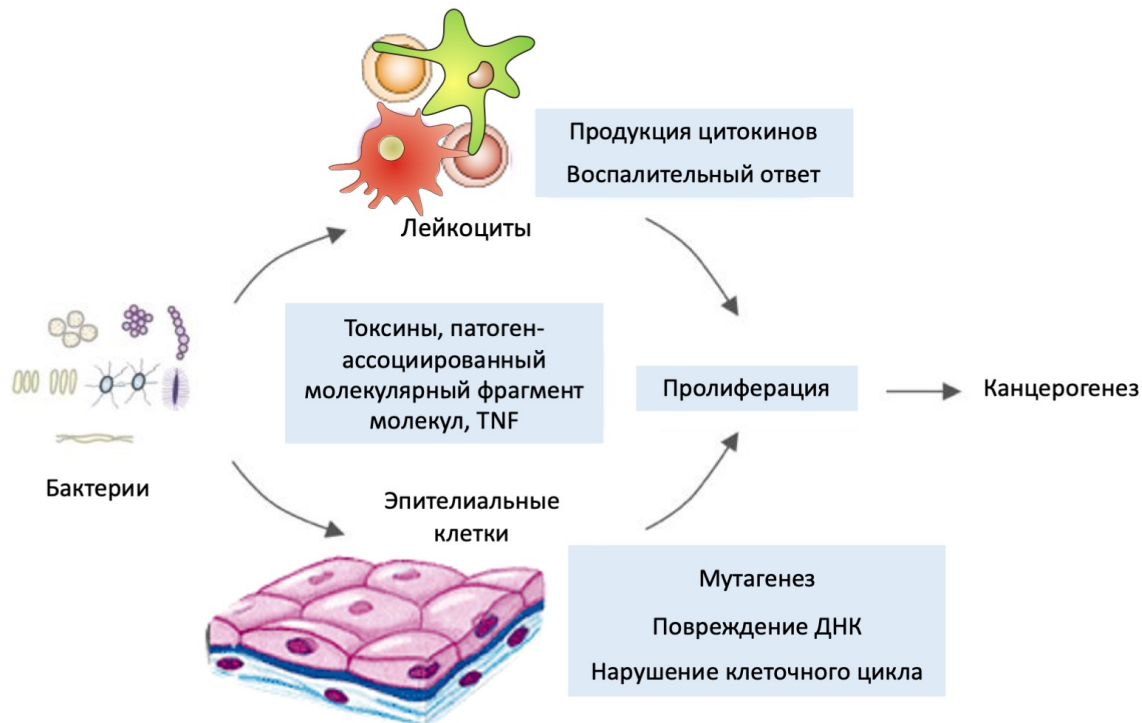
Известно, что развитие опухоли часто сопровождается различными воспалительными процессами. С того момента, как стерильность легких был опровергнута, появилось большое количество исследований, посвященных резидентному микробиому данного органа и его участию в функционировании легкого, как в норме, так и при патологии. Причем микроорганизмы могут принимать как непосредственное участие в опухолевой трансформации, так и создавать негативный неспецифический воспалительный фон. Постоянное присутствие низкого количества определенных бактерий может подавлять острый воспалительный ответ, тем самым способствуя развитию макрофагальной толерантности. Проведены немногочисленные исследования, в которых показано, что толерантные макрофаги характеризуются повышенной фагоцитарной активностью. Однако в опухоли этого может не происходить под воздействием различных молекул, секретируемых опухолевыми клетками. Таким образом формируются опухоль-специфичные макрофаги, характеризующиеся с одной стороны иммунологической толерантностью, а с другой стороны отсутствием способности к цитотоксической активности.

#### **1.6.2.1 Прямое влияние микробиома**

Механизмы возможного влияния бактерий на развитие и прогрессию рака известны достаточно давно (Рисунок 5). Безусловно, наиболее известным примером является бактерия *Helicobacter pylori*, развитие которой приводит к гастриту, язве желудка и онкологическим заболеваниям [251]. Ключевую роль в этом процессе играет токсин *H. pylori*, кодируемый геном *cagA*. Этот токсин (наиболее известный как CagA) действует на клетки эпителия желудка и облегчает проникновение бактериальных клеток в стенки эпителия. Примечательно, что не все штаммы *H. pylori* продуцируют токсин CagA. Штаммы, способные к синтезу этого токсина, принято называть положительными. Исследования показывают, что у людей, инфицированных CagA-положительными штаммами, риск развития некардиальный рака желудка вдвое превышает риск у людей, инфицированных CagA-отрицательными штаммами [207]. Интересно отметить специфичность и направленность канцерогенеза, вызванного *H. pylori*. Исследователи из Швеции продемонстрировали, что у людей, инфицированных положительными штаммами (группа повышенного риска развития рака желудка), наблюдается менее высокий риск развития аденокарциномы пищевода, по сравнению с людьми, зараженными негативными по CagA

штаммами [252]. Для колоректального рака показано, что адгезин FadA *Fusobacterium nucleatum* связывается с E-кадгерином и активирует Wnt/ $\beta$ -катенин сигнальный путь, способствующий канцерогенезу [203]. Также *Fusobacterium nucleatum* способна ингибировать апоптоз в опухолевых клетках посредством различных механизмов (Toll-подобные рецепторы, микроРНК) тем самым способствуя развитию опухолей [253].

Онкогенная роль *H. pylori* не ограничивается раком желудка. В последнее время накапливается все больше свидетельств того, что данный микроорганизм может индуцировать развитие онкологических процессов в легких [254]. Потенциально *H. pylori* может воздействовать на легкие несколькими способами. Важную роль отводят липосахаридам, которые являются основным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Имунная система человека реагирует на липосахариды выработкой таких провоспалительных факторов, как IL-1, IL-6, TNF. В результате, воспалительные процессы, вызванные *H. pylori*, могут иметь системный характер. Следствием таких ситуаций может стать хронический бронхит – состояние, нередко сопровождающее развитие рака легкого [255]. Кроме того, легкие и желудочно-кишечный тракт содержат клетки, продуцирующие такие гормоны, как гастрин. Поэтому, повышенная концентрация гастрина в плазме крови, опосредованная активностью *H. pylori* в желудке, потенциально может привести к развитию рака легкого [254].



**Рисунок 5** - Взаимодействие микробиома с клетками эпителия и иммунной системы

Комменсальный микробиом легких играет чрезвычайно важную роль в поддержании иммунного гомеостаза слизистой оболочки легких. Нарушения в микроокружении легких могут

существенно сказываться на восприимчивости к заболеваниям, включая развитие онкологии. Группой Cheng et. al. на мышинной модели показано, что у группы животных, получавших пероральные антибиотики, нарушалась работа  $\gamma\delta T17$  Т-клеток (Th17), ответственных за выработку интерлейкина-17 (IL17). В результате нарушения нормальной работы  $\gamma\delta T17$  животные были более восприимчивы к искусственно-индуцированной B16 / F10 меланоме и легочной карциноме Льюиса (LLC) и имели более короткую продолжительность жизни. При этом обнаружено, что при введении антибиотиков в легких не появлялось резистентных штаммов, а общее число микроорганизмов существенным образом снижалось. Таким образом, авторы показывают, что комменсальная микробиота легких является ключевым фактором для поддержания нормальной работы клеток иммунной системы (в частности,  $\gamma\delta T17$  клеток) [256]. Индуктором воспалительных процессов у пациентов с ХОБЛ также может являться патогенный микроорганизм *H. influenza*. Данные авторов указывают на то, что эпителиальный IL-17С стимулирует инфильтрацию нейтрофилов и воспаление в микроокружении опухоли. Они предполагают, что данный механизм может быть обусловлен патологическим микробиомом, присутствующим у пациентов с ХОБЛ, и связан с усиленным ростом опухолей [257].

Немалую роль в паталогических процессах играют бактериальные токсины. Известно, что такие токсины как цитолептический дистилляционный токсин (CDT), цитотоксический некротизирующий фактор 1 (CNF), токсин *Bactaroides fragilis*, вызывают нарушения в работе системы репарации ДНК, что также может индуцировать канцерогенез [258-260]. В другом исследовании *in silico* показано, что токсин микроцистин *Cyanobacteria* коррелировал со снижением CD36 и повышением уровня PARP1. Эти данные были подтверждены на модели клеточной линии НМРЛ (A427) и бактерия-позитивных образцах опухолей легкого [261]. Другие исследователи показали, что активация TLR4 с помощью, инактивированной нагреванием *E. coli*, усиливает адгезию и миграцию клеток НМРЛ *in vitro* и метастазирование *in vivo*. Эти эффекты частично опосредуются p38 MAPK и ERK1/2 -зависимыми сигнальными путями [262].

Помимо бактериальных токсинов и непосредственно биомассы бактерий, описаны и другие более общие механизмы, потенциально опосредующие их влияние на канцерогенез. Так, негативное влияние активных форм кислорода (АФК) на ДНК широко известно и достаточно изучено. Недавние исследования показали, что при изменении состава микробиома и дисбиозе в ряде случаев может возрастать концентрация АФК. Это может привести к нарушениям в структуре ДНК хозяина и способствовать канцерогенезу. Примечательно, что опухоли, содержащие мутации в гене *TP53*, обладают уникальным микробным консорциумом. Последние исследования показывают, что мутации в гене *TP53* коррелируют с присутствием в микроокружении представителей рода *Acidovorax*. Также, повышенный уровень *Acidovorax* наблюдается у курящих людей. Вероятно, курение приводит к формированию благоприятных

условий для роста и развития *Acidovorax*, что, что является дополнительным фактором, индуцирующим мутагенез [204].

Одним из возможных и недавно описанных механизмов влияния микробиома на развитие и прогрессию рака легкого является межклеточное взаимодействие посредством экстраклеточных везикул. Так, бактериальные экстраклеточные везикулы грамотрицательной бактерии *E. coli* содержат большое количество различных молекул, включая LPS, белки, способствующие адгезии и инвазии, а также нуклеиновые кислоты [263]. Показано, что экстраклеточные бактериальные везикулы могут участвовать в процессе развития ХОБЛ [264]. Таким образом, экстраклеточные везикулы, продуцируемые бактериями, могут способствовать активации эпителиальных и иммунных клеток легких. В случае нормального состава микробиома они могут принести пользу хозяину, способствуя толерантности слизистой оболочки к патогенам и защите от заболеваний [265]. Однако в случае дисбиоза легких, экстраклеточные бактериальные везикулы могут индуцировать воспалительные заболевания легких, потенциально ассоциированные с онкологией.

#### 1.6.2.2 Цитотоксическая активность

Влияние микробиома на развитие и особенно прогрессию опухолей может происходить опосредованно за счет воздействия на иммунные клетки тканей. Одним из основных типов клеток, реагирующих на патоген, являются макрофаги. Макрофаги обладают цитотоксической активностью и могут уничтожать опухолевые клетки как прямым, так и косвенным способом, путем привлечения других клеток (например, некоторых Т-лимфоцитов). Прямая цитотоксичность требует активации макрофагов по Th-1 пути за счет продуктов бактериального происхождения или цитокинов. Основными механизмами прямой цитотоксической активности макрофагов являются синтез монооксида азота, активных форм кислорода, фагоцитоз [266]. Hibbs и соавторы впервые показали, что окись азота вырабатывается клетками иммунной системы [267]. Окись азота образуется в результате ферментативных реакций с использованием НАДФН, L-аргинина и молекулярного кислорода. Центральным ферментом данного процесса является NO синтаза (NOS). Помимо монооксида азота, макрофаги способны синтезировать широкий спектр АФК, включая супероксидный анион радикал, перекись водорода [268]. Основными источниками АФК являются НАДН-оксидазы (NOX, NOX1-NOX-5), двойные оксидазы 1 и 2 (DUOX-1, DUOX2). Генерация АФК в фагосомах (NOX-2 является наиболее активным продуцентом) – процесс врожденного иммунитета, нацеленный на уничтожение патогенных микроорганизмов. Активация NOX2 осуществляется посредством контакта иммуногенов с Fc-рецепторами макрофагов [269]. Ферменты NOX4 и DUOX обеспечивают продукцию супероксид аниона [270]. Стоит заметить, что несмотря на то, что механизмы прямой

цитотоксической активности достаточно вариативны, их эффективность в значительной степени зависит от свойств конкретной опухоли.

Важную роль в устранении опухолевых клеток играет антителозависимая цитотоксическая активность (АЗЦА) макрофагов. Этот процесс включает выработку иммунными клетками (В-лимфоцитами) антител к опухолевым клеткам, после чего макрофаги идентифицируют и элиминируют опухолевые клетки, покрытые такими антителами. В этот процесс вовлечены высокоаффинные Fc $\gamma$ -рецепторы моноцитов и макрофагов, которые связываются антителами человека к клеткам опухолей. Опосредованная IgE цитотоксическая активность проявляется в повышении уровня TNF $\alpha$  и CD80, а также MCP-1 (CCL2). В настоящее время разрабатываются новые методики терапии, базирующиеся на применении антител типа IgE [271]. Все классы Fc $\gamma$ -рецепторов экспрессируются макрофагами, что обуславливает их высокую способность к антитело-зависимому фагоцитозу. Этот механизм лежит в основе терапии онкологических заболеваний посредством моноклональных антител [244].

Другой механизм цитотоксической активности опосредуется лигандом TRAIL (Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10), вызывающим апоптоз. TRAIL и его рецепторы экспрессируются во многих типах нормальных клеток, включая иммунные клетки. TRAIL влияет на активность NF- $\kappa$ B и экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6 и ETA- $\alpha$  в макрофагах. В совокупности, механизмы, индуцированные TRAIL, стимулируют противоопухолевую активность макрофагов [272]. TRAIL является перспективной противоопухолевой мишенью, поскольку эта молекула специфически индуцирует апоптоз в различных опухолевых клетках. С TRAIL также связана повышенная экспрессия микро-РНК 146, которая индуцирует противоопухолевую активность [273, 274].

Определенный вклад в супрессию опухолей вносит перекрестное взаимодействие макрофагов с натуральными киллерами. Zhou и соавторы показали, что стимуляция макрофагов Poly I:C индуцирует активацию NKG2D-лигандов и секрецию IL-15, IL-12, IFN- $\beta$  макрофагами. Взаимодействие NKG2D со специфичными рецепторами способствует активации НК-клеток, которые распознают опухолевые клетки с последующим усилением секреции цитотоксических соединений и IFN- $\gamma$ . Сами макрофаги защищаются от цитолиза НК-клетками посредством экспрессии лиганда Qa-1 [275].

Однако несмотря на то, что цитотоксическая активность макрофагов является мощным фактором, сдерживающим инициацию и прогрессию опухоли, однако, в ряде случаев ее недостаточно для контроля опухолевого процесса. Более того, цитотоксическая активность макрофагов может способствовать инициации и прогрессии опухоли. Это обусловлено как отбором опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов, так и снижением или потерей цитотоксической активности последних.



Способность опухолевых клеток к выработке устойчивости к цитотоксической активности макрофагов обусловлена генетической нестабильностью и гетерогенностью опухоли. Показано, что такие провоспалительные цитокины, как IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , а также протеазы, реактивные формы кислорода и окись азота оказывают мутагенный эффект на опухолевые клетки и их микроокружение [276, 277]. Также известно, что TNF- $\alpha$  может способствовать дедифференцировке опухолевых клеток с образованием так называемых опухолевых стволовых клеток, характеризующихся потерей поверхностных антигенов, распознаваемых иммунными клетками. Известно, что под действием TNF- $\alpha$  опухолевые клетки меланомы теряли экспрессию gp100, распознаваемого цитотоксическими Т-клетками, с одновременным повышением уровня экспрессии рецептора фактора нейротрофинов NGFR, способствующего росту и пролиферации опухолевых клеток [278, 279].

Таким образом, цитотоксическая активность макрофагов, направленная на элиминирование опухоли, одновременно может способствовать ее прогрессии.

### **1.6.2.3 Влияние микробиома на толерантность макрофагов**

О присутствии в опухоли макрофагов, потерявших способность отвечать на провоспалительный стимул, указывают неудачные попытки изменить фенотип MAO с M2 на M1. Существуют данные, указывающие на способность макрофагов формировать толерантность в ответ на действие провоспалительных факторов [280]. Толерантность иммунного ответа — это феномен, при котором клетки под воздействием микробных компонентов теряют восприимчивость к последующим аналогичным воздействиям. Наиболее изученной является толерантность к липополисахариду, который связывается с Toll-подобным рецептором 4 (TLR4) и приводит к эпигенетическим изменениям, которые, в свою очередь, препятствуют экспрессии провоспалительных цитокинов при повторной стимуляции клеток [281, 282]. Предполагается, что толерантность к LPS является результатом эволюции и служит для защиты организма хозяина от повреждения в результате сильного воспаления [280]. Толерантность к LPS может, однако, быть патологической в условиях, когда организм подвержен воздействию патогена в течение продолжительного времени. Потеря восприимчивости клеток к повторному воздействию эндотоксина характеризуется пониженной продукцией провоспалительных цитокинов, таких как TNF и IL-6 [283, 284]. Толерантность формируется в результате взаимодействия многих факторов, участвующих в передаче сигнала от Toll-подобных рецепторов. Исследования показали, что в толерантных макрофагах наблюдается снижение активности митоген-активируемой протеинкиназы MAPK и транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в результате изменений в структуре TLR-адаптерных белков и, как следствие, происходит обратная регуляция последующих сигнальных молекул, таких как IL-1 рецептор-ассоциированная киназа M (IRAK-M), SH2-содержащая инозитолфосфатаза (SHIP) и MAPK-фосфатаза 1 (MKP-1) [285-288].

Последние работы продемонстрировали, что в макрофагах при индукции толерантности происходит ремоделирование хроматина, которое блокирует доступ факторов транскрипции к ряду генов, чьи продукты участвуют в передаче сигнала от TLR [289]. Однако, не только TLR играют роль в формировании толерантности. Было продемонстрировано, что существует толерантность к TNF, заключающаяся в потере восприимчивости клеток к повторной стимуляции TNF, которая следовала после продолжительной инкубации клеток с этим цитокином [290]. Интересно, что наблюдалась перекрестная толерантность между TNF и LPS, при которой клетки теряли восприимчивость к TNF после стимуляции LPS, и наоборот [291]. Ifrim с соавторами систематически исследовали роль других рецепторов в индукции толерантности. Оказалось, что взаимодействие клеток с лигандами, связывающимися с NOD-подобными рецепторами (NOD1 и NOD2), а также с рецептором дектин 1, индуцируют обратный эффект: повторное взаимодействие моноцитов с патогенном вызывало не пониженную, а повышенную провоспалительную активацию клеток по сравнению с первичным воздействием. Такой феномен был назван «тренировка врожденного иммунитета», что является полной противоположностью толерантности. Интересно также, что в некоторых случаях низкие концентрации лигандов к TLR не только отменяли толерантность, но и меняли его в сторону тренировки, тем самым заставляя моноциты поддерживать воспалительный статус [280]. Отмена толерантности заключается в одинаковой секреции провоспалительных цитокинов как при первичной, так и при повторной стимуляции клеток. Такой эффект способны оказывать, например, интерфероны альфа и гамма: они не до конца изученным образом блокируют ремоделирование области хроматина, ответственной за формирование толерантности [292, 293]. Таким образом, можно заключить, что существуют разнообразные факторы, способные модулировать толерантность в ту или иную сторону.

### **1.6.3 Влияние стромы и микробиома на терапию опухолей**

Современные иммунотерапевтические препараты позволяют добиться клинического ответа при широком спектре злокачественных опухолей. Первоначально эффективность их применения была показана у больных метастатической меланомой и НМРЛ, в дальнейшем к этому списку добавился почечно-клеточный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак мочевого пузыря и др. Опыт применения ингибиторов «контрольных точек иммунитета» демонстрирует их универсальность и способность вызывать клинический эффект при многих формах злокачественных новообразований. Важным преимуществом иммунотерапии является то, что препараты этого класса не оказывают прямого воздействия на опухолевые клетки, но восстанавливают реактивность собственной иммунной системы организма. Отсутствие непосредственного влияния на опухолевые клетки должно снижать риск развития резистентности. Результаты применения современных иммунотерапевтических препаратов

показывают, что достигнутый клинический ответ может сохраняться в течение длительного времени после завершения курса лечения.

Практически у всех современных иммунотерапевтических препаратов отмечена выраженная в разной степени противоопухолевая активность, а также хорошая переносимость по сравнению с химиотерапией и таргетными препаратами, что связано с отсутствием прямого повреждающего действия на клетки. Несмотря на перечисленные преимущества иммунотерапии, некоторые механизмы, через которые реализуется эффект иммунотерапевтических препаратов, остаются неизвестными. У ряда пациентов отмечается нечувствительность опухолей к препаратам и в последующем наблюдается прогрессирование опухолевого процесса на фоне проводимого лечения. Это стимулирует поиск прогностических и, в первую очередь, предиктивных маркеров для выделения группы больных, иммунотерапевтическое лечение которых будет эффективным [294-297].

В Российской Федерации на сегодняшний день одобрены к использованию несколько препаратов, четыре из которых направлены на ингибирование PD-1/PD-L1 взаимодействия: ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб и дурвалумаб. Первые два препарата представляют собой гуманизированные моноклональные антитела к PD-1, в то время как два других препарата - гуманизированные моноклональные антитела к PD-L1. В настоящее время в клинических исследованиях продолжается изучение возможности повышения эффективности противоопухолевой терапии путем применения различных комбинаций иммунотерапевтических препаратов с другими методами лечения, включая химиотерапию, таргетную и лучевую терапию.

Можно ли предсказать успех анти-PD-1/PD-L1 терапии?

Учитывая, что механизм действия иммунологических препаратов направлен на разрушение системы PD-1/PD-L1, прежде всего наиболее важным условием их применения является определение у больных соответствующих мишеней: рецептора PD-1 или его лиганда PD-L1. Следует отметить, что большинство работ как раз и направлено на изучение экспрессии PD-1 и PD-L1 в опухоли пациентов.

Помимо экспрессии PD-1/PD-L1, предполагаемым маркером ответа опухоли на иммунотерапию может являться нарушение системы репарации неспаренных оснований (mismatch repair, MMR) с накоплением большого количества соматических мутаций в опухоли, которые потенциально могут быть распознаны иммунной системой [298]. Интересно отметить, что опухоли с микросателлитной нестабильностью отличаются хорошим ответом на иммунотерапию и, помимо этого, характеризуются выраженной лимфоцитарной инфильтрацией. Клинические исследования показывают, что наличие инфильтрации опухоли CD8<sup>+</sup> Т-клетками может являться одним из необходимых условий для реализации клинического эффекта иммунотерапевтических препаратов.

На сегодняшний день известно, что результаты терапии онкологических пациентов тесно связаны с его микробиомом. Также известно, что изменения состава микробиома (например, вызванное приемом антибиотиков) крайне сильно способно изменить ответ на иммунотерапию и свести к минимуму ее потенциальные возможности. Показано снижение эффективности иммунотерапии ингибиторами “контрольных точек” у больных почечно-клеточным раком (ПКР) и раком легкого, получавших антибактериальную терапию за месяц до начала противоопухолевого лечения. Для стандартных цитотоксических препаратов описаны противоречивые результаты. С одной стороны, описана неэффективность цисплатина и оксалиплатина на “стерильных” мышах, что свидетельствует о необходимости наличия нормального микробиотического окружения для эффективной терапии [299]. С другой стороны, для рака поджелудочной железы описаны механизмы приобретения клетками опухоли лекарственной устойчивости к действию цитостатиков под воздействием микробиологической составляющей [300]. Описанные выше механизмы иллюстрируют различное воздействие микробиологической составляющей опухоли на ее развитие и течение. Также очевидно участие компонентов иммунной системы во всех вышеописанных процессах. Комплексное понимание положительного и отрицательного вклада микробов в развитие и терапию рака будет способствовать разработке более эффективных подходов к противоопухолевой терапии.

### 1.7 Заключение

Изучение резидентного микробиома представляет собой весьма трудную и интересную задачу. Альтернативой может являться анализ слюны и мокроты, однако, это не исключает возможную контаминацию образцов микроорганизмами, заселяющими ротовую полость и верхние дыхательные пути. На сегодняшний день известно, что легкие обладают уникальным составом микроорганизмов, независимо от популяции и географических особенностей. На сегодняшний день, очевидно, что микробиом легких непосредственно связан с различными респираторными заболеваниями. Также, стоит отметить, что спектр условно-патогенных микроорганизмов, активность которых возрастает существенным образом при развитии в легких онкологических заболеваний, достаточно широк, и этот список ежегодно пополняется новыми видами. Все это создает предпосылки для дальнейшего изучения состава микробиома легких и его значения при развитии опухолей. Механизмы взаимовлияния бактерий и опухолевых клеток частично изучены, однако все полученные данные фрагментарны и узкоспецифичны. Для понимания общих механизмов влияния бактерий не только на возникновение, но и на прогрессирование опухолей и ответа их на терапию, несомненно требуется проведения дальнейших исследований на больших выборках и с применением новых методологических подходов.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Список используемых растворов, реагентов и сред

1. Агар-агар бактериологический, «Диаэм», Россия
2. Агароза, «Хеликон», Россия
3. Акриламид, «Хеликон», Россия
4. Ампициллин, «ПанЭко», Россия
5. Аммония персульфат, «Хеликон», Россия
6. Бис-акриламид, «Хеликон», Россия
7. Бромистый этидий, «Sigma-Aldrich», США
8. Бычий сывороточный альбумин (БСА), «ПанЭко», Россия
9. Гематоксиллин, «BioVitrum», Россия
10. Глицерин, «Serva», Германия
11. Глицин, «ПанЭко», Россия
12. L-глутамин, «ПанЭко», Россия
13. (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), «ПанЭко», Россия
14. Дексаметазон (Dex), «Sigma-Aldrich», США
15. Диметилсульфоксид (ДМСО), «ПанЭко», Россия
16. Дрожжевой экстракт, «ПанЭко», Россия
17. Желатин, «ПанЭко», Россия
18. Изопропиловый спирт, «Химмед», Россия
19. Интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ) «Sigma-Aldrich», США
20. Калий хлорид, «Химмед», Россия
21. Кальций хлорид, «Химмед», Россия
22. Кислота серная, «Химмед», Россия
23. Кислота соляная, «Химмед», Россия
24. Кислота уксусная, «Химмед», Россия
25. Кислота фосфорная, «Химмед», Россия
26. Красители: бромфенол синий («Biotech», Англия), Ponceau S «Sigma-Aldrich», США, Coomassie G-250 «Sigma-Aldrich», США.
27. Краситель флуоресцентный Hoechst Stain, «Sigma-Aldrich», США
28. Ксилол, «Химмед», Россия
29. Коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз, «Sigma-Aldrich», США
30. Липополисахарид (LPS), «Sigma-Aldrich», США
31. Магний хлорид, «Химмед», Россия

32. Магний сульфат, «Химмед», Россия
33. Маркер молекулярного веса белков Page Ruler Plus, 10-250 kDa, «ThermoFischer Scientific», США
34. Маркеры молекулярного веса НК: маркер 100bp, маркер 1000bp, «NEB», Великобритания
35. Монтирующая среда Bio-Mount, «Sigma-Aldrich», США
36. Мурамилдипептид (MDP), «Sigma-Aldrich», США
37. Набор реактивов для выделения РНК RNeasy kit, «Qiagen», США
38. Набор реактивов для выделения РНК из тканей TRIzol reagent kit, «ThermoFischer Scientific», США
39. Набор реактивов для выделения плазмидной ДНК QIAGEN Plasmid Midi Kit, «Qiagen», США
40. Набор реактивов для выделения ДНК из агарозного геля QIAquick Gel Extraction Kit, «Qiagen», США
41. Набор реактивов для ПЦР 2,5X DFMas<sup>ZG</sup>MIX-2025, «Диалат», Россия
42. Набор реактивов для ПЦР с высокоточной полимеразой Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase, «NEB», США
43. Набор реактивов для лигирования T4 DNA Ligase, «NEB», США
44. Набор реактивов для трансфекции Lipofectamine LTX, «Promega», США
45. Набор реактивов для проведения реакции обратной транскрипции, «Invitrogen», США
46. Набор реактивов для проведения иммуноферментного анализа Human TNF-alpha DuoSet ELISA, «R&D systems», США
47. Набор реактивов для проведения иммуноферментного анализа интерлейкин 1-бета (IL-1 $\beta$ ), моноцитарный хемотаксический фактор-1 (MCP-1), интерлейкин – 8 (IL-8), интерлейкин – 6 (IL-6), интерлейкин-10 (IL-10), «Вектор-Бест-Европа», Россия
48. Набор реактивов ECL+Plus, «Millipore», Великобритания
49. Натрий ацетат, «Химмед», Россия
50. Натрий гидроксид, «Химмед», Россия
51. Натрий дезоксихолат, «Химмед», Россия
52. Натрий додецилсульфат (SDS), «Химмед», Россия
53. Натрий хлорид, «Химмед», Россия
54. Натрий цитрат, «Химмед», Россия
55. Неомицин (G418), Roche, США
56. Олигонуклеотиды, синтезированные ООО «Евроген», Россия
57. Параформальдегид, «Sigma-Aldrich», США
58. Пенициллин-стрептомицин 100X, «ПанЭко», Россия

59. Пептон «ПанЭко», Россия
60. Пируват натрия, «ПанЭко», Россия
61. Полиэтиленгликоль (PEG) 1450, «Sigma-Aldrich», США
62. Раствор Версена, «ПанЭко», Россия
63. Раствор фиколла, «ПанЭко», Россия
64. Реанент полибрэн, «Sigma-Aldrich», США
65. Реагент TEMED, «Sigma-Aldrich», США
66. Реагент Brij 35, «Sigma-Aldrich», США
67. Реагент НАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин), «ThermoFischer Scientific», США
68. Рестриктазы, «СибЭнзим», Россия
69. РНКаза А, «ThermoFischer Scientific», США
70. Среда для культивирования клеток RPMI, «ПанЭко», Россия
71. Среда для культивирования клеток DMEM, «ПанЭко», Россия
72. Среда питательная для бактерий Terrific, «Хеликон», Россия
73. Твин 20, «Sigma-Aldrich», США
74. Триптон, «Диаэм», Россия
75. Тритон-Х100, «Sigma-Aldrich», США
76. Трис-гидроксиметиламинометан, «Sigma-Aldrich», США
77. ТМВ, «Иммунотех», Россия
78. Форболовый диэфир (РМА), «Sigma-Aldrich», США
79. Формалин 10% забуференный, «BioVitrum», Россия
80. Фосфорно-солевой буфер (PBS), «ПанЭко», Россия
81. Хлороформ, «Химмед», Россия
82. Эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота, «Capricon scientific GmbH», Германия
83. Эозин, «BioVitrum», Россия
84. Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (EDTA), «Sigma-Aldrich», США
85. Этиловый спирт

## 2.2 Список используемых растворов

1. Буфер ТАЕ (50x) pH 7,6 (2M Tris-base, 0,05M ЭДТА, 1,56 M уксусная кислота);
2. Буфер RIPA для приготовления белковых лизатов (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM ЭДТА, 1% Triton X-100, 10% глицерин, 0.1% SDS, 0.1% дезоксихолат натрия, коктейль ингибиторов протеаз);
3. Буфер для нанесения белков для ПААГ электрофореза (4x) (Tris-HCl pH 6.8, 200mM, b-MeEtOH 400mM, SDS 4%, Glycerol 40%, Bromphenol blue 0.05%);

4. Буфер для нанесения белков для зимографии (2x) (Tris-HCl pH 6,8, 0,125M, глицерин 20%, SDS 4%, бромфеноловый синий 0,05%);
5. Буфер для ренатурации (2,5% Triton X-100 в воде);
6. Буфер для прохождения желатиназной реакции (10x) (на 1 л: Tris-base 12,1 г., Tris-HCl 63 г., NaCl 117 г., CaCl<sub>2</sub> 7,4г., 0,2 % Brij 35);
7. Коллоидный кумасси G-250 (8% сульфат аммония, 1,6% фосфорная кислота, 0,08% Coomassie G-250, 20% этиловый спирт);
8. Буфер Laemmli для электрофореза белков (10x) pH 8,5 (0,25M Tris-HCl, 1,92M глицин, 1% SDS);
9. Буфер для переноса белков на PVDF мембрану (10x) (на 500 мл: Tris-base 15,4 г., глицин 72,02 г.); на 500 мл 1x буфера 100 мл 96% этилового спирта;
10. Буфер для лизиса бактериальных клеток pH 8,0 (8 М мочевины, 100 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ Tris-base, 20 мМ имидазол, 20мМ бета-меркаптоэтанол, 50мМ глицин, 0,5% Tween 20);
11. Буфер для первой промывки колонки Ni-NTA pH 7,0: (мочевина – 8 М, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 100 мМ, трис – 10 мМ, имидазол – 20 мМ, глицин – 50 мМ, Tween 20 – 0,5%);
12. Буфер для второй промывки колонки Ni-NTA pH 6,8: мочевины – 8 М, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 100 мМ, трис – 10 мМ, глицин – 50 мМ;
13. Буфер карбонат-бикарбонатный pH 9,5, (67мМ NaHCO<sub>3</sub> и 28мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>);
14. Раствор Ponceau S staining solution (Ponceau S (Sigma) 1 г., уксусная кислота 2,5 мл, вода до 50 мл);
15. Среда LB для культивирования бактерий (на 1 л: NaCl 10 г, пептон 10 г, дрожжевой экстракт 5 г);
16. Среда LB-агар (на 1 л: триптон 10 г, дрожжевой экстракт 5 г, NaCl 10 г).

### 2.3 Список используемых приборов

1. Спектрофотометр Implen NanoPhotometer®, IMPLEN, Германия;
2. ПЦР-амплификатор CFX96 Real-Time System с программным обеспечением Bio-Rad CFX Manager 3.1 (3.1 1517.0823), Bio-Rad, США;
3. Флуоресцентный микроскоп Olympus BX53, Olympus, Япония;
4. Система гель-документирования ChemiDoc XRS+ с программным обеспечением Image Lab, Bio-Rad, США;
5. Автоматизированный ИФА анализатор Chemwell, Awareness Technology, США;
6. Камера депарафинизации и демаскировки Decloaking Chamber NxGen, Biocare Medical, США;
7. Микротом ротационный Leica RM2125 RTS, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Германия;
8. Нагревательный столик Микростат 30/80, ООО «КБ Техном», Россия;



9. Ванночка с подогревом Слайдбаня 30/60, ООО «КБ Техном», Россия;
10. Дозаторы лабораторные механические Трасферпетт® С (Transferpette® S), Brand GmbH + CO KG, Германия;
11. Секвенатор HiSeq 2000, Illumina, США;
12. Секвенатор MiSeq Illumina с использованием картриджа V3 Reagent kit 600 cycles, США;
13. Гомогенизатор ультразвуковой UP200Ht, Hielscher Ultrasonics, Германия.

## **2.4 Выделение нуклеиновых кислот**

### **2.4.1 Выделение плазмидной ДНК**

Ночную культуру клеток штамма *E.coli*, трансформированных плазмидой, выращивали в среде LB с ампициллином (100 мкг/мл). Выделение плазмиды осуществляли с помощью готового набора QIAGEN Plasmid Midi Kit («QIAGEN», США) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя. Концентрацию полученной ДНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer® (IMPLEN, Германия).

### **2.4.2 Выделение тотальной ДНК**

Для выделения ДНК с каждого парафинового блока получено 8 срезов толщиной 10 мкм, проведена депарафинизация ксилолом и этанолом, выделение ДНК проводилось с помощью наборов Qiagen FFPE DNA Kit. Чистота и количество полученных препаратов нуклеиновых кислот проанализирована при помощи спектрофотометра Implen NanoPhotometer® (IMPLEN, Германия).

### **2.4.3 Выделение тотальной РНК**

Выделение тотальной клеточной РНК проводили с помощью набора для выделения РНК RNeasy kit с использованием реагента TRIzol. Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer® (IMPLEN, Германия). Об отсутствии примесей в образце судили по соотношению значений оптической плотности раствора при длине волны 260 и 280 нм. После выделения РНК для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции.

## **2.5 Аналитический электрофорез ДНК в агарозном геле**

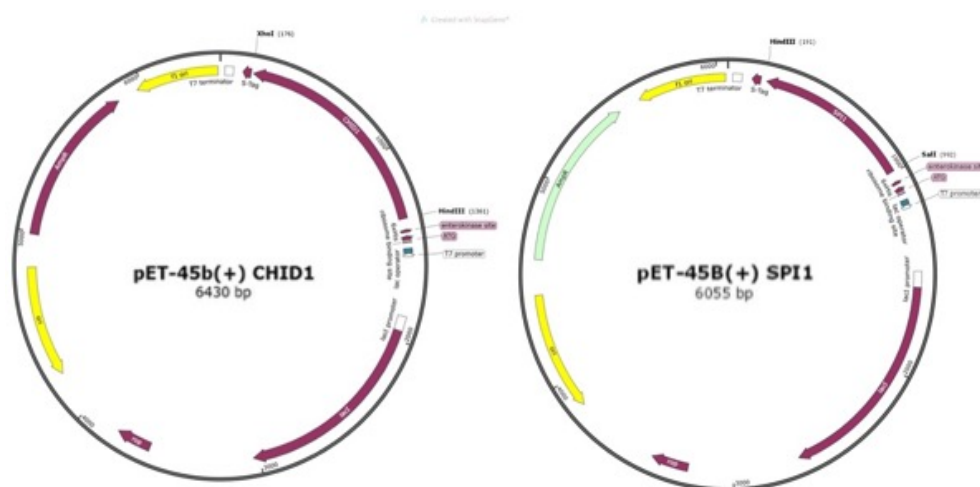
Процентное содержание агарозы в буфере TAE (см. список использовавшихся растворов и сред), оптимальное для разделения фрагментов ДНК в геле, определяли в соответствии с длинами анализируемой ДНК: 0,6% - 1 – 20 т.п.н., 0,9% - 0,5 – 7 т.п.н., 1,2% - 0,4 – 6 т.п.н., 1,5% - 0,2 – 3 т.п.н., 2,0% - 0,1 – 2 т.п.н. Гель содержал 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Перед нанесением на гель к образцу ДНК добавляли буфер для нанесения (1/6 объема образца) (см. список растворов и сред).

Разделение фрагментов ДНК проводилось с учетом расстояния между электродами при максимальном напряжении 5 В/см. 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.

## 2.6 Молекулярное клонирование

### 2.6.1 Используемые генетические конструкции

В работе были использованы следующие плазмидные векторы: pET-45b(+) и pLSXN. Вектор pET-45b(+) использовался для получения рекомбинантных белков для последующей иммунизации и получения моноклональных антител (Рисунок 6).



**Рисунок 6** – Карта плазмиды pET45b(+)CHID1 и pET45b(+)SPI1

Вектор pLSXN, несущий ген устойчивости к неомицину (G418), использовался для получения стабильных эукариотических клеточных линий, экспрессирующих GFP (Рисунок 7).



**Рисунок 7** – Карта плазмид pLSXN-GFP и pVSV-G

Для получения бактериального штамма, экспрессирующего рекомбинантный белок PU.1, последовательность, кодирующая 264 аминокислоты (CDS 7...270) изоформы 2 белка PU.1

человека, была клонирована в вектор pET45b(+). Ген *SPI1* человека (нуклеотидная последовательность мРНК *SPI1* человека доступна в базе данных GeneBank по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> с порядковым номером NM\_003120.3) амплифицировали с использованием в качестве матрицы плазмиды pINDUCER-21-SPI1 (<http://www.addgene.org/97039/>) в присутствии ген-специфических праймеров (SPI1\_F3147\_SalI, SPI1\_R3130\_HindIII; встроенные сайты эндонуклеаз рестрикции SalI и HindIII). Амплифицированные фрагменты ДНК очищали и клонировали в вектор pET45b(+) по соответствующим сайтам. В результате была получена плазида, несущая последовательность кодирующую белок PU.1 человека.

Для получения бактериального штамма, экспрессирующего рекомбинантный белок CHID1, его кодирующая последовательность была клонирована в вектор pET45b(+). Ген *CHID1* человека (нуклеотидная последовательность кДНК *CHID1* человека доступна в базе данных GeneBank по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> с порядковым номером NM\_001142675.1) амплифицировали на матрице кДНК, полученной из мРНК клеток линии LN229 с использованием ген-специфических праймеров (CHID1\_F3008\_XhoI, CHID1\_R3008\_HindIII, встроенные сайты эндонуклеаз рестрикции XhoI/HindIII). Амплифицированные фрагменты ДНК очищали и клонировали в вектор pET45b(+) по сайтам, созданным эндонуклеазами рестрикции. В результате была получена плазида, несущая последовательность, кодирующую белок CHID1 человека.

### 2.6.2 Рестрикция

Гидролиз ДНК рестрицирующими эндонуклеазами проводили с использованием ферментов в условиях, рекомендуемых производителями. Обычно реакционная смесь содержала рестрикционный буфер (1/10 от общего объема), необходимое количество ДНК и фермента, бычий сывороточный альбумин (до концентрации 1 мг/мл) и деионизированную воду до конечного объема 20 мкл. Рестрикцию проводили при оптимальной для фермента температуре (обычно +37 °С) в течение 1–2 часов. Продукты рестрикции анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

### 2.6.3 Выделение фрагментов ДНК для клонирования из агарозного геля

Для выделения и очистки ДНК из агарозных гелей использовали набор реагентов QIAquick Gel Extraction Kit согласно инструкции производителя.

### 2.6.4 Лигирование

Реакцию лигирования «липких» концов плазмидной ДНК проводили с использованием ДНК-лигазы бактериофага T4 (NEB) в условиях, рекомендованных производителем (1-2 единицы Вейса на 20 мкл лигазной смеси). Выделенные из геля векторную ДНК и клонируемый фрагмент

лигировали в молярном соотношении 1:2-1:3. Реакция проводилась при +16 °С в течение 2 часов либо при +4 °С в течение ночи. Полученную смесь использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* штамм BL21 DE3. Перед трансформацией лигазу инактивировали инкубацией в течение 10 мин при +65 °С.

### 2.6.5 Трансформация компетентных клеток

К 100 мкл компетентных клеток на льду добавляли аликвоту лигазной смеси или плазмидной ДНК (до 10 мкл) и инкубировали 30 мин на льду. После этого клетки подвергали тепловому шоку (+42 °С, 90 сек) и снова инкубировали на льду 5 мин. Затем к клеткам добавляли 1 мл среды LB и проводили инкубацию при +37 °С в течение 60 мин. Суспензию клеток центрифугировали при 3000 g 10 мин. Осадок клеток в остаточном объеме 100 мкл высевали на чашки Петри с LB-агаром и 50 мкг/мл ампициллина. Чашки инкубировали в течение 16–24 часов при +37 °С. Плазмидную ДНК клонов анализировали с помощью эндонуклеаз рестрикции, ПЦР *in situ*, а также секвенированием.

### 2.6.6 Получение рекомбинантных белков

Компетентные клетки *E. coli*, трансформированные полученными плазмидами pET45b(+)-SPI1 и pET45b(+)-CHID1, высевали на чашки с LB-агаром, содержащим 50 мкг/мл ампициллина, и инкубировали при 37°С в течение 16 ч. Далее в 20 мл среды LB переносили единичную колонию и наращивали при 37°С в течение 16 ч при постоянном перемешивании. Затем ночную культуру добавляли к 200 мл среды Terrific, содержащей лактозу, и инкубировали в течение 8 часов при 37°С. Стимуляция экспрессии белков PU.1 и CHID1 в бактериях *E. coli* происходила за счёт присутствия в среде галактозы. По истечении времени стимуляции клетки бактерий осаждали, выдерживали при -20°С в течение 16 ч, лизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора и подвергали процедуре очистки.

Для лизиса бактериальных клеток был использован соответствующий буфер (см. список использовавшихся растворов и сред). Лизис осуществляли в течение 1 часа при комнатной температуре. Раствор центрифугировали при 14 000 x g в течение 30 минут при +20°С. Дальнейшую очистку белков производили метал-хелатной хроматографией (IMAC) на колонке Ni-NTA Fast Start (Qiagen, 30600). Белок наносили на колонку Ni-NTA Fast Start, уравновешенную буфером, приведенного выше состава. Колонку промывали ступенчатым градиентом pH. Эффективная элюция белка PU.1 и CHID1 с минимальными примесями происходит буфером, при pH 4,8. Полученный в результате элюции белок PU.1 и CHID1 был дополнительно очищен от примесных бактериальных белков на колонке Superdex 200. Собранные фракции проверены методом электрофореза на 10% полиакриламидном геле (ПААГ).

Наиболее чистая белковая фракция PU.1 и CHID1 была использована в качестве антигена для дальнейшей иммунизации мышей.

## 2.7 Обратная транскрипция

Для проведения реакции обратной транскрипции 1 мкг РНК предварительно обработанной ДНКазой I согласно протоколу производителя (1ед на 1 мкг РНК) (Invitrogen) смешивали с 0,4 мкг случайных гексамерных олигонуклеотидов, денатурировали при 4°C и охлаждали на льду. В смесь для обратной транскрипции входили: 2 ед. обратной транскриптазы MMLV, соответствующий буфер, 2 мМ дитиотрейтола, 0,5 ед. ингибитора рибонуклеаз, 0,5 мМ дНТФ, и дистиллированная вода до 20 мкл. Реакцию проводили при 37°C в течение 1 ч, затем останавливали реакцию инаktivацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 мин, добавляли 80 мкл дистиллированной воды и использовали аликвоты для проведения ПЦР-амплификации со специфическими праймерами.

## 2.8 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Общую бактериальную нагрузку, а также содержание грамположительных и грамотрицательных бактерий оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. Программа ПЦР была следующей: 95°C 5 мин, 40 циклов 95°C 15 сек, 55°C 30 сек, 72°C 1 мин. Для проведения реакции 100 нг ДНК и по 10 пмоль каждого праймера добавляли к смеси для 2,5X DFMas<sup>ZG</sup>MIX-2025. Все реакции проводили в трехкратной повторности. Отрицательный контроль, содержащий свободную от ДНК воду вместо ДНК, использовали для каждого цикла ПЦР. Анализ данных количественной ПЦР в реальном времени выполняли с помощью программного обеспечения BioRad с установленным вручную порогом. В целях анализа метрикой было количество циклов до пересечения порога (значение Ct) в качестве меры нагрузки гена 16s рРНК и, следовательно, бактериальной нагрузки. Более высокая бактериальная нагрузка привела к меньшему количеству циклов до пересечения порога, то есть к более низкому значению Ct [301, 302].

Рабочие разведения кДНК после реакции обратной транскрипции были получены путем разведения образцов 1:10 стерильной деионизированной водой. 5 мкл рабочего раствора кДНК добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green Master Mix, по 5 пмоль обратного и прямого праймеров. Количественный ПЦР-анализ в режиме реального времени проводили с использованием ПЦР-анализатора Bio-Rad CFX. Программа амплификации была следующей: 95°C – 10 мин, 40 циклов (95°C – 15 с, 60°C – 30 с, 72°C - 60 с). Относительное изменение экспрессии исследуемой мРНК вычисляли методом  $\Delta\Delta Ct$ , где  $\Delta\Delta Ct$  определяли путем вычитания среднего  $\Delta Ct$  контроля из  $\Delta Ct$  экспериментальных образцов [303]. Последовательности праймеров указаны в таблице 2.

**Таблица 2** - Последовательность используемых праймеров

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд
16s	CCTACGGGNGGCW GCAG	GACTACHVGGGTATCTA ATCC	
16s Грам+	GACTCCTACGGGAG GC	GCGGCTGCTGGCAC	FAM- CTGAYSSAGCAACGCCG CG-BHQ1
16s Грам-	GACTCCTACGGGAG GC	GCGGCTGCTGGCAC	JOE- CCTGAYSCAGCMATGC CGCG-BHQ1
<i>SPII</i>	AAGGGTTCGACATG GAAGGGTTTCCCCT	AGAGAAGCTTTTAGTGG GGCGGGTGGCGCCGCT	-
<i>CHID1</i>	ACCTCTCGAGACCA TGCGGACACTCT	CCTAAAGCTTGAGCAGG TCGTAGAAG	-
<i>OPG</i>	CACTACTACACAGA CAGCTGG	ACTCTATCTCAAGGTAG CGCC	-
<i>DUSPI</i>	CCTGACAGCGCGGA ATCT	CCTGACAGCGCGGAATC T	-

## 2.9 Получение моноклональных антител

### 2.9.1 Иммунизация

Первичную иммунизацию проводили мышам Balb/c (самкам, 20 гр), вводя 30 мкг антигена (фракционированного белка PU.1 или CHID1) в виде эмульсии с полным адьювантом Фрейнда (1:1) подкожно (в подушечки задних лап и в холку). Бустирование антигеном с неполным адьювантом Фрейнда (1:1) проводили через две недели после первичной иммунизации.

### 2.9.2 Получение гибридом

Гибридизацию (слияние) иммунных спленоцитов и лимфоцитов, полученных из селезенки и лимфоузлов мыши, с клеточной линией Sp 2/0 проводили на третий день после бустирования в присутствии 50% полиэтиленгликоля (PEG 1450). В среду для посадки гибридом добавляли НАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин) для удаления неслившихся миеломных клеток, в соответствии с рекомендациями производителя. Полученные гибридомы рассаживали на четыре 96-луночных планшета по 150 мкл суспензии в лунку и на 10-й день

кондиционированные среды тестировали методом иммуноферментного анализа (ИФА) на фракционированном антигене PU.1

## 2.10 Иммуноферментный анализ

Для ИФА на 96-луночные планшеты (MaxiSorb, SPL, США) сорбировали антиген в концентрации 5 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере по 100 мкл в лунку в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере. Блокировка свободной поверхности пластика осуществляется добавлением по 100 мкл в лунку 1% раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) на 30 мин. Промывали 4 раза фосфатно-солевым буфером с добавлением 0,05% Твин 20. Антитела добавляли по 100 мкл в лунки в концентрации менее 10 мкг/мл в 0,5% БСА в PBS-T и инкубируют 1 час при комнатной температуре на шейкере. Промывали 4 раза фосфатно-солевым буфером с добавлением 0,05% Твин 20. Вторичные антитела, козы анти-мышинные, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) растворяли в PBS-T 1:30000 (JacksonImmunoResearch, США), добавляли в лунки по 100 мкл и инкубируют 40 минут – 1 час при комнатной температуре на шейкере. Промывали 6 раз фосфатно-солевым буфером с добавлением 0,05% Твин 20. Реакцию проявляли с помощью субстрата ТМВ (Иммунотех, Россия) по 100 мкл в лунку 5 минут, остановка реакции происходила при добавлении 25 мкл 10% серной кислоты. Оптическую плотность снимали при длине волны 450 нм, дифференциальный фильтр 630 нм.

## 2.11 Метагеномное секвенирование

### 2.11.1 Приготовление библиотек

16S ДНК библиотеки для секвенирования были приготовлены согласно протоколу Illumina ([https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)) с использованием праймеров к V3 и V4 региону гена рибосомальной рРНК [304]. Библиотеки были секвенированы при помощи MiSeq (Illumina) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3.

### 2.11.2 Биоинформатический анализ

Биоинформатическая обработка и анализ полученных результатов включали в себя несколько этапов. На первом этапе оценивались данные, полученные в результате секвенирования, для оценки использована программа FastQC v. 0.11.7. Оценка необходима для определения параметров дальнейшей обработки, включала в себя оценку качества прочтений, длины полученных ридов, наличие адаптеров. По результатам оценки парные риды были объединены с минимальным перекрытием 40 bp и р-значением 0.0001 с использованием PEAR V. 0.9.10 [305] <http://www.exelixis-lab.org/web/software/pear>. Адаптеры удалялись с использованием программы Trimmomatic V 0.36 [306]

<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>. Полученные в результате слияния риды повторно оценивались программой FastQC v. 0.11.7.

На втором этапе, на основании оценки определены параметры фильтрации слитых ридов. Для фильтрации и последующей обработки был использован пакет Usearch (v. 10.0.240) <http://www.drive5.com/usearch/download.html> [307]. Фильтрацию осуществляли со следующими параметрами: минимальная длина 420 нуклеотидов (minlen 420 bp), ожидаемая ошибка не более 1,0 (fastq\_maxee 1.0, [http://www.drive5.com/usearch/manual/cmd\\_fastq\\_filter.html](http://www.drive5.com/usearch/manual/cmd_fastq_filter.html)). Полученные в результате фильтрации риды (сиквенсы) также проверялись программой FastQC (Version: 0.11.7). Следующими шагами были дерепликация и кластеризация отфильтрованных ридов. Химерные последовательности были удалены с использованием алгоритма UCHIME2 [308]. Полученные в результате кластеризации OTU, выравнивались на слившиеся риды используя глобальное выравнивание (usearch\_global) на уровне 97 %. В результате глобального выравнивания определялось какое количество слившихся ридов соответствует тому или иному OTU. Из последующего анализа были удалены OTU отнесенные к контаминации (контаминацию определяли из отрицательных контролей выделения ДНК и подготовки библиотек). Использован алгоритм ublast пакета Usearch.

Третий этап – определение таксономии. Для назначения таксономии оставшимся OTU использованы следующие открытые ресурсы: база RDP - <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp> [309]. Для сиквенсов со слабой поддержкой (ID менее 0,7), таксономия определялась с использованием NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

Четвертый этап – визуализация и анализ полученных результатов. Для этого был использован открытый ресурс MicrobiomeAnalyst [310].

## **2.12 Транскриптомное секвенирование**

### **2.12.1 Приготовление библиотек**

Приготовление кДНК библиотек и секвенирование на платформе Illumina HiSeq 2000 проведено в соответствии с протоколами Illumina для RNA-seq. Для каждого образца было получено ~30 млн прочтений (ридов) длиной 57 нуклеотидов.

### **2.12.2 Биоинформатический анализ**

Риды фильтровали на предмет наличия последовательностей адаптеров с использованием скрипта bbdut, входящего в пакет BBTools (<http://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Фильтрованные риды очищали от последовательностей, принадлежащих рибосомальной РНК с помощью программы SortMeRNA [311]. Риды картировали на эталонный геном человека GRCh38.p12 с помощью программы Hisat2 (v2.2.1) [312]. Полученные выравнивания преобразовывали в формат BAM с помощью программы samtools [313]. Для оценки количества



картированных прочтений (ридов) и анализа дифференциальной экспрессии использовали два программных пакета: Rsubread [314] и DESeq [315]. Функциональная аннотация генов проводилась с использованием пакета R Homo.sapiens, Team BC (2015) и базы данных Ensembl. 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).

## **2.13 Анализ белков**

### **2.13.1 Приготовление клеточных лизатов**

Клеточные лизаты получали из субконфлюэнтного монослоя клеток, растущих на чашке Петри диаметром 100 мм. Клетки промывали 2 раза фосфатно-солевым буфером (PBS), затем лизировали в 200-500 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 15000 g. Супернатант малыми объемами хранили при -70 °С. Концентрацию белков в надосадочной жидкости определяли методом Бредфорда (Bio-Rad Laboratories GmbH), согласно рекомендациям производителя.

### **2.13.2 Вестерн-блот гибридизация**

К 30 мкг тотального клеточного белка добавляли 4x буфер для нанесения на гель, кипятили 5 мин и охлаждали во льду. Образцы разделяли в 8%-15%-SDS-полиакриламидном геле в буфере Laemmly. 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 (5% обезжиренное молоко или 5% BSA, 0,1% TWEEN-20 (Serva) в PBS) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали в течение 10 часов с соответствующими первичными антителами при +4 °С, отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,1% TWEEN-20 по 5 мин при комнатной температуре. После чего мембрану 1-1,5 часа инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными пероксидазой хрена, при комнатной температуре. После стандартной отмывки мембрану проявляли с помощью реагента для хемилюминесцентной реакции ECL (Milipore). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на приборе ChemiDoc XRS+ с программным обеспечением Image Lab, Bio-Rad.

Список использованных антител:

- p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) (#4696, Cell Signaling technology, USA),

- phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) (#4370, Cell Signaling technology, USA),
- JNK1, (# ab10664, Abcam, Великобритания)
- Phospho-JNK1 (PT183), (# ab47337, Abcam, Великобритания)
- phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (28B10) (#9216, Cell Signaling technology, USA),
- p38 MAPK (D13E1) (#8690, Cell Signaling technology, USA),
- PD-L1 (E1L3N) (#13684, Cell Signaling technology, USA).

### 2.13.3 Анализ желатиназной активности

Для анализа активности белков в кондиционированной среде на 6 луночные планшеты сажали  $5 \cdot 10^5$  клеток. На следующий день меняли среду на бессывороточную, через сутки собирали кондиционированную среду от клеток и центрифугировали ее 10 мин при 1500 g. Супернатант хранили в небольших аликвотах при  $-70$  °C. Для нанесения на SDS-ПААГ электрофорез 5 мкл среды смешивали с 5 мкл буфера для нанесения белков для зимографии.

Для анализа желатиназной активности (матриксных металлопротеаз) аликвоты проб кондиционированной среды разводили в 2 раза буфером для нанесения белков и наносили на гель. Проводился стандартный SDS-ПААГ электрофорез в 8% полиакриламидном геле с содержанием желатина 0,2% в стандартных условиях в буфере Laemmly.

После проведения электрофореза гель инкубировали при аккуратном помешивании при комнатной температуре в буфере для ренатурации 30 мин. Затем гель инкубировали в тех же условиях в буфере для прохождения желатиназной реакции 30 мин. После этого гель помещали в свежий буфер для прохождения желатиназной реакции на 4 часа при аккуратном покачивании при  $+37$ °C. Гель окрашивали в течение ночи в растворе коллоидного кумасси G-250. Избыток краски отмывали дистиллированной водой и фотографировали при помощи цифровой фотокамеры.

## 2.14 Клеточные линии

В работе использовали клетки немелкоклеточного рака легкого линии H1975, H1299, H292; рака почки A498 и RenCa ATCC; острой моноцитарной лейкемии линии THP-1, ATCC; GP-293, Clontech Laboratories. Клетки культивировали в стандартной среде RPMI-1640, содержащей 10%-ную эмбриональную сыворотку телят и 0,1 мг/мл стрептомицина, 100 ед./мл пенициллина и 146 мг/мл L-глутамин при  $37$ °C и в 5%-ном  $\text{CO}_2$ .

### 2.14.1 Трансфекция

Клетки GP-293 наращивали в 100 мм культуральных чашках; затем рассаживали на 35 мм культуральные чашки либо 6-луночные планшеты до 70% конфлюэнтности. Для трансфекции использовали 2 мкг ДНК: в равных молярных соотношениях ретровирусный конструкт с

целевым геном, в качестве дополнительного белка оболочки использовали плазмиду pVSV-G, кодирующую G-белок оболочки вируса везикулярного стоматита, необходимый для сборки вирусных частиц. Трансфекцию проводили с использованием липофектамина LTX, согласно протоколу производителя.

Полученные вирусные частицы в супернатанте собирали через 24, 48 и 72 часа, центрифугировали 10 мин при 1500 g для удаления клеточных остатков и использовали для инфекции (или замораживали при -70 °C).

#### 2.14.2 Инфицирование клеток

Инфицирование проводилось в 35 мм культуральных чашках либо в 6-луночных планшетах. За день до инфекции клетки-мишени рассеивали с таким расчетом, чтобы к моменту инфекции они достигали 20-30% конfluence. В день инфекции заменяли среду: добавляли 30-50% вирусного супернатанта, объем доводили обычной средой. Для повышения эффективности инфекции добавляли в каждую лунку полибрен (Sigma) до конечной концентрации 8 мкг/мл. Клетки-мишени инкубировали с вирусом в течение 24 часов.

После окончания инфекции меняли среду, клетки выращивали в течение 48 часов, после чего их рассаживали в 60-мм культуральные чашки для селекции на антибиотике. Действующие концентрации антибиотиков заранее подбирали экспериментально. Для контроля селекции рассеивали неинфицированные клетки. Селекция на G418 проходила в течение 7-11 дней, среду с антибиотиком меняли каждые 2-3 дня. После окончания селекции клетки замораживали при -70 °C в эмбриональной сыворотке с 10% ДМСО.

#### 2.15 Получение культур опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов

С целью отбора опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов, была разработана уникальная модель кокультивирования опухолевых клеток и макрофагоподобных клеток *in vitro*. На первом этапе работы был проведен подбор концентраций IFN $\gamma$ , форбол-12-миристинат-13-ацетат (PMA), LPS и мурамилдипептид (MDP) для получения клетками линии ТНР-1 фенотипа цитотоксических макрофагов. Подбор условий был проведен таким образом, что клетки, которые в результате воздействия приобретали цитотоксический фенотип, погибали в течение 5-7 дней после обработки.

Кокультивирование проводилось по следующему протоколу:

- 1-е сутки: посадка в 6-ти луночные культуральные планшеты моноцитарных клеток с добавлением IFN $\gamma$  (0,1 мкг/мл) и PMA (67 мкМоль). Посадка производилась в 2-х повторах;

- 2-е сутки: добавление LPS (0,1 мкг/мл), MDP (0,1 мкг/мл) в соответствующие лунки;

- 3-е сутки: отмывка полученных цитотоксических макрофагоподобных клеток от стимуляторов, добавление опухолевых клеток.

Схема кокультивирования в формате 6-ти луночной плашки представлена в таблице 3.

**Таблица 3** – Схема кокультивирования опухолевых клеток с цитотоксическими макрофагоподобными клетками

THP-1 ( $4 \cdot 10^5$ ) + IFN $\gamma$ +PMA+опухолевые клетки ( $4 \cdot 10^4$ )	THP-1 ( $4 \cdot 10^5$ ) + IFN $\gamma$ +PMA+LPS+опухолевые клетки ( $4 \cdot 10^4$ )	THP-1 ( $4 \cdot 10^5$ ) + IFN $\gamma$ +PMA+MDP+опухолевые клетки ( $4 \cdot 10^4$ )
THP-1 ( $4 \cdot 10^5$ ) + опухолевые клетки ( $4 \cdot 10^4$ )	Опухолевые клетки (контроль)	

Один эксперимент составляет три раунда кокультивирования, т.е. после первого раунда отбираются устойчивые опухолевые клетки, которые затем кокультивируются с вновь стимулированными макрофагоподобными клетками 2 раза. Клетки, которые были использованы для дальнейших исследований, прошли 3 раунда кокультивирования.

Также проводилось кокультивирование опухолевых клеток с нестимулированными моноцитами в тех же концентрациях (моноциты -  $4 \cdot 10^5$ , опухолевые клетки -  $4 \cdot 10^4$ ). В каждом эксперименте был использован контроль в виде чистых исходных опухолевых клеток, которые пересаживались параллельно проходящему эксперименту. Схема представлена в таблице 4.

**Таблица 4** - Схема сравнительного кокультивирования

THP-1 +IFN $\gamma$ +PMA + клеточная линия опухолевых клеток, полученная в результате отбора при кокультивировании с моноцитами, стимулированными IFN $\gamma$ +PMA	THP-1 +IFN $\gamma$ +PMA+ LPS + клеточная линия опухолевых клеток, полученная в результате отбора при кокультивировании с моноцитами, стимулированными IFN $\gamma$ +PMA+ LPS	THP-1 +IFN $\gamma$ +PMA+ MDP + клеточная линия опухолевых клеток, полученная в результате отбора при кокультивировании с моноцитами, стимулированными IFN $\gamma$ +PMA+ MDP
THP-1 +IFN $\gamma$ +PMA + Опухолевые клетки (контроль)	THP-1+IFN $\gamma$ +PMA + LPS + Опухолевые клетки (контроль)	THP-1+IFN $\gamma$ +PMA+ MDP + Опухолевые клетки (контроль)

Для сравнения устойчивости исходных и вновь полученных опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов проводили следующий эксперимент. Опыт проводился по вышеописанному протоколу в 6-ти луночных культуральных планшетах с вновь полученными клеточными линиями. В качестве контроля взяты исходные клеточные линии, не подвергавшиеся кокультивированию с макрофагами. Через несколько суток кокультивирования количество клеток, устойчивых к цитотоксической активности было проанализировано методом прямого подсчета.

## **2.16 Исследование клеточных характеристик *in vitro***

### **2.16.1 Анализ динамики роста клеток**

Для анализа скорости пролиферации на 6-луночные плашки сажали по 10000 клеток каждой культуры в лунку в 2-х повторах для каждой временной точки. Клетки культивировались в стандартных условиях. Для анализа ежедневно из двух лунок снимали клетки раствором Версена. Количество клеток в ней подсчитывали в камере Горяева.

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

Культуры клеток рассаживали по 200 клеток на 60 мм культуральные чашки Петри в стандартных условиях. Спустя неделю образовавшиеся колонии фиксировали 96% спиртом и окрашивали водным раствором кристаллического фиолетового. Количество и размер колоний оценивалось с помощью программ Adobe Photoshop CS3 Extended (Adobe) и Total Lab ver. 2.0, модуль Colony Counter (Nonlinear Dynamics).

### **2.16.3 Тест на направленную миграцию**

Тест на направленную миграцию *in vitro* проводили с использованием камер Бойдена с размером пор 8 мкм (Millipore). Внешняя камера заполнялась средой RPMI с 10% содержанием сыворотки, во внутреннюю камеру помещалось 20000 клеток, ресуспендированных в бессывороточной среде. Проводилась инкубация в течение 24 часов в стандартных условиях, после чего среду отбирали, внутреннюю сторону мембраны тщательно очищали от клеток, а внешняя сторона окрашивалась водным раствором кристаллического фиолетового. Затем окрашенные клетки, преодолевшие барьер, фотографировали с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX-51.

## **2.17 Оценка роста опухолей *in vivo***

В работе использовались самки бестимусных мышей линии D2CJ в возрасте 6–8 недель. Каждому животному подкожно прививалось по 2 опухоли ( $5 \times 10^6$  клеток, суспендированных в 100 мкл физиологического раствора). Размер опухолей измерялся каждые несколько дней, их объем высчитывался по формуле:  $V = \text{ГЧ(шир)} \times \text{Ч(дл)} \times 0,5$ . Продолжительность эксперимента

составляла 3 недели. Образовавшиеся опухоли использовали для иммуногистохимического анализа. Эксперименты повторяли как минимум 2 раза.

## 2.18 Гистология и иммуногистохимия

### 2.18.1 Приготовление срезов

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование проводилось на операционном материале, фиксированном 10%-ным нейтральным формалином, забуференным фосфатным буфером, в течение 24 часов. После гистологической проводки материал заливали в парафин и затем готовили срезы толщиной 5 мкм. Срезы монтировали на специальные высокоадгезивные стекла (SuperFrost Plus, ApexLab) и высушивали в течение 15 минут при температуре 70°C.

### 2.18.2 Гистологическое окрашивание

Непосредственно перед гистохимическим исследованием парафин удалялся со срезов в двух сменах ксилола, по 10 мин в каждой смене. Срезы проводили через спирты с объемной долей изопропанола 100% (I), 100% (II), 70%, 50% по 5 мин в каждом и промывали в дистиллированной воде. Далее проводили окрашивание гематоксилин-эозином (БиоВитрум, Россия).

### 2.18.3 Иммуногистохимическое окрашивание

Непосредственно перед иммуногистохимическим исследованием парафин удаляли со срезов в двух сменах ксилола, по 10 мин в каждой смене. Срезы проводили через спирты с объемной долей изопропанола 100% (I), 100% (II), 70%, 50% по 5 мин в каждом и промывали в дистиллированной воде. Температурную демаскировку проводили 10 минут при температуре 110°C в цитратном или трис-ЭДТА буфере. Блокировку эндогенной пероксидазы проводили в 3% перекиси водорода 5–10 минут. Срезы инкубировали с антителами в течение 30–60 минут, а затем с антителами к иммуноглобулинам мыши или кролика конъюгированными с полимерной пероксидазой хрена (PrimeVision, ПраймБиоМед, Россия). Коричневое окрашивание проявлялось при добавлении субстрата и ДАБ хромогена на 5–10 минут (ПраймБиоМед, Россия). Список использованных антител приведен в таблице 5.

**Таблица 5** - Список использованных антител для иммуногистохимии

Антитело	Производитель	Разведение
Анти - CD204, поликлональные	HPA000272, Sigma-Aldrich, USA	1:2000
Анти - IDO1, клон D5J4E	Cell Signaling, Denvers, MA, USA	1:200
Анти - CD206, поликлональные	HPA004114, Sigma-Aldrich, USA	1:2000
Анти - CD68, клон GR021	Genemed 61-0184, CA, USA	1:100

Анти - CD163, клон 10D6	BIOCARE, CA, USA	1:100
Анти – iNOS, клон SP126	SAB5500152, Sigma-Aldrich, USA	1:150
Анти - CD8, клон C8/144B	Genemed 61-0124, CA, USA	1:100
Анти - CD3, поликлональные	Genemed 61-0011, CA, USA	1:100
Анти - FOXP3, клон D2W8E	Cell Signaling, Denvers, MA, USA	1:200
Анти - PD-L1, клон E1L3N	Cell Signaling Denvers, MA, USA	1:200
Анти - CHID1, клон PBM-3D4	PrimeBioMed, Moscow, Russia	1:100
Анти - PU.1, клон 4G6	PrimeBioMed, Moscow, Russia	1:100
Анти - PU.1, клон 9G7	Cell Signaling, Denvers, MA, USA	1:200
Анти – CD31, клон GM006	PrimeBioMed, Moscow, Russia	1:100
Анти - TNF $\alpha$ , клон M1-C4	Sigma-Aldrich, USA	1:1000
Анти – CD20, клон PBM-12F1	PrimeBioMed, Moscow, Russia	1:100

Оценку результатов окрашивания проводили с помощью микроскопа Olympus (Tokyo, Japan) при 400x увеличении в 5 независимых полях зрения. Результаты анализа общей экспрессии маркеров макрофагов (CD68, CD163, CD206, CD204, CHID1, IDO1, PU.1), Т-клеток (CD3, CD8), эндотелиальных клеток (CD31) и В-клеток (CD20) в строме опухоли выражали учетом количества антиген-позитивных клеток (0 - <1%; 1 - <10%; 2 - 11–50%; 3 - >50%). Экспрессию FoxP3 оценивали по среднему количеству положительно окрашенных клеток в 5 независимых полях зрения: 0 (отсутствие положительных клеток), 1 (1–5 положительных клеток), 2 (6–25 положительных клеток) и 3 (>25 положительных клеток) на поле зрения. Образцы с баллами 0-1 для CD206, IDO1, CD8, CD20, CD31 и FoxP3 были объединены в группу с низкой экспрессией, а образцы с баллами 2–3 были объединены в группу с высокой экспрессией данных маркеров. Для CD68, PU.1, CD163, CD204, CHID1 и CD3 образцы с баллами 0, 1 и 2 были объединены в группу с низкой экспрессией, а образцы с баллом 3 представляли группу с высокой экспрессией [316, 317].

Для анализа результатов иммуноокрашивания опухолевых клеток на CHID1 клетки классифицировали как положительные при наличии четкого цитоплазматического окрашивания. Поскольку в опухолях отсутствовали негативные клетки, то оценивали интенсивность окрашивания по шкале: 1 – слабое, 2 – умеренное и 3 – сильное. Для анализа выживаемости образцы с интенсивностью 2 и 3 были объединены в одну группу.

Во всех исследованных образцах в опухолевых клетках наблюдалась экспрессия TNF- $\alpha$ , поэтому количественный анализ положительно окрашенных клеток провести не представлялось

возможным. Для анализа экспрессии TNF- $\alpha$  в опухолевых клетках оценивали интенсивность окрашивания по шкале от 1 (слабое окрашивание) до 2 (сильное окрашивание) баллов.

Экспрессию iNOS, IDO1 и PD-L1 оценивали также в опухолевых клетках. Окрашивание опухоли считалось положительным, когда четкое цитоплазматическое окрашивание (для iNOS и IDO1) и мембранное окрашивание для PD-L1 присутствовало в  $\geq 1\%$  опухолевых клеток. Поскольку на сегодняшний день не существует однозначно определенных клинических пороговых значений для экспрессии iNOS, IDO1 и PD-L1, для экспрессии данных белков использовались следующие пороговые значения: 0 -  $\leq 1\%$ , 1-1-10%, 2-11-50%, 3 > 50% опухолевых клеток, демонстрирующих цитоплазматическое или мембранное окрашивание. Для анализа выживаемости образцы с баллами 2 и 3 были объединены в одну группу.

#### **2.18.4 Иммунофлуоресценция**

Непосредственно перед иммунофлуоресцентным исследованием парафин удаляли со срезов в двух сменах ксилола, по 10 мин в каждой смене. Срезы проводили через спирты с объемной долей изопропанола 100% (I), 100% (II), 70%, 50% по 5 мин в каждом и промывали в дистиллированной воде. Температурную демаскировку проводили 10 минут при температуре 110°C в цитратном или трис-ЭДТА буфере. Блокировку эндогенной пероксидазы проводили в 3% перекиси водорода 5–10 минут. Срезы инкубировали с антителами в течение 30–60 минут, а затем с козьими антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с флуорохромом Alexa488 (JacksonImmunoResearch, США) и козьими антителами к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с флуорохромом Cy3 (JacksonImmunoResearch, США). Препараты заключали в среду для заключения на водной основе. Оценку результатов окрашивания проводили с помощью микроскопа Olympus (Токуо, Япония) при 400x увеличении с использованием фильтров U-FUNA и U-FGNA (Olympus, Япония).

#### **2.19 Статистическая обработка результатов**

Все клеточные эксперименты независимо повторяли три раза. Для статистического анализа полученных данных использовалась программа GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc). Микробное разнообразие в образцах (альфа-разнообразие) оценивали с помощью индексов Chao1, ACE, Шеннона и обратного индекса Симпсона. Микробное сходство между образцами (бета-разнообразие) оценивали с помощью индекса Брея-Кертиса. Для визуализации полученных данных использовали приложение MicrobiomeAnalyst [310]. Различия состава микробиома между образцами опухолей и условно нормальной тканью, а также между другими группами сравнения оценивали с помощью критерия Вилкоксона для парных выборок или непараметрического критерия Манна-Уитни.



При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, коэффициент ранговой корреляции Спирмена. В случае нормального распределения для сравнения двух выборок использовался точный критерий Фишера; для трех и более выборок использовался одномерный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим использованием критерия Даннета для сравнения с контрольной выборкой. Анализ выживаемости проводился путем построения кривых дожития по методу Каплана – Майера. Сравнение достоверности различий проводили при помощи логарифмического рангового критерия. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

Данное исследование посвящено изучению взаимодействия иммунологической и микробиологической составляющих опухолевой стромы и их вкладу в прогрессию опухолей. Полученные результаты позволят разработать диагностические и прогностические критерии, основанные на анализе видового состава и количества бактерий в опухоли и фенотипа иммунокомпетентных клеток.

Первая часть исследования сосредоточена на изучении фенотипа иммунокомпетентных клеток стромы опухолей методом иммуногистохимии, их вклада в прогрессию заболевания и оценке их прогностической значимости. В данной части работы проведена качественная и количественная оценка макрофагов различных фенотипов, а также Т- и В-клеток в строме опухолей, проведен анализ ассоциации их содержания с клиническими характеристиками, прогнозом заболевания и корреляция их содержания между собой.

Вторая часть данного исследования посвящена определению таксономического состава резидентного микробиома опухолей немелкоклеточного рака легкого и плоскоклеточного рака пищевода методом направленного секвенирования гена 16S рРНК.

В третьей части исследования представлены результаты впервые проведенного комплексного анализа бактериального и клеточного компонентов опухолевой стромы и дана оценка перспектив использования такого метода анализа для мониторинга динамики развития заболевания и определения прогноза.

Заключительная часть исследования посвящена поиску и изучению механизмов взаимодействия микробиома и локального внутриопухолевого иммунитета, а именно механизмов формирования цитотоксичности и/или толерантности макрофагов под воздействием бактерий опухолевой стромы и отбора опухолевых клеток под воздействием цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета.

### **3.1 Анализ фенотипа иммунокомпетентных клеток стромы опухолей легкого**

Для проведения исследования были подобраны 100 парафиновых блоков от первичных больных НМРЛ, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствуют стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям. От каждого из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз у всех пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей (ВОЗ, 2019). В исследование были включены образцы НМРЛ двух

основных гистологических типов: аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого. В таблице 6 представлена характеристика исследованной выборки.

**Таблица 6** - Общая характеристика выборки пациентов с НМРЛ

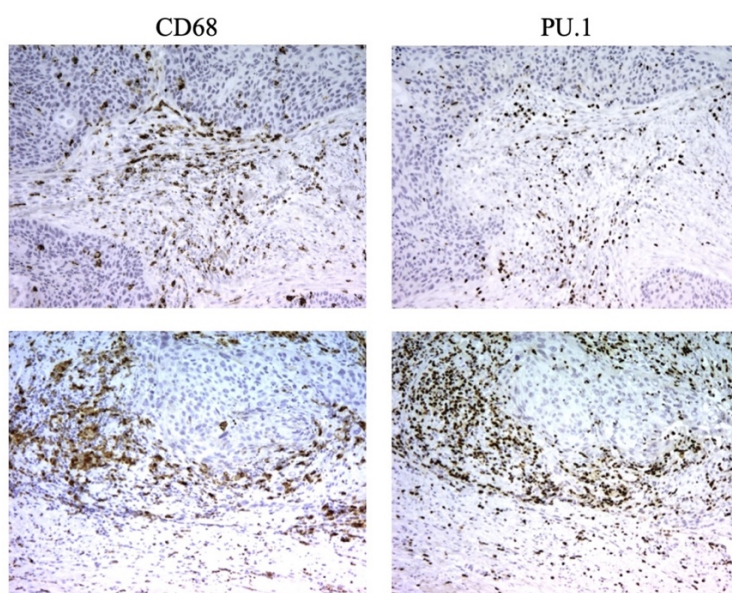
Характеристика	Всего (n=100)
Возраст (лет), среднее $\pm$ SD	62,5 $\pm$ 9,5
Общая выживаемость (мес), среднее $\pm$ SD	35,9 $\pm$ 29,6
Гистология, n (%)	
• Аденокарцинома (АК)	51 (51%)
• Плоскоклеточный рак (ПКРЛ)	49 (49%)
Стадия, n (%)	
• I-II	49 (49%)
• III-IV	51 (51%)
Локализация	
• Центральная, n (%)	42 (42%)
• Периферическая, n (%)	58 (58%)
Дифференцировка, n (%)	
• G1-G2	60 (40%)
• G3	40 (40%)
N (наличие регионарных метастазов), n (%)	
• N=0	35 (33%)
• N $\geq$ 1	65 (67%)
T (размер опухоли), n (%)	
• T1-T2	55 (55%)
• T3-T4	45 (45%)

### 3.1.1 Анализ фенотипа клеток воспалительного инфильтрата опухолей легкого

Проведен иммуногистохимический анализ макрофагов различных фенотипов (CD68, CD163, CD206, CD204, PU.1, iNOS, PD-L1, CHID1, IDO1), Т-клеток (CD3, CD8, FOXP3), В-клеток (CD20), эндотелиальных клеток (CD31), а также эпителиальных опухолевых клеток, экспрессирующих некоторые маркеры клеток опухолевой стромы (PD-L1, CHID1, TNF $\alpha$ , iNOS, IDO1).

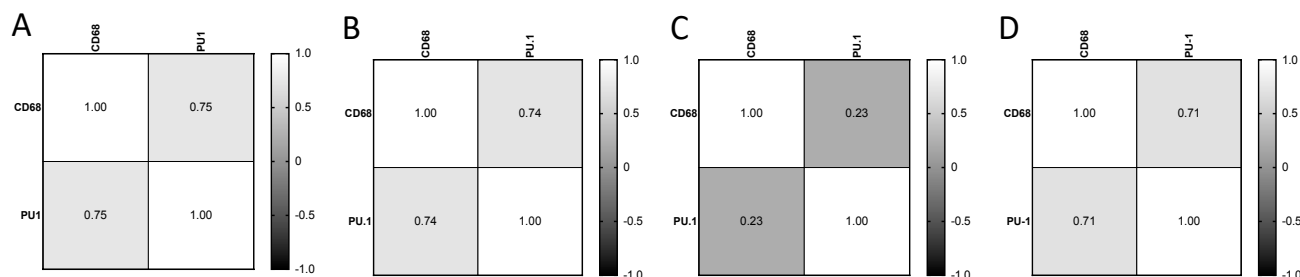
Выявление макрофагов смешанного фенотипа и пролиферирующих макрофагов проводили с помощью иммунофлуоресценции с использованием комбинаций маркеров. Известно, что среди рутинно используемых маркеров макрофагов отсутствуют такие, которые

экспрессируются всеми макрофагами без исключения, поэтому выявление макрофагов смешанного фенотипа представляется достаточно трудной задачей. Кроме того, все общеизвестные макрофагальные маркеры выявляются в виде мембранной и цитоплазматической окраски, что делает достаточно затруднительным их совместное использование. В рамках данного исследования предпринята попытка использования транскрипционного фактора PU.1 в качестве маркера макрофагов. Его безусловным преимуществом является ядерная локализация, что позволяет использовать его в двойных покрасках вместе с другими маркерами макрофагов. Это особенно актуально в эпоху иммунотерапии, когда поиск новых предикторов успеха лечения представляется крайне необходимым. Здесь нужно отметить, что маркер PU.1 не является исключительно макрофагальным. Однако стоит подчеркнуть, что многие маркеры опухолевого микроокружения пересекаются (как между клетками микроокружения, так и с опухолевыми клетками), что не препятствует их использованию. PU.1 в достаточном для выявления, но меньшем количестве, помимо макрофагов, содержится также в зрелых В-клетках. Во всех остальных клетках лимфоидного и миелоидного инфильтрата опухоли PU.1 практически отсутствует. В-клетки в опухолях присутствуют в значительно меньших количествах по сравнению с макрофагами и имеют отличительные особенности локализации, что позволяет их дифференцировать от макрофагов. Проведено предварительное исследование, направленное на изучение возможности использования PU.1 в качестве общего макрофагального маркера. Для этого, образцы опухолей светлоклеточного рака почки, рака легкого, колоректального рака, плоскоклеточного рака пищевода и рака предстательной железы были окрашены с использованием антител к CD68 и PU.1. Примеры иммуногистохимических окрашиваний представлены на рисунке 8.



**Рисунок 8** - Пример ИГХ окрашивания опухолей плоскоклеточного рака пищевода с помощью антител к CD68 и PU.1 (100x)

Анализ корреляции содержания исследованных маркеров проводили методом вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Корреляционный анализ экспрессии маркеров CD68 и PU.1 в образцах опухолей пищевода, почки, кишки и легкого показали значимую положительную корреляцию ( $r=0,75$ ;  $p<0,0001$ ,  $r=0,74$ ;  $p<0,0001$ ,  $r=0,23$ ;  $p=0,036$ ,  $r=0,71$ ;  $p<0,0001$  соответственно). Результаты представлены на рисунке 9.



**Рисунок 9** - Коэффициент корреляции Спирмена. Анализ экспрессии макрофагальных маркеров CD68 и PU.1 в образцах опухолей плоскоклеточного рака пищевода (A), светлоклеточного рака почки (B), колоректального рака (C) и НМРЛ (D)

Полученные результаты позволяют заключить, что с некоторыми ограничениями PU.1 может быть использован в качестве тотального макрофагального маркера в различных типах опухолей.

На следующем этапе работы было принято решение о необходимости получения собственных моноклональных антител к вышеописанному маркеру с использованием гибридомной технологии.

### 3.1.1.1 Получение антител к PU.1

Для получения бактериального штамма, экспрессирующего рекомбинантный белок PU.1, его кодирующая последовательность была клонирована в вектор pET45b(+). В результате была получена плаزمид, несущая кодирующую последовательность белка PU.1 человека. Очищенная фракция полученного рекомбинантного белка PU.1 была использована в качестве антигена для иммунизации мышей.

После иммунизации и гибридизации, полученные гибридомы рассаживали на четыре 96-луночных планшета и на 10-й день кондиционированные среды тестировали методом иммуноферментного анализа (ИФА) на фракционированном антигене PU.1. В результате 25 первичных гибридомных клонов, продуцирующих антитела, связывающие антиген, отсаживали в лунки 12-луночных планшетов. По результатам ИФА на неродственном антигене, содержащим His-tag, элиминировали 6 клонов. Кондиционированную среду от оставшихся 19 первичных клонов тестировали методом иммуногистохимии (ИГХ) на срезах миндалин. Четыре первичных клон, продуцирующих антитела, специфично связывающихся с тканью миндалин в

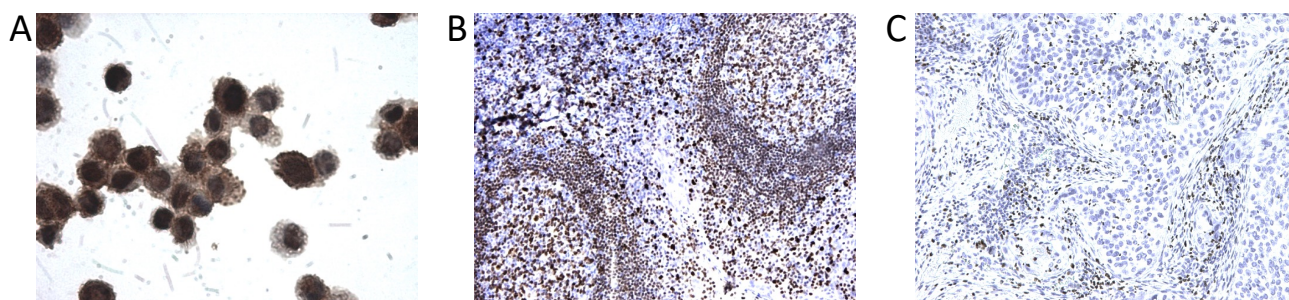
ИГХ, клонировали на мышинном фидере из селезенки: 2A10, 1C10, 4E6, 4G6. Субклоны клонов 4G6 и 1C10 выбрали как клоны, производящие наиболее специфично работающие антитела. Для дальнейшей работы оставлен клон 4G6. Полученные антитела анти-PU.1 клон 4G6 протестированы на антигене и на неродственном рекомбинантном белке, содержащим His-tag (для выявления неспецифического связывания). Результаты представлены в таблице 7.

**Таблица 7** - Результаты иммуноферментного анализа, показывающие связывание антител к PU.1, продуцируемых гибридомой 4G6, с рекомбинантным белком PU.1

Клон	PU.1	К-
4G6	2,1022	0,0435

Проведенный анализ показал специфическое связывание с антигеном и отсутствие перекрестной реакции с His-tag (К-).

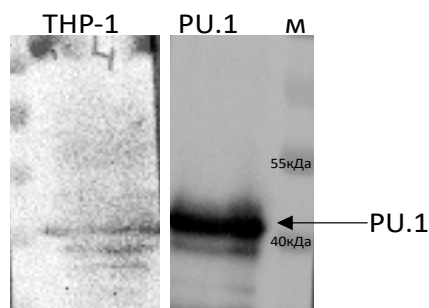
Далее провели тестирование полученных антител методом иммуноцитохимии и иммуногистохимии на клеточной линии ТНР-1 и тканях миндалина и плоскоклеточного рака легкого. Результаты представлены на рисунке 10.



**Рисунок 10** - Пример ИГХ окрашивания клеточной линии ТНР-1 (А, 400х), миндалина (В, 100х) и плоскоклеточного рака легкого (С, 100х) с помощью антител к PU.1, клон 4G6

В иммуногистохимическом анализе антител к PU.1, клон 4G6, на срезах миндалин наблюдалась четкая ядерная окраска В-лимфоцитов герминативного центра, В-клеток мантийной зоны, макрофагов, плазматические клетки при этом оставались неокрашенными. Методом иммуноцитохимии на моноцитарной клеточной линии ТНР-1 антитела показали четкое связывание с ядерным антигеном PU.1.

Дополнительно был проведен иммуноблоттинг для проверки антител на тотальных клеточных лизатах моноцитарной клеточной линии ТНР-1 и рекомбинантном белке PU.1 (Рисунок 11). Было показано, что антитела к 4G6 связываются с нативным белком PU.1 (42 кДа).



**Рисунок 11** - Специфичность антител, продуцируемых гибридомой PU.1, клон 4G6, к транскрипционному фактору PU.1 на тотальных клеточных лизатах моноцитарной клеточной линии человека THP-1 и рекомбинантном белке PU.1, выявляемая на иммуноблотах

Таким образом, полученные в работе антитела анти-PU.1 клон 4G6 проверены методами иммуногистохимии, иммуноцитохимии, а также методом иммуноблоттинга. Полученные антитела показали специфичное связывание с антигеном во всех описанных методах и могут быть использованы для дальнейших рутинных молекулярно-биологических и иммуногистохимических исследований.

### 3.1.1.2 Получение антител к CHID1

Для расширения стандартного списка маркеров макрофагов в данной работе был исследован уровень экспрессии хитиназоподобного белка CHID1 в опухолях легкого. Ввиду отсутствия на рынке антител к данному белку, пригодных для использования в иммуногистохимии, было принято решение о получении собственных моноклональных антител к CHID1.

Для получения бактериального штамма, экспрессирующего рекомбинантный белок CHID1, его кодирующая последовательность была клонирована в вектор pET45b(+). В результате была получена плазида, несущая кодирующую последовательность белка CHID1 человека. Очищенная фракция полученного рекомбинантного белка CHID1 была использована в качестве антигена для иммунизации мышей.

После иммунизации и гибридизации, полученные гибридомы полученные гибридомы рассаживали на четыре 96-луночных планшета, и на 10-й день кондиционированные среды тестировали методом иммуноферментного анализа. В результате тестирования отобрано 17 клонов, производящих антитела, хорошо связывающиеся с антигеном. Проведено первое клонирование для всех полученных клонов. По результатам ИФА на взаимодействие с полноразмерным рекомбинантным CHID1 было отобрано 5 клонов. Для определения специфичности полученных антител было проанализировано взаимодействие полученных антител с родственными хитиназоподобными белками YKL-39 и YKL-40. По результатам ИФА-

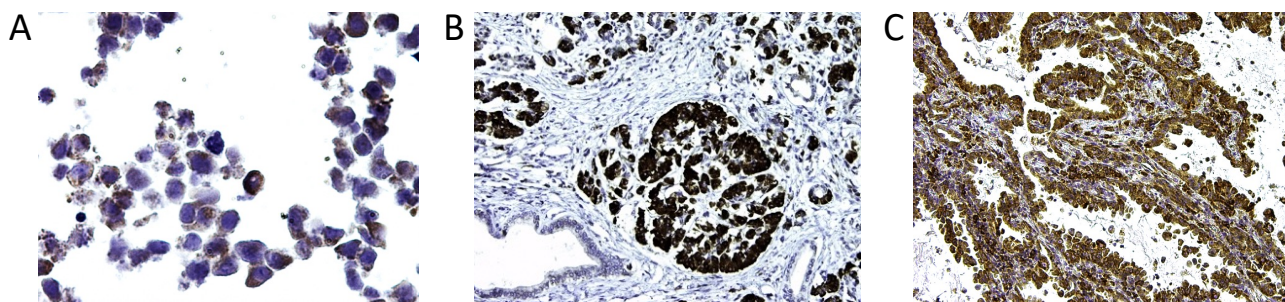


тестов, было показано, что только клон 3D4 не взаимодействует с родственными CHID1 хитиназоподобными белками. Результаты тестирования представлены в таблице 8.

**Таблица 8** - результаты иммуноферментного анализа, показывающие связывание антител к CHID1, продуцируемых гибридомой 3D4, с рекомбинантными белками CHID1, YKL-39 и YKL-40 (5 мкг/мл)

Клон	YKL-39	CHID1	YKL-40
3D4G7	0,0445	3,0611	0,2329

Проведенный анализ показал специфическое связывание с антигеном и отсутствие перекрестной реакции с гомологичными рекомбинантными белками. Далее проведено тестирование полученных антител методом иммуногистохимии. Результаты представлены на рисунке 12.

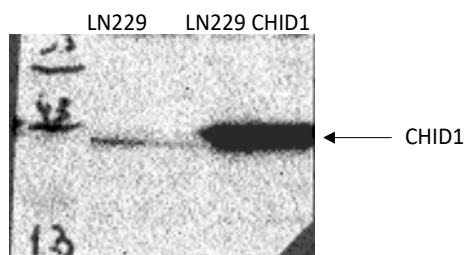


**Рисунок 12** - Пример ИГХ окрашивания клеточной линии LN229 (А, 400х), поджелудочной железы (В, 100х) и аденокарциномы легкого (С, 100х) с помощью антител к CHID1

В иммуногистохимическом анализе антител к CHID1 клон 3D4 наблюдалась специфическая окраска цитоплазмы клеток LN229, четкая окраска экзокринных железистых клеток поджелудочной железы и опухолевых клеток аденокарциномы легкого, что свидетельствует о пригодности использования данных антител для иммуногистохимии.

Дополнительно был проведен иммуноблоттинг для проверки антител на тотальных лизатах клеточной линии глиобластомы LN229 и сублинии LN229 pLXSN-CHID1, экспрессирующих рекомбинантный белок CHID1. Результаты представлены на рисунке 13.





**Рисунок 13** - Специфичность антител, продуцируемых гибридомой CHID1, клон 3D4, к белку CHID1 на тотальных клеточных лизатах клеточной линии глиобластомы LN229 и сублинии LN229, экспрессирующей экзогенный CHID1

Таким образом, антитела, продуцируемые гибридомой CHID1, клон 3D4, проверены методами ИФА, иммуногистохимии, а также методом иммуноблоттинга. Полученные антитела показали специфичное связывание с антигеном во всех описанных методах и могут быть использованы для дальнейших рутинных молекулярно-биологических и иммуногистохимических исследований.

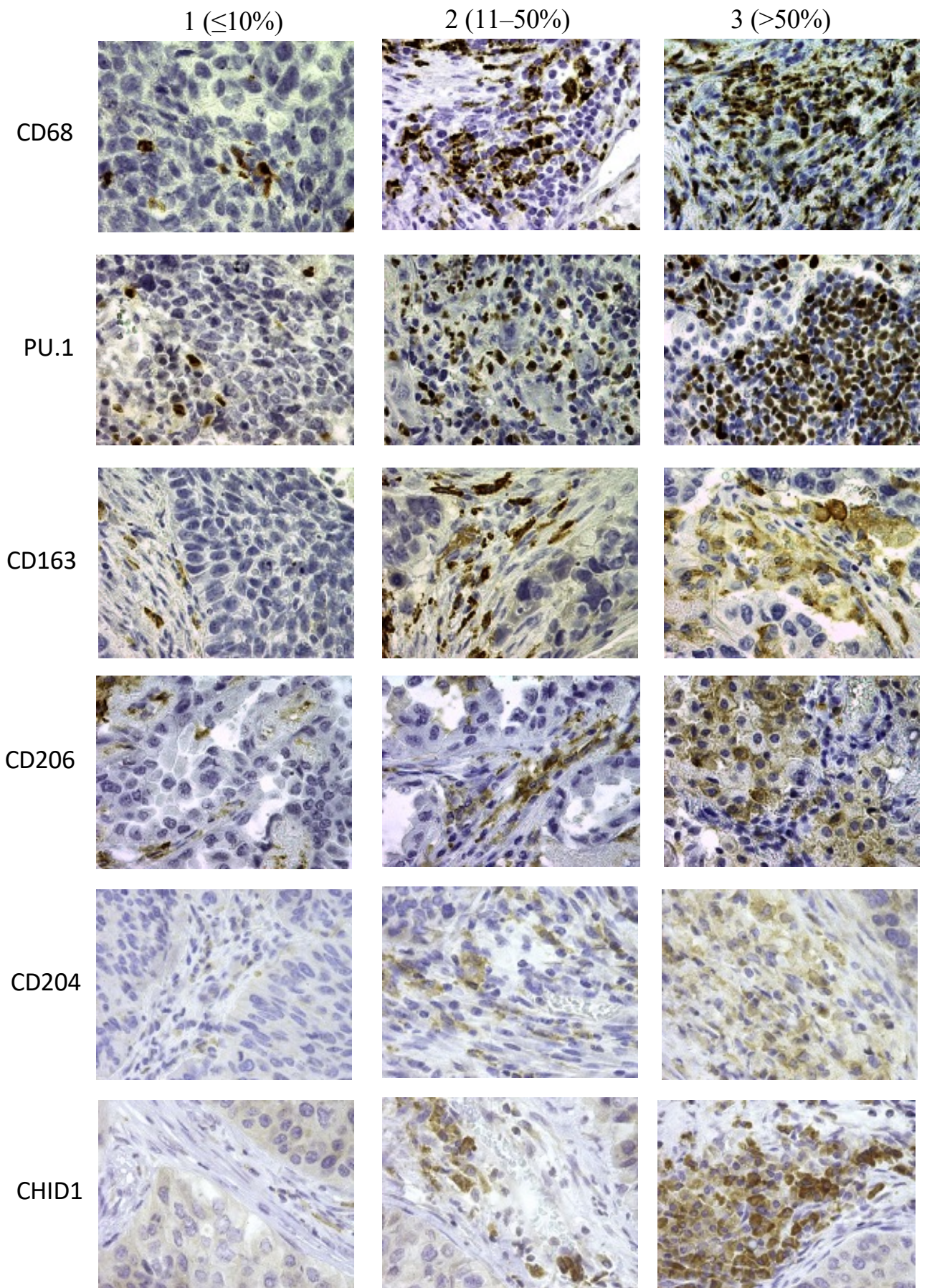
### **3.1.2 Клиническая и прогностическая значимость макрофагов различных фенотипов в опухолях НМРЛ**

На первом этапе исследования проведен анализ общего содержания и фенотипа макрофагов, ассоциированных с опухолью, на образцах НМРЛ.

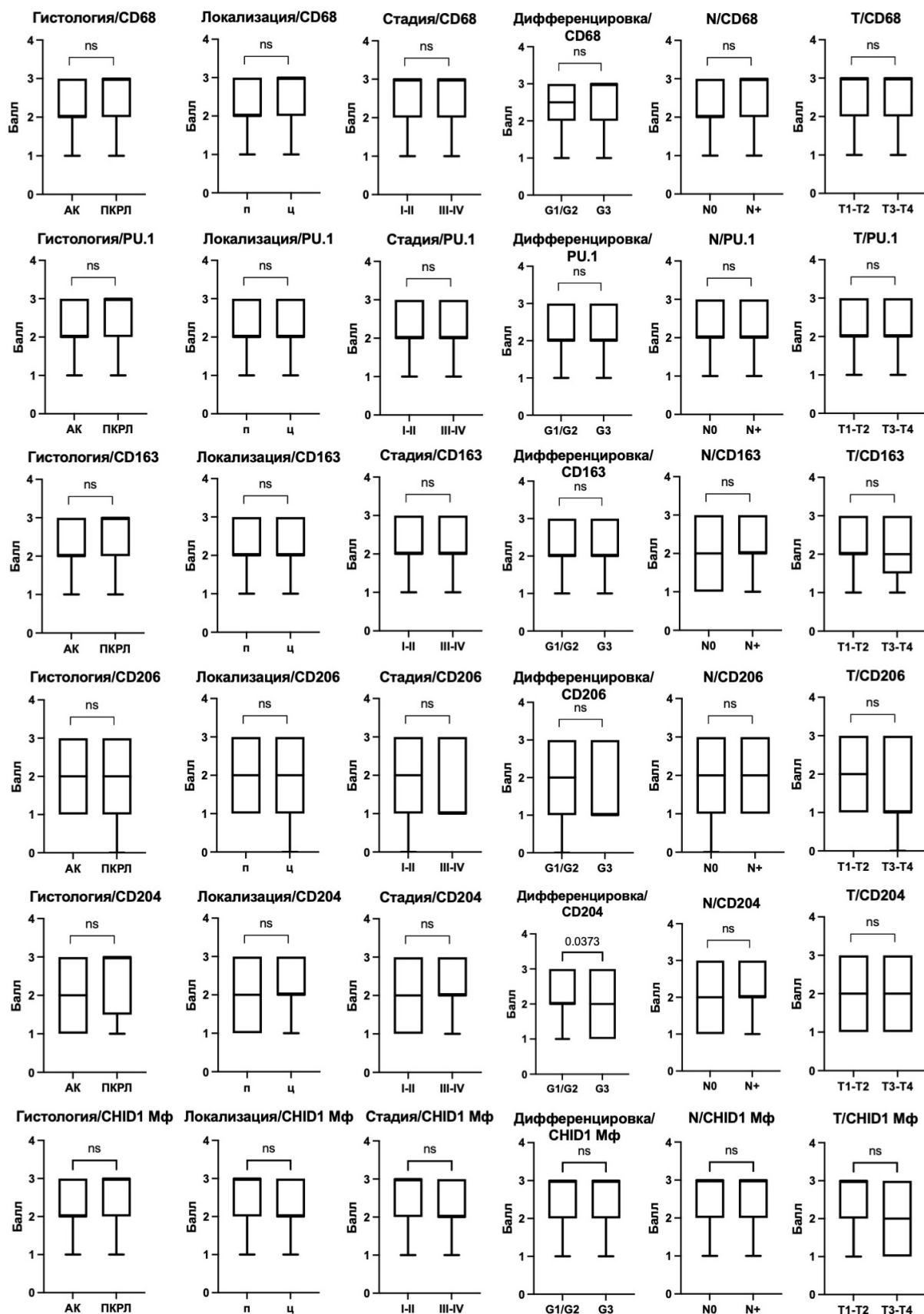
В качестве общих макрофагальных маркеров были использованы CD68 и PU.1. Для описания фенотипа макрофагов, ассоциированных с опухолью, были использованы CD163, CD206, CD204 и CHID1. При иммуногистохимическом окрашивании с использованием антител к CD68, CD163, CD206, CD204 и CHID1 наблюдалась мембранное и цитоплазматическое окрашивание. При использовании антител к PU.1 наблюдалась ядерная окраска. Примеры окрашиваний представлены на рисунке 14.

Показано, что во всех исследованных образцах CD68+, PU.1+, CD163+, CD204+ и CHID1+ макрофаги обнаруживаются в строме опухоли. В случае CD206, наличие CD206+макрофагов наблюдали в 99% образцов.

Далее проведен анализ ассоциации содержания макрофагов с клинико-морфологическими характеристиками (гистологическим типом опухоли, локализацией, стадией заболевания, степенью дифференцировки, а также размером опухоли и наличием регионарных метастазов). Результаты представлены на рисунке 15.



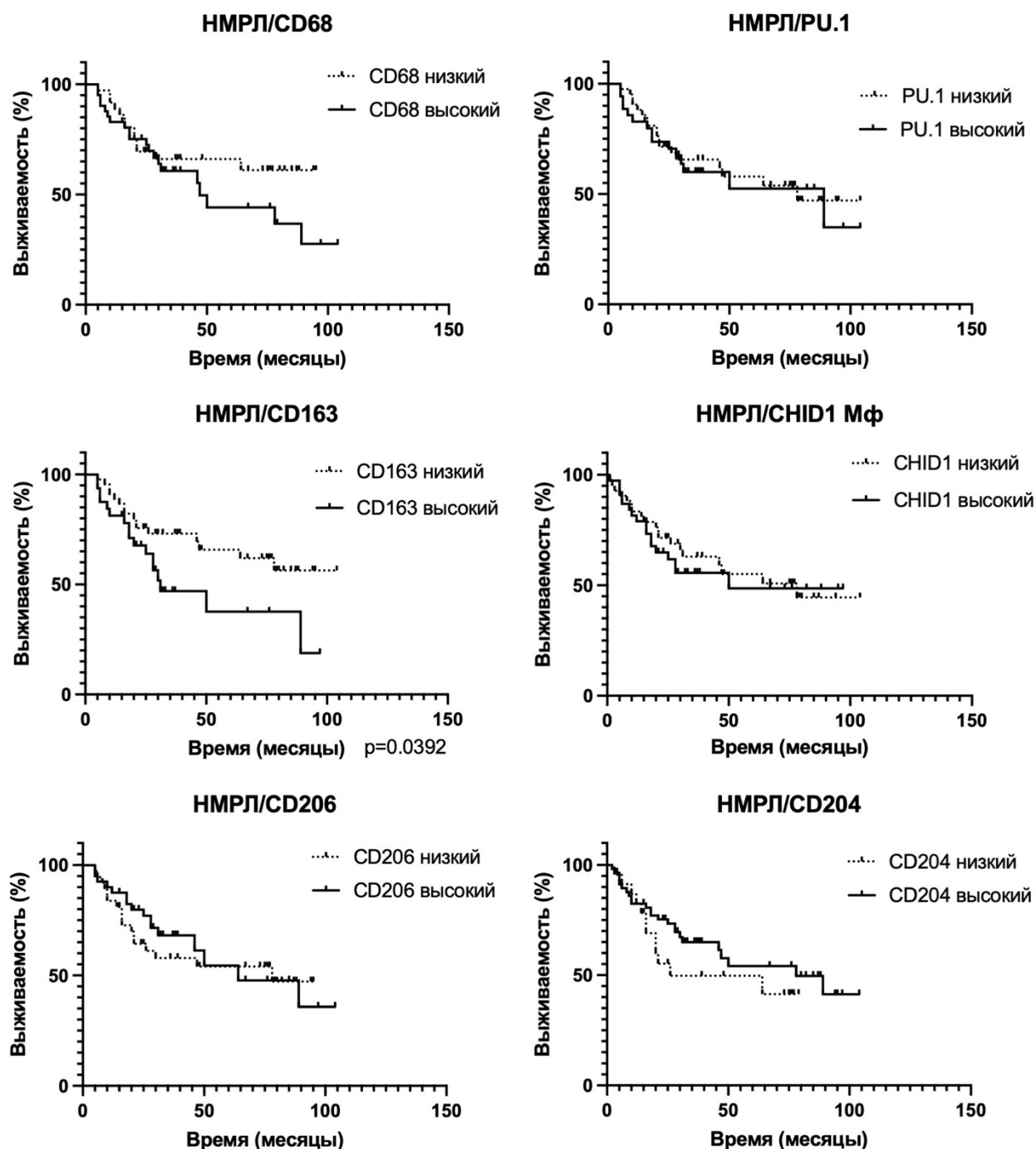
**Рисунок 14** - Пример ИГХ окрашивания образцов НМРЛ с помощью антител к CD68, PU.1, CD163, CD206, CD204 и CHID1 (400x)



**Рисунок 15** - Анализ содержания CD68, PU.1, CD163, CD206, CD204 и CHID1 положительных клеток в строме опухолей НМРЛ в зависимости от клинично-морфологических характеристик

Показано отсутствие связи общего числа макрофагов, ассоциированных с опухолью, с клинико-морфологическими характеристиками НМРЛ, за исключением CD204+, содержание которых ассоциировано с дифференцировкой опухоли, а именно, высокодифференцированные опухоли достоверно чаще содержали большее количество CD204+ клеток по сравнению с низкодифференцированными.

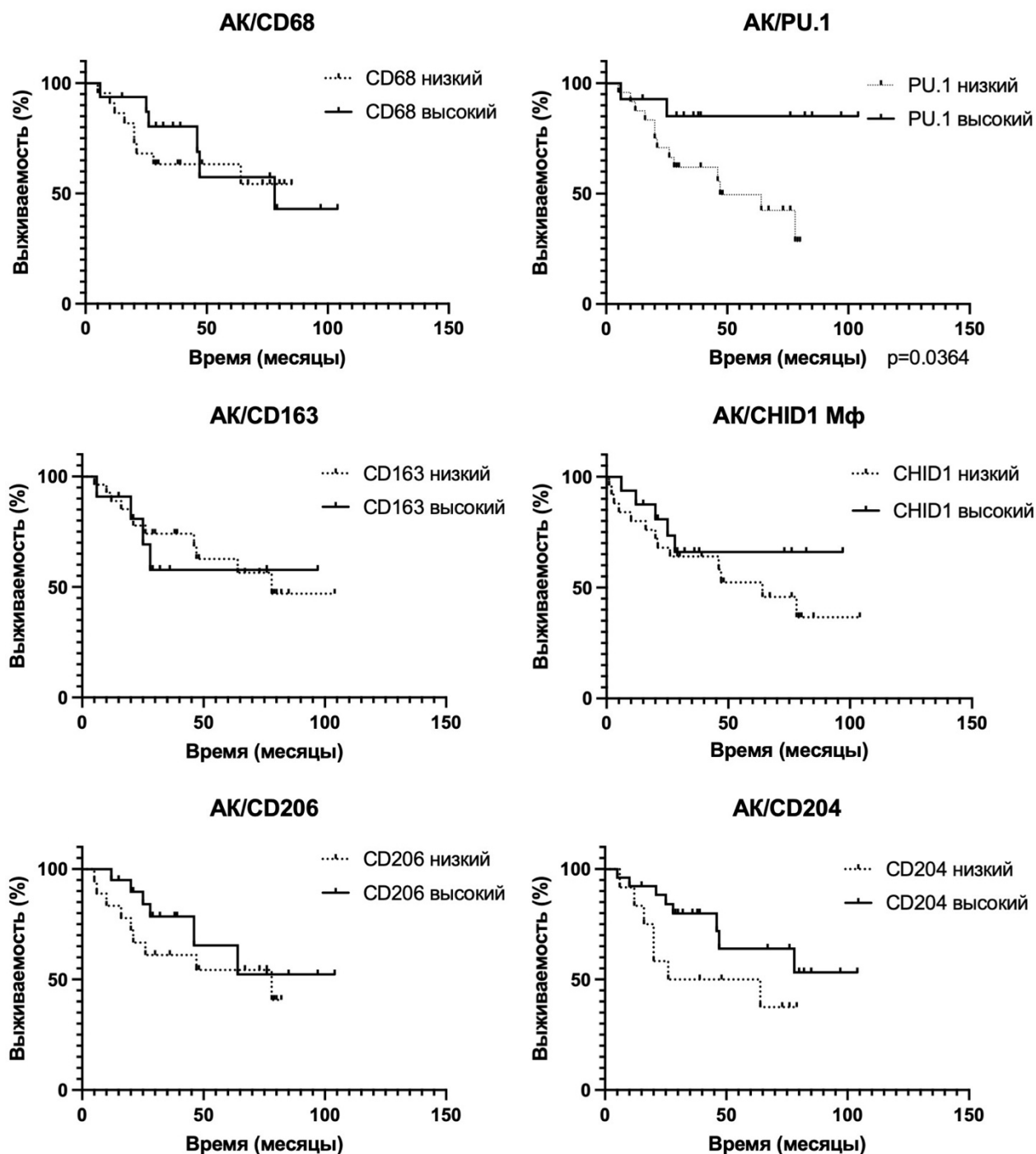
На следующем этапе работы проведен анализ прогностической значимости представленности макрофагов различных фенотипов в опухолях легкого (Рисунок 16).



**Рисунок 16** - Общая выживаемость больных НМРЛ в зависимости от количества CD68+, PU.1+, CD163+, CD206+, CD204+ и CHID1+ клеток в опухолях НМРЛ

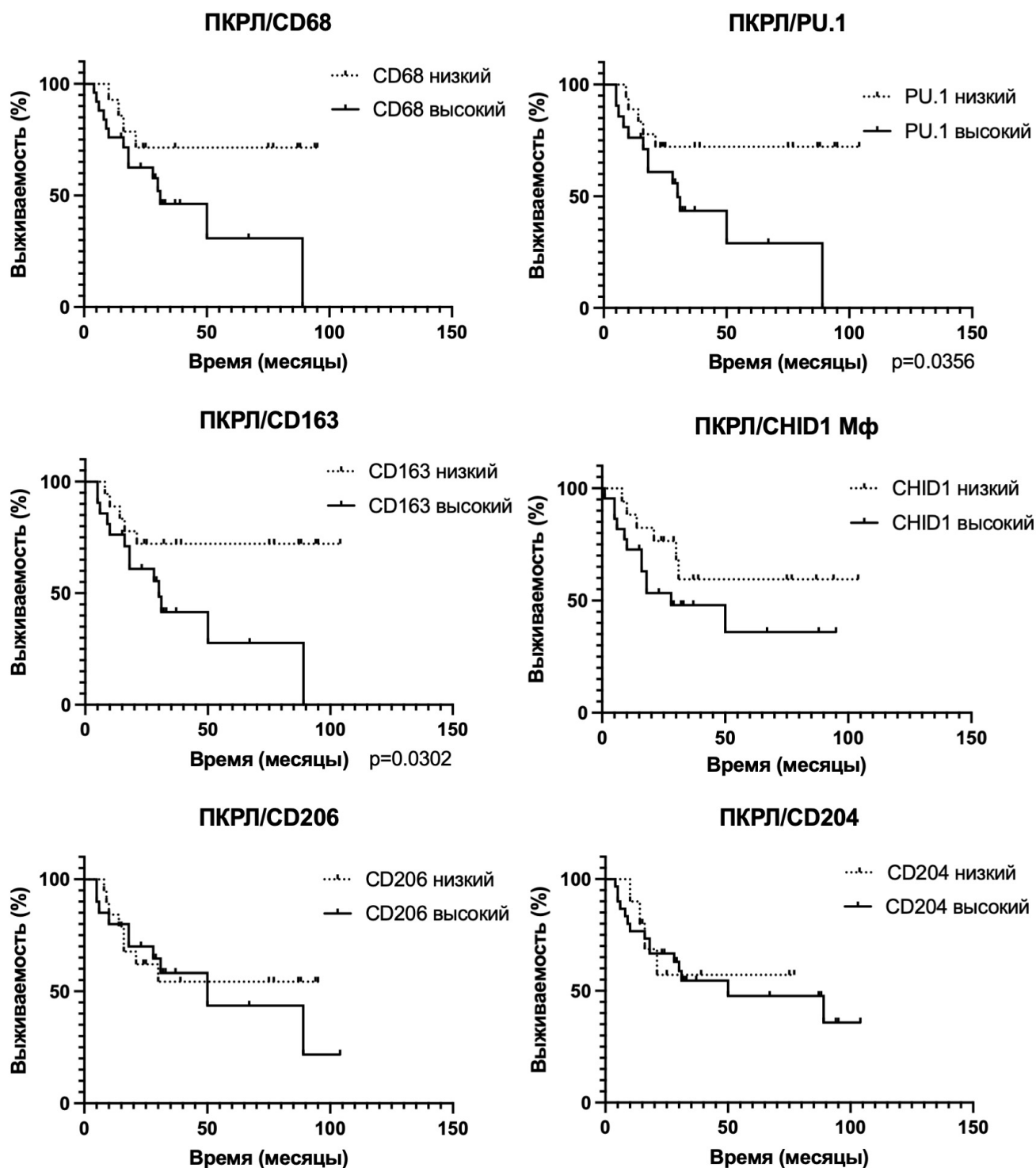


Анализ выживаемости был проведен в целом для всей исследуемой выборки, а также отдельно для каждого гистологического типа опухолей и в зависимости от стадии заболевания. Результаты проведенного исследования представлены на рисунке 17 и 18 и в таблице 9.



**Рисунок 17** - Общая выживаемость больных аденокарциномой легкого в зависимости от количества CD68+, PU.1+, CD163+, CD206+, CD204+ и CHID1+ клеток в опухолях

Анализ выживаемости показал, что высокое содержание CD163+ макрофагов является фактором неблагоприятного прогноза как для плоскоклеточного НМРЛ (HR=2,908; p=0.0302), так и для НМРЛ в целом (HR=1,997; p=0.0392).



**Рисунок 18** - Общая выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого в зависимости от количества CD68+, PU.1+, CD163+, CD206+, CD204+ и CHID1+ клеток в опухолях

Большое количество CD204+ клеток, наоборот, оказалось фактором хорошего прогноза на ранних стадиях заболевания (HR=0,257;  $p=0.0451$ ). Анализ CD68 и CD206 не выявил их прогностической значимости для НМРЛ. Мы установили, что в целом для опухолей НМРЛ PU.1 не является прогностическим маркером. Однако анализ с учетом гистологического типа опухоли

показал, что высокое содержание PU.1+ клеток в опухоли является фактором благоприятного прогноза для аденокарцином (HR=0,235; p=0,0364), в то время как для плоскоклеточных опухолей высокое содержание PU.1+ клеток является фактором плохого прогноза (HR=2,823; p=0.0356).

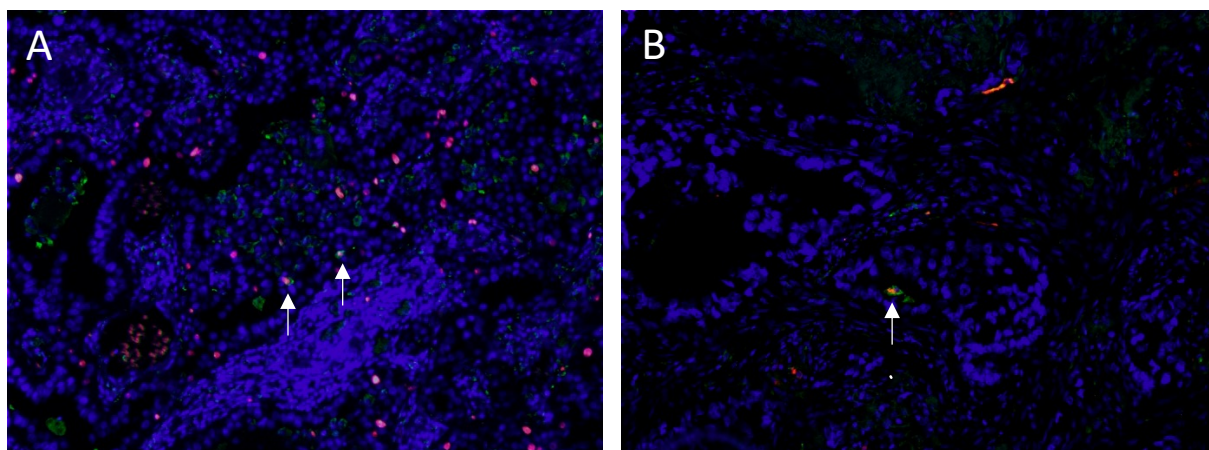
**Таблица 9** – Статистический анализ прогностической значимости CD68+, PU.1+, CD163+, CD206+, CD204+ и CHID1+ клеток в опухолях НМРЛ

Маркер	Однофакторный анализ		
	ОР	95% ДИ	<i>p</i>
CD68/НМРЛ (высокий/низкий)	1,478	(0,747 – 2,924)	0,2644
CD68/АК (высокий/низкий)	0,806	(0,292 – 2,227)	0,6800
CD68/ПКРЛ (высокий/низкий)	2,648	(1,042 – 6,731)	0,0680
CD68/I-II стадия (высокий/низкий)	1,067	(0,327 – 3,486)	0,9146
CD68/III-IV стадия (высокий/низкий)	1,939	(0,839 – 4,477)	0,1199
PU.1/НМРЛ (высокий/низкий)	1,108	(0,556 – 2,208)	0,7665
PU.1/АК (высокий/низкий)	0,235	(0,084 – 0,662)	0,0364*
PU.1/ПКРЛ (высокий/низкий)	2,823	(1,120 – 7,118)	0,0356*
PU.1/I-II стадия (высокий/низкий)	0,798	(0,245 – 2,604)	0,7073
PU.1/III-IV стадия (высокий/низкий)	1,669	(0,688 – 4,051)	0,2167
CD163/НМРЛ (высокий/низкий)	1,997	(0,975 – 4,088)	0,0392*
CD163/АК (высокий/низкий)	1,177	(0,357 – 3,875)	0,7776
CD163/ПКРЛ (высокий/низкий)	2,908	(1,153 – 7,337)	0,0302*
CD163/I-II стадия (высокий/низкий)	2,943	(0,867 – 9,991)	0,0688
CD163/III-IV стадия (высокий/низкий)	1,762	(0,720 – 4,313)	0,1644
CD206/НМРЛ (высокий/низкий)	0,857	(0,433 – 1,697)	0,6521
CD206/АК (высокий/низкий)	0,626	(0,227 – 1,723)	0,3634
CD206/ПКРЛ (высокий/низкий)	1,148	(0,456 – 2,896)	0,7675
CD206/I-II стадия (высокий/низкий)	1,205	(0,362 – 4,010)	0,7646
CD206/III-IV стадия (высокий/низкий)	0,915	(0,393 – 2,127)	0,8335
CD204/НМРЛ (высокий/низкий)	0,684	(0,323 – 1,447)	0,2579
CD204/АК (высокий/низкий)	0,454	(0,148 – 1,394)	0,1143
CD204/ПКРЛ (высокий/низкий)	1,090	(0,371 – 3,198)	0,8761
CD204/I-II стадия (высокий/низкий)	0,257	(0,068 – 0,971)	0,0451*
CD204/III-IV стадия (высокий/низкий)	0,855	(0,326 – 2,239)	0,7314

CHID1 Мф/НМРЛ (высокий/низкий)	1,151	(0,596 – 2,223)	0,6708
CHID1 Мф/АК (высокий/низкий)	0,629	(0,243 – 1,632)	0,3719
CHID1 Мф/ПКРЛ (высокий/низкий)	1,939	(0,769 - 4,885)	0,1733
CHID1 Мф/I-II стадия (высокий/низкий)	1,388	(0,448 - 4,303)	0,5737
CHID1 Мф/III-IV стадия (высокий/низкий)	1,270	(0,552 - 2,922)	0,5480

\*Статистически значимо

Далее проведен анализ макрофагов смешанного фенотипа (M1/M2) и пролиферирующих макрофагов в образцах НМРЛ. Для определения макрофагов смешанного фенотипа мы использовали комбинации маркеров макрофагов M1 и M2, а именно iNOS (красный) для M1 и CD163 (зеленый) для M2 (Рисунок 19А). Для анализа пролиферирующих макрофагов использовали комбинацию маркеров CD68 (зеленый) и Ki-67 (красный) (Рисунок 19В).

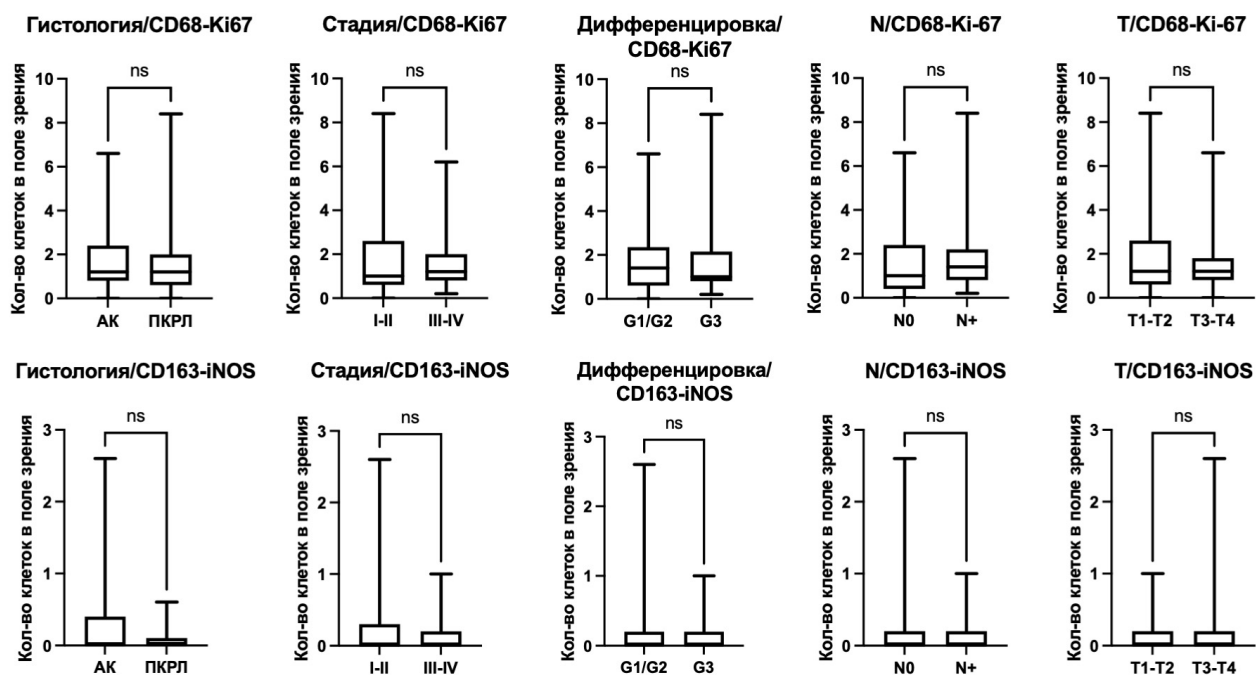


**Рисунок 19** - Иммунофлуоресцентный анализ макрофагов смешанного фенотипа и пролиферирующих макрофагов в образцах НМРЛ. Стрелками отмечены пролиферирующие макрофаги и макрофаги смешанного фенотипа

Макрофаги, экспрессирующие Ki-67, были выявлены в 98% образцов, в то время как макрофаги смешанного фенотипа выявлены только в 31% случаев. Среднее содержание пролиферирующих макрофагов составило 1,73 клетки на поле зрения, в то время как среднее содержание макрофагов смешанного фенотипа составило 0,15 клетки на поле зрения.

Далее проведен анализ ассоциации количества пролиферирующих макрофагов и макрофагов смешанного фенотипа с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Результаты представлены на рисунке 20.



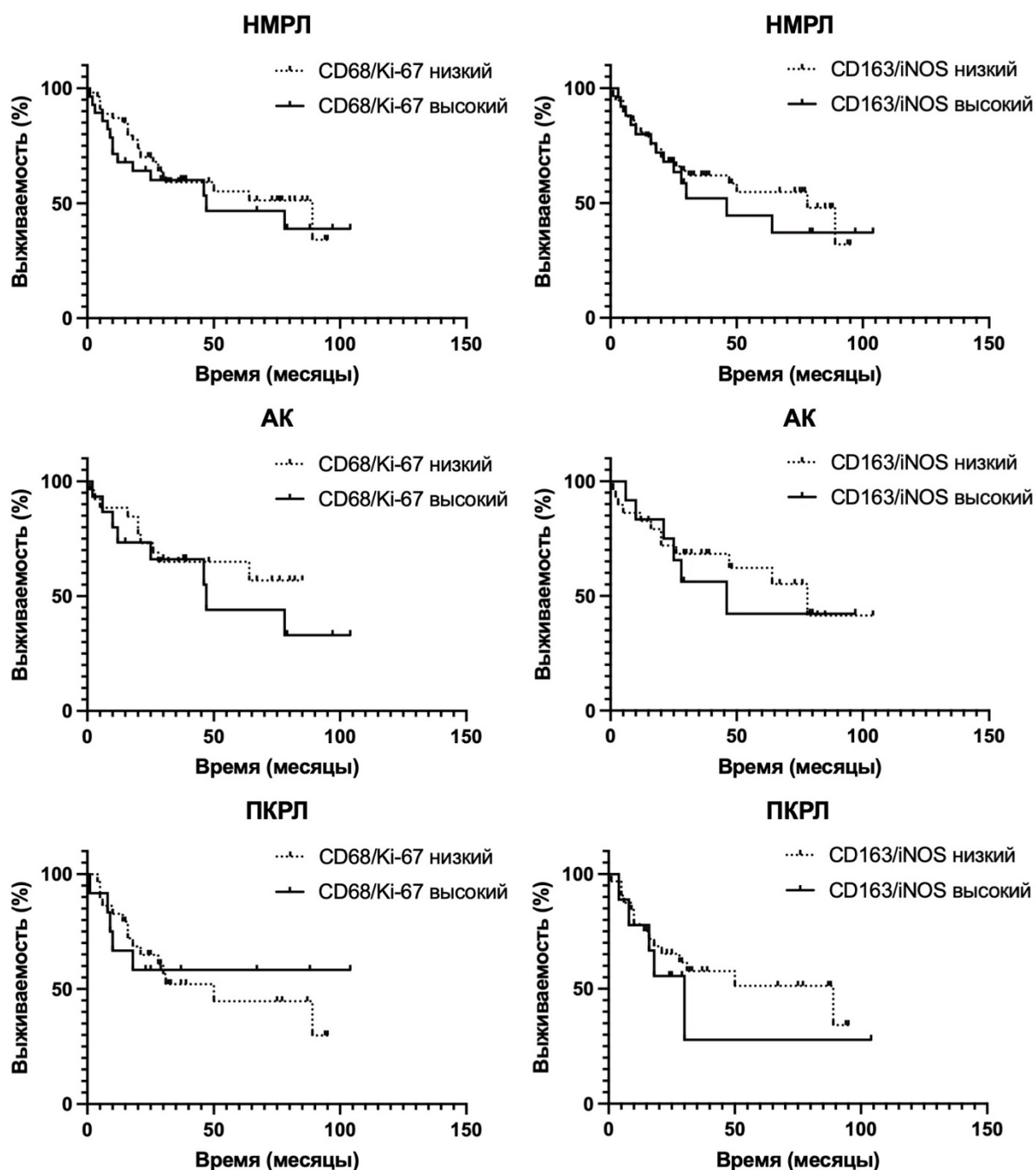


**Рисунок 20** - Анализ ассоциаций количества пролиферирующих макрофагов и макрофагов смешанного фенотипа с клинко-морфологическими характеристиками

Проведенный анализ показал отсутствие ассоциации количества пролиферирующих макрофагов с клинко-морфологическими характеристиками опухоли. Для макрофагов смешанного фенотипа также не обнаружено статистически значимых ассоциаций. Однако стоит отметить, что наблюдалась тенденция к более высокому содержанию CD163+/iNOS+ макрофагов, то есть макрофагов смешанного фенотипа, в аденокарциномах по сравнению с образцами плоскоклеточного рака легкого.

Далее был проведен анализ прогностической значимости данных фенотипов макрофагов при НМРЛ. Результаты представлены на рисунке 21.

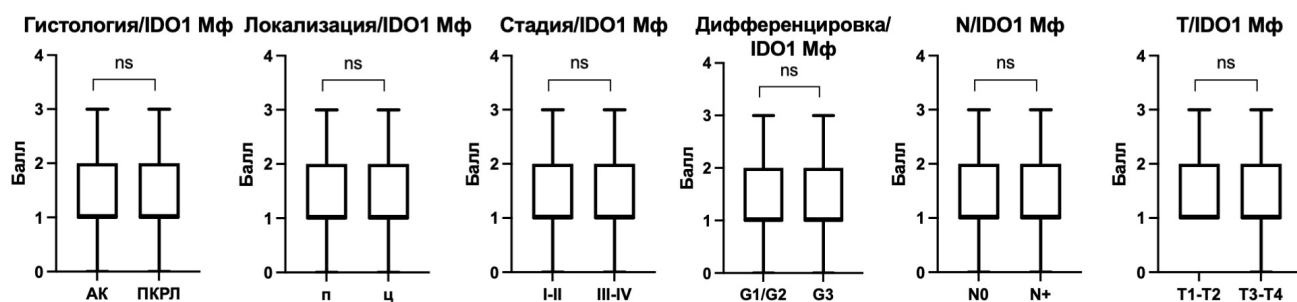
Проведенный анализ показал отсутствие прогностической значимости пролиферирующих макрофагов и макрофагов смешанного фенотипа. Однако стоит отметить, что высокое их содержание имело тенденцию к неблагоприятному прогнозу заболевания.



**Рисунок 21** - Общая выживаемость больных НМРЛ в зависимости от количества пролиферирующих макрофагов и макрофагов смешанного фенотипа в опухолях НМРЛ

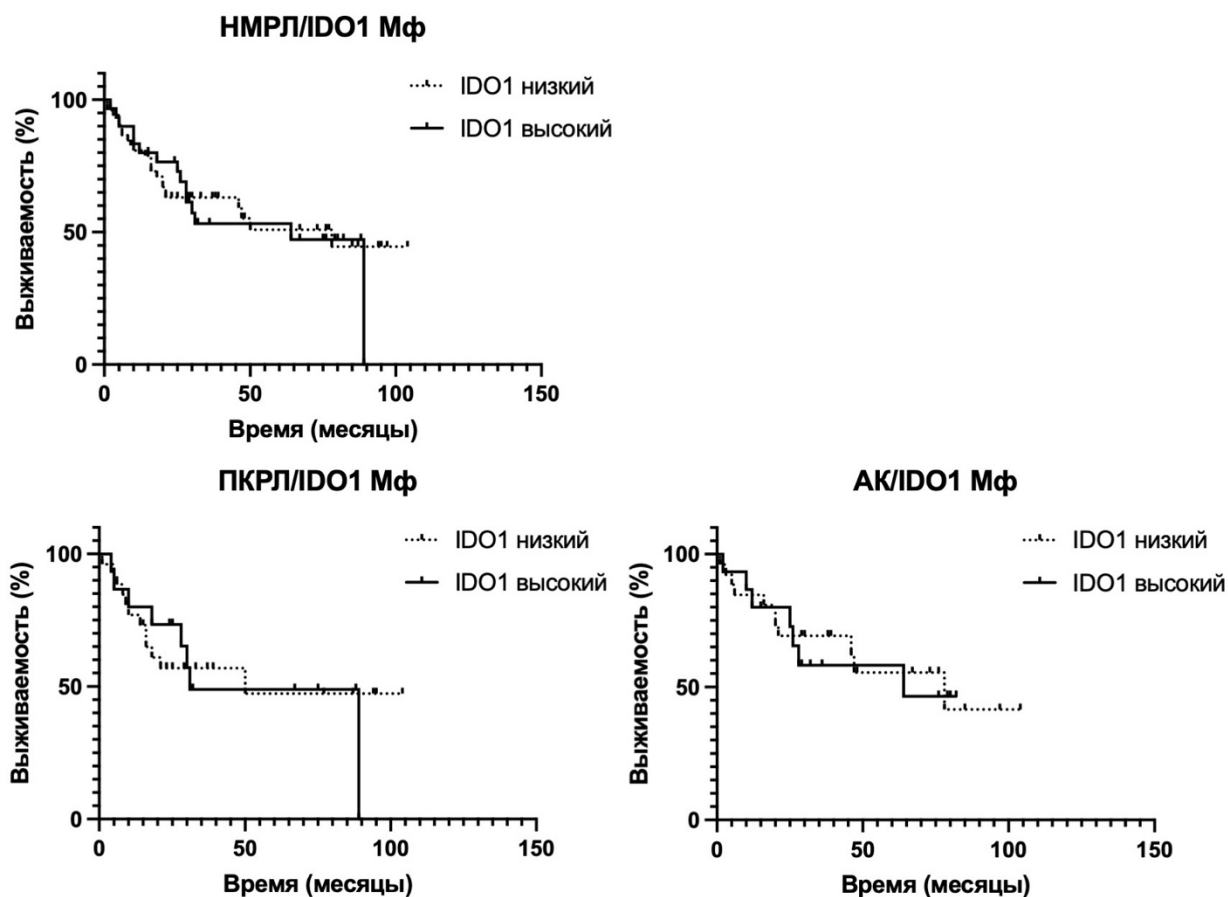
На заключительном этапе данной части исследования проведен анализ содержания в строме опухоли цитотоксических (M1) макрофагов. Для их выявления использовали маркеры iNOS, IDO1 и TNF $\alpha$ . Однако оказалось, что часть маркеров M1 (iNOS и IDO1), а также некоторых маркеров M2 (CHID1, PD-L1) экспрессируются опухолевыми клетками НМРЛ. Оказалось, что только единичные образцы содержали iNOS<sup>+</sup> стромальные клетки их количество было недостаточным для статистического анализа. IDO1 экспрессируется в стромальных клетках

опухоли в 95% исследованных образцов. Анализ ассоциации экспрессии данного маркера в строме с клиничко морфологическими характеристиками представлен на рисунке 22.



**Рисунок 22** - Анализ ассоциации экспрессии IDO1 в строме опухолей НМРЛ с клиничко-морфологическими характеристиками

Далее провели анализ прогностической значимости экспрессии IDO1 в строме опухолей НМРЛ. Результаты представлены на рисунке 23 в таблице 10.



**Рисунок 23** – Прогностическая значимость IDO1+ клеток в строме опухоли

Проведенный анализ выявил отсутствие значимых ассоциаций содержания IDO1 положительных клеток в строме с клиническими характеристиками и прогнозом заболевания.

**Таблица 10** - Статистический анализ прогностической значимости IDO1 в строме опухолей НМРЛ

Маркер	Однофакторный анализ		
	ОР	95% ДИ	<i>p</i>
IDO1/НМРЛ (высокий/низкий)	1,098	(0,569 - 2,119)	0,7768
IDO1/АК (высокий/низкий)	1,089	(0,418 - 2,837)	0,8355
IDO1/ПКРЛ (высокий/низкий)	1,066	(0,433 - 2,623)	0,8883
IDO1/I-II стадия (высокий/низкий)	1,335	(0,425 - 4,188)	0,6143
IDO1/III-IV стадия (высокий/низкий)	1,088	(0,479 - 2,469)	0,8345

### 3.1.3 Клиническая и прогностическая значимость маркеров макрофагов, экспрессирующихся в опухолевых клетках НМРЛ

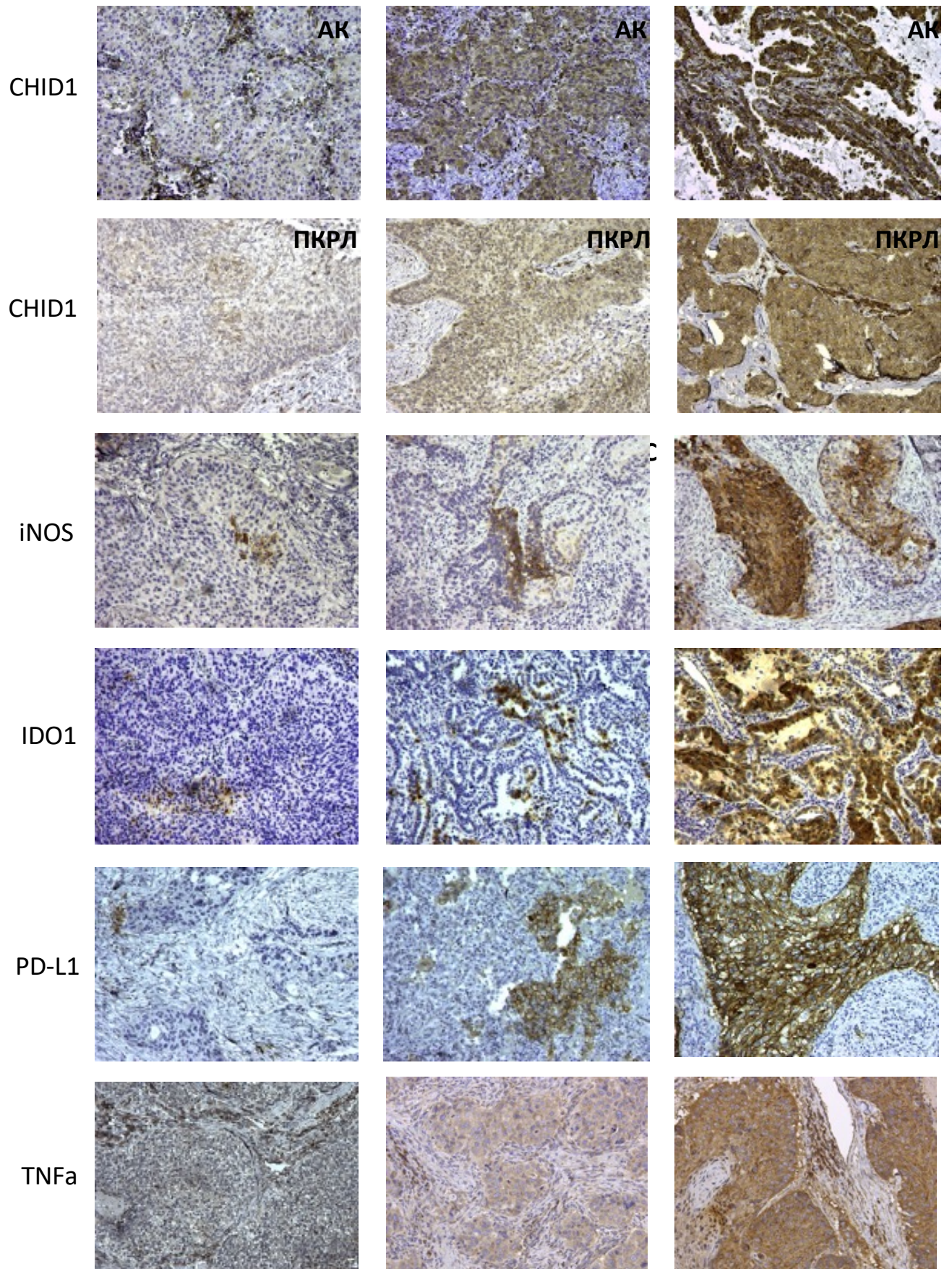
Проведенный ранее анализ показал, что некоторые маркеры макрофагов экспрессируются непосредственно в опухолевых клетках НМРЛ. Так, iNOS (синтаза оксида азота, ответственная за продукцию NO) была обнаружена в цитоплазме опухолевых клеток в 75% образцов; IDO1 (фермент, участвующий в катаболизме триптофана, и, как следствие, в подавление ряда функций клеток иммунной системы) экспрессировался в опухолевых клетках в 60% образцов. Примеры окрашивания приведены на рисунке 24.

В то же время цитоплазматическая экспрессия CHID1 в опухолевых клетках наблюдалась во всех исследованных образцах. Также проведен анализ экспрессии PD-L1 в исследованных образцах. Экспрессия TNF $\alpha$  в опухолевых клетках, как и в случае с CHID1, наблюдалась в 100% исследованных образцов. Именно поэтому для дальнейшего статистического анализа в случае CHID1 и TNF $\alpha$  проводили оценку интенсивности окрашивания, а не количества положительных опухолевых клеток, экспрессирующих данные маркеры.

Далее был проведен анализ ассоциации экспрессии исследованных маркеров в опухолевых клетках с основными клинико-морфологическими характеристиками.

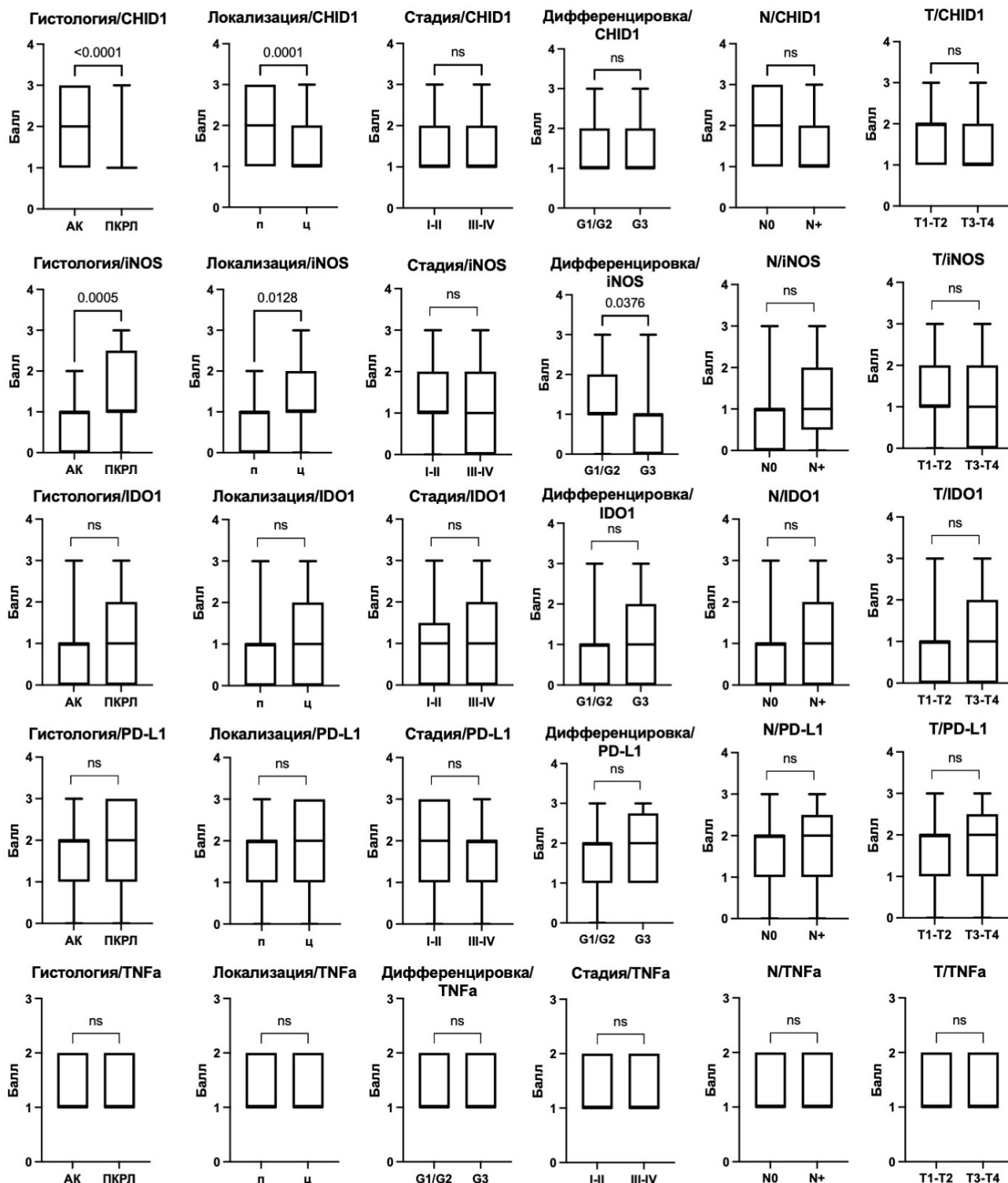
Показано, что повышенная экспрессия iNOS коррелирует с гистологическим типом опухоли и ее локализацией, а именно, в образцах плоскоклеточного рака и при центральной локализации наблюдалась повышенная экспрессия данного белка ( $p < 0,0001$  и  $p = 0,0001$  соответственно). Повышенная экспрессия iNOS также коррелировала с дифференцировкой опухоли, а именно, в высокодифференцированных опухолях наблюдалась высокая экспрессия iNOS, что лишний раз свидетельствует о том, что высокая дифференцировка является благоприятным прогностическим фактором НМРЛ.





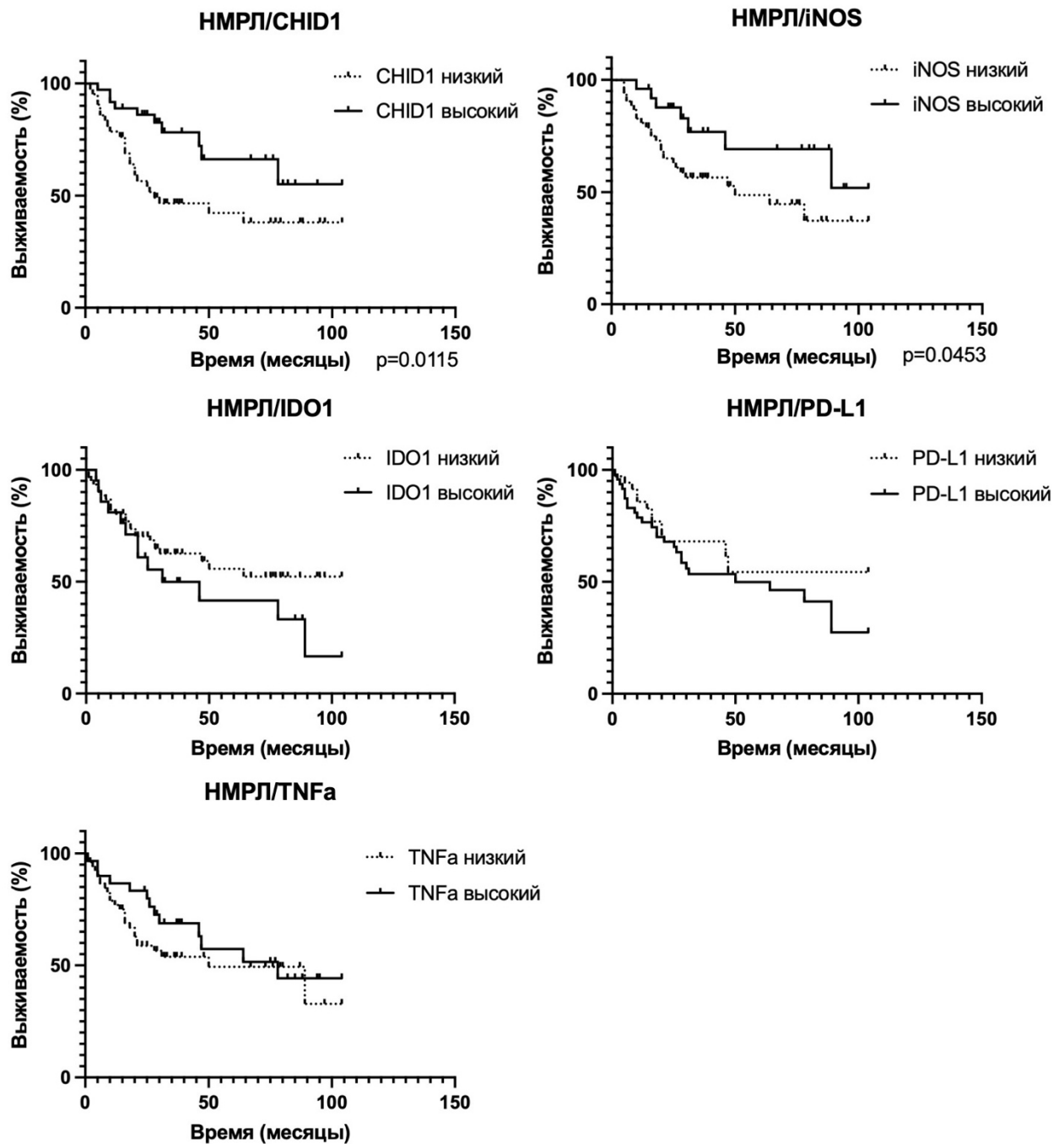
**Рисунок 24** - Пример ИГХ окрашивания образцов НМРЛ с помощью антител к CHID1, iNOS, IDO1, PD-L1 и TNFα (100x)

Анализ экспрессии CHID1 в опухолевых клетках показал значимую корреляцию между уровнем его экспрессии и гистологическим типом опухоли, а также ее локализацией. Для остальных исследованных маркеров ассоциации с клиническими характеристиками выявлено не было. Результаты представлены на рисунке 25.



**Рисунок 25** - Анализ экспрессии CHID1, iNOS, IDO1, PD-L1 и TNFα в опухолевых клетках НМРЛ в зависимости от клиничко-морфологических характеристик

Далее проанализирована прогностическая значимость экспрессии CHID1, iNOS, IDO1, PD-L1 и TNF $\alpha$  в опухолях НМРЛ. Результаты представлены на рисунках 26-28.

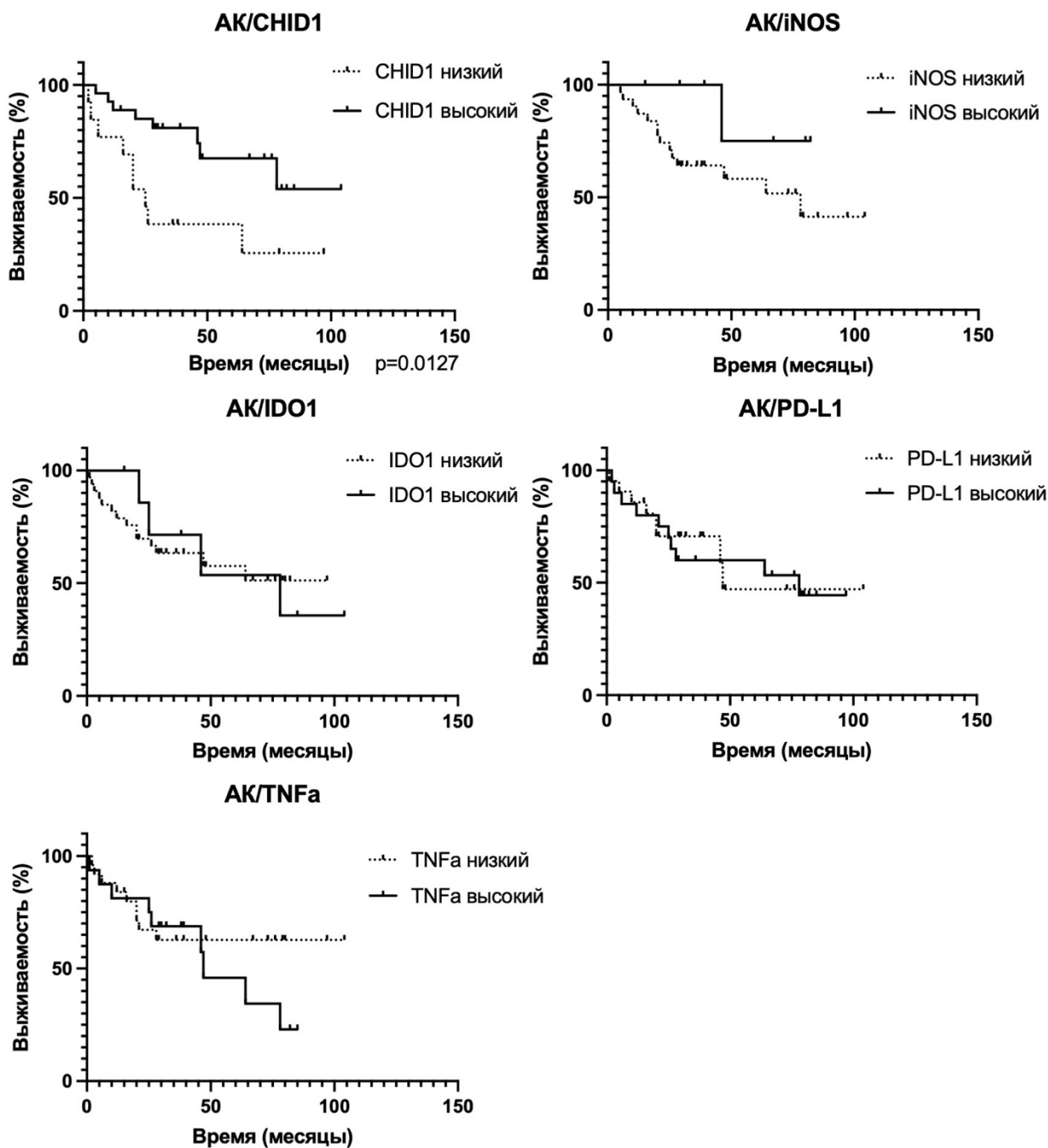


**Рисунок 26** - Общая выживаемость больных НМРЛ в зависимости от экспрессии CHID1, iNOS, IDO1, PD-L1 и TNF $\alpha$  в опухолевых клетках НМРЛ

Показано, что высокая экспрессия iNOS является маркером благоприятного прогноза, как для плоскоклеточного варианта опухоли (HR=0,394; p=0,0456), так и для НМРЛ в целом (HR=0,441; p=0,0453). Также необходимо отметить прогностическую значимость iNOS в зависимости от стадии заболевания. Для ранних стадий экспрессия iNOS не является



прогностическим фактором, в то время как для поздних стадий высокая экспрессия iNOS также является благоприятным прогностическим фактором ( $HR=0,0361$ ;  $p=0,0361$ ).

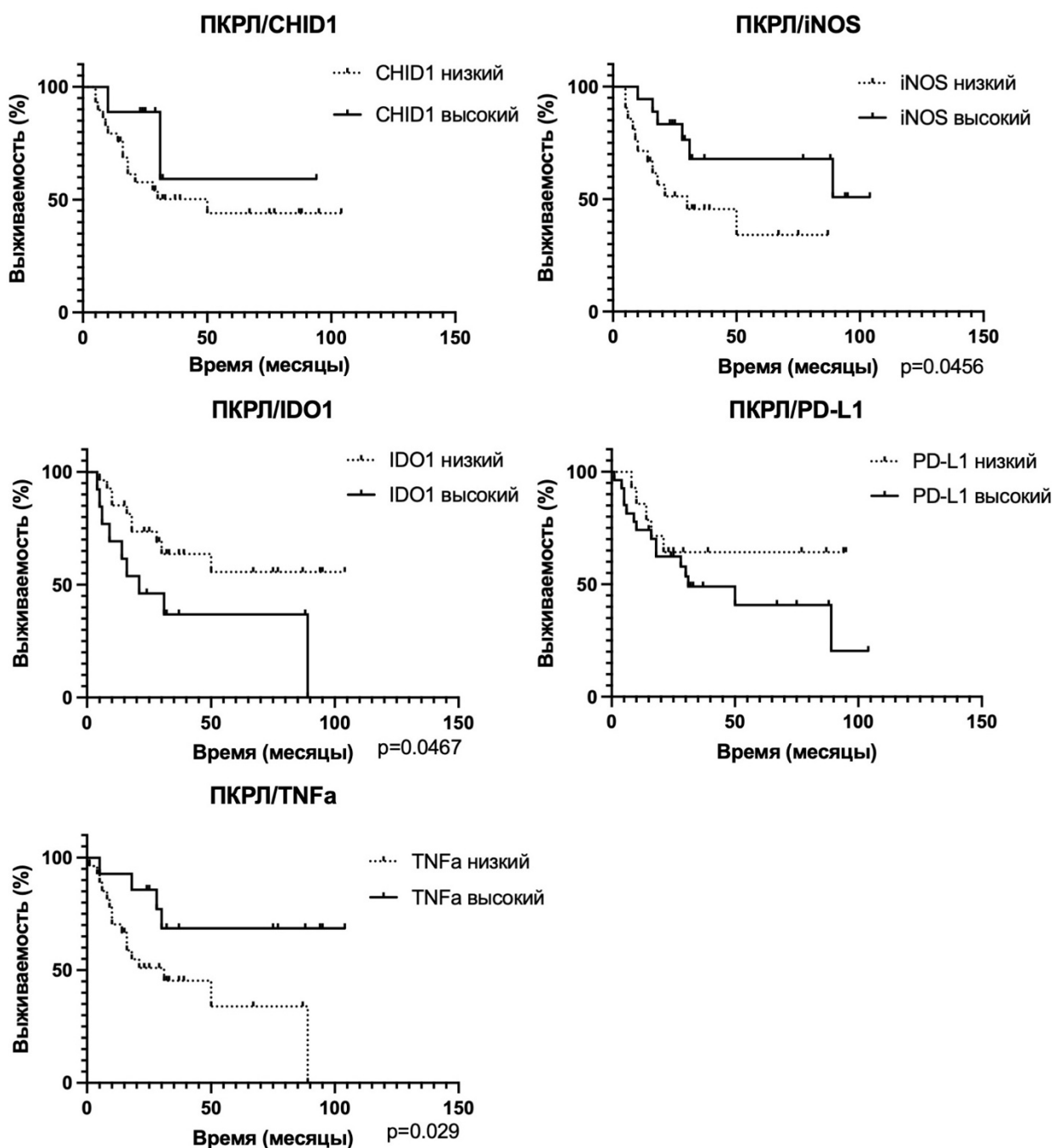


**Рисунок 27** - Общая выживаемость больных аденокарциномой легкого в зависимости от экспрессии CHID1, iNOS, IDO1, PD-L1 и TNFα в опухолевых клетках

Кроме того, впервые показано, что экспрессия CHID1 в опухолевых клетках является фактором благоприятного прогноза как для аденокарцином легкого ( $HR=0,319$ ;  $p=0,0127$ ), так для опухолей НМРЛ в целом ( $HR=0,402$ ;  $p=0,0115$ ). Также необходимо отметить, что CHID1 является фактором благоприятного прогноза на ранних стадиях заболевания ( $HR=0,211$ ;  $p=0,0264$ ). Дальнейший анализ прогностической значимости экспрессии исследуемых маркеров



выявил, что высокий уровень экспрессии IDO1 опухолевыми клетками является фактором неблагоприятного прогноза при плоскоклеточном раке легкого (HR=2,405; p=0,0467), что соответствует его иммуносупрессорным характеристикам.



**Рисунок 28** - Общая выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого в зависимости от экспрессии CHID1, iNOS, IDO1, PD-L1 и TNFα в опухолевых клетках

Также необходимо отметить, что высокий уровень экспрессии TNFα опухолевыми клетками является благоприятным прогностическим фактором для плоскоклеточного рака легкого (HR=0,342; p=0,0290), но не аденокарцином. Статистический анализ прогностической значимости представлен в таблице 11.

**Таблица 11** - Статистический анализ прогностической значимости CHID1, iNOS, IDO1, PD-L1 и TNFa в опухолях НМРЛ

Маркер	Однофакторный анализ		
	ОР	95% ДИ	<i>p</i>
CHID1/НМРЛ (высокий/низкий)	0,402	(0,205 - 0,787)	0,0115*
CHID1/АК (высокий/низкий)	0,319	(0,109 - 0,939)	0,0127*
CHID1/ПКРЛ (высокий/низкий)	0,408	(0,135 - 1,229)	0,2110
CHID1/I-II стадия (высокий/низкий)	0,211	(0,068 - 0,655)	0,0264*
CHID1/III-IV стадия (высокий/низкий)	0,491	(0,212 - 1,134)	0,0939
iNOS/НМРЛ (высокий/низкий)	0,441	(0,219 - 0,893)	0,0453*
iNOS /АК (высокий/низкий)	0,263	(0,076 - 0,902)	0,1623
iNOS /ПКРЛ (высокий/низкий)	0,394	(0,155 - 0,999)	0,0456*
iNOS /I-II стадия (высокий/низкий)	0,446	(0,127 - 1,564)	0,2855
iNOS /III-IV стадия (высокий/низкий)	0,376	(0,162 - 0,874)	0,0361*
IDO1/НМРЛ (высокий/низкий)	1,559	(0,748 - 3,249)	0,1866
IDO1/АК (высокий/низкий)	0,965	(0,321 - 2,900)	0,9494
IDO1/ПКРЛ (высокий/низкий)	2,405	(0,876 - 6,603)	0,0467*
IDO1/I-II стадия (высокий/низкий)	2,618	(0,659 - 10,40)	0,0864
IDO1/III-IV стадия (высокий/низкий)	1,132	(0,482 - 2,659)	0,7664
PD-L1/НМРЛ (высокий/низкий)	1,438	(0,756–2,734)	0,2811
PD-L1/АК (высокий/низкий)	1,042	(0,412–2,636)	0,9288
PD-L1/ПКРЛ (высокий/низкий)	1,734	(0,698–4,306)	0,2755
PD-L1/I-II стадия (высокий/низкий)	1,691	(0,521–5,496)	0,4209
PD-L1/III-IV стадия (высокий/низкий)	1,610	(0,746–3,472)	0,2255
TNFa/НМРЛ (высокий/низкий)	0,723	(0,379 - 1,377)	0,3354
TNFa /АК (высокий/низкий)	1,509	(0,587 - 3,877)	0,3775
TNFa /ПКРЛ (высокий/низкий)	0,324	(0,134 - 0,783)	0,0290*
TNFa /I-II стадия (высокий/низкий)	0,589	(0,181 - 1,911)	0,4206
TNFa /III-IV стадия (высокий/низкий)	0,651	(0,302 - 1,404)	0,2669

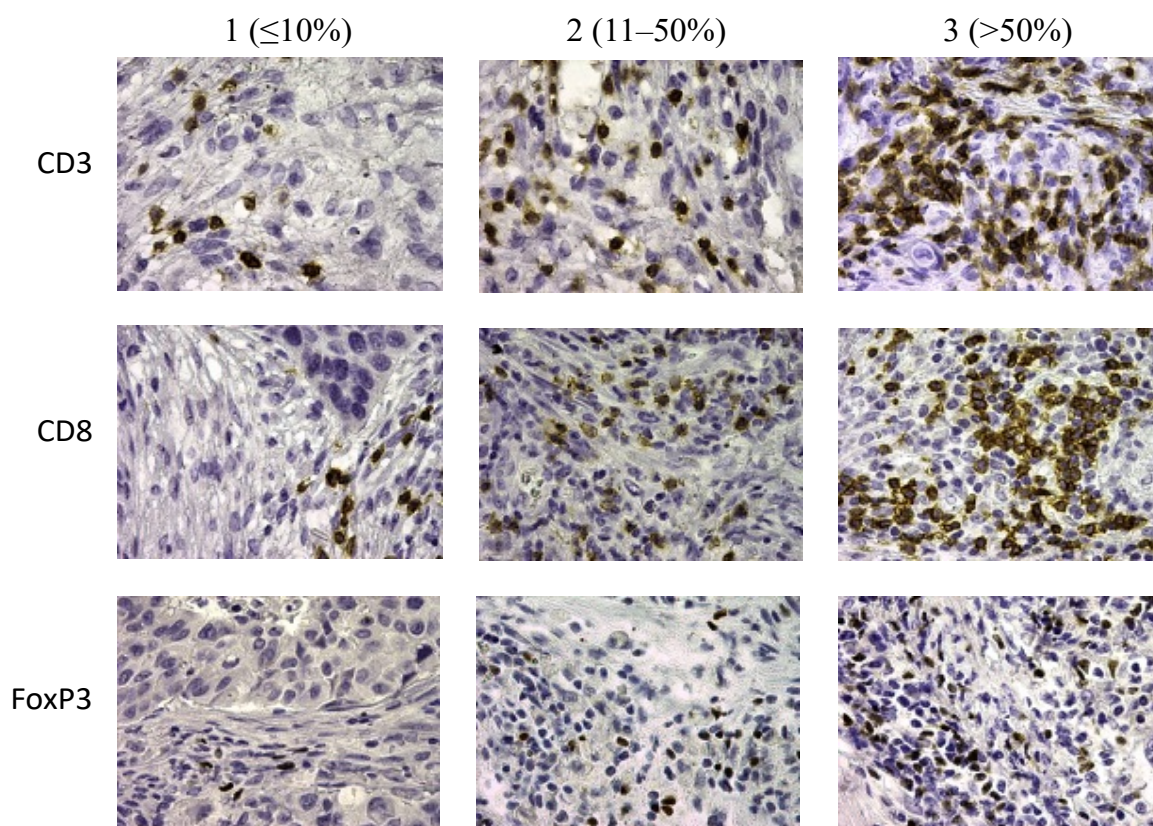
\*Статистически значимо

Известно, что выявление пациентов, имеющих негативный прогноз течения онкозаболевания, представляется крайне важным, так как своевременная регистрация признаков рецидивирования и метастазирования, а также применение более интенсивных методов лечения способны улучшить выживаемость таких пациентов. В настоящее время считается

общепринятым, что гистологическая форма опухоли и стадия заболевания являются основными прогностическими критериями течения РЛ. Однако знание клинико-патологических параметров не всегда позволяет сделать точный прогноз. Так, например, 15–20% больных с I стадией НМРЛ, имеющих в целом благоприятный прогноз, умирают в результате прогрессирования заболевания, несмотря на использование современных методов лечения. Не вызывает сомнения тот факт, что использование ряда биологических маркеров может существенно повысить точность индивидуального прогнозирования течения РЛ. Молекулярно-биологический прогноз должен строиться на основании особенностей фенотипа опухоли пациента в совокупности с биологическими характеристиками опухолевого очага.

### 3.1.4 Клиническая и прогностическая значимость Т- и В-клеток в опухолях НМРЛ

Помимо макрофагов, важную составляющую микроокружения опухоли играют и клетки приобретенного иммунитета. На следующем этапе работы проведен анализ содержания различных типов Т-клеток (цитотоксических и регуляторных), а также В-клеток, которым в последнее время начинают уделять внимание в контексте солидных опухолей. Примеры окрашиваний с использованием антител к маркерам Т- и В-клеток представлены на рисунке 29.

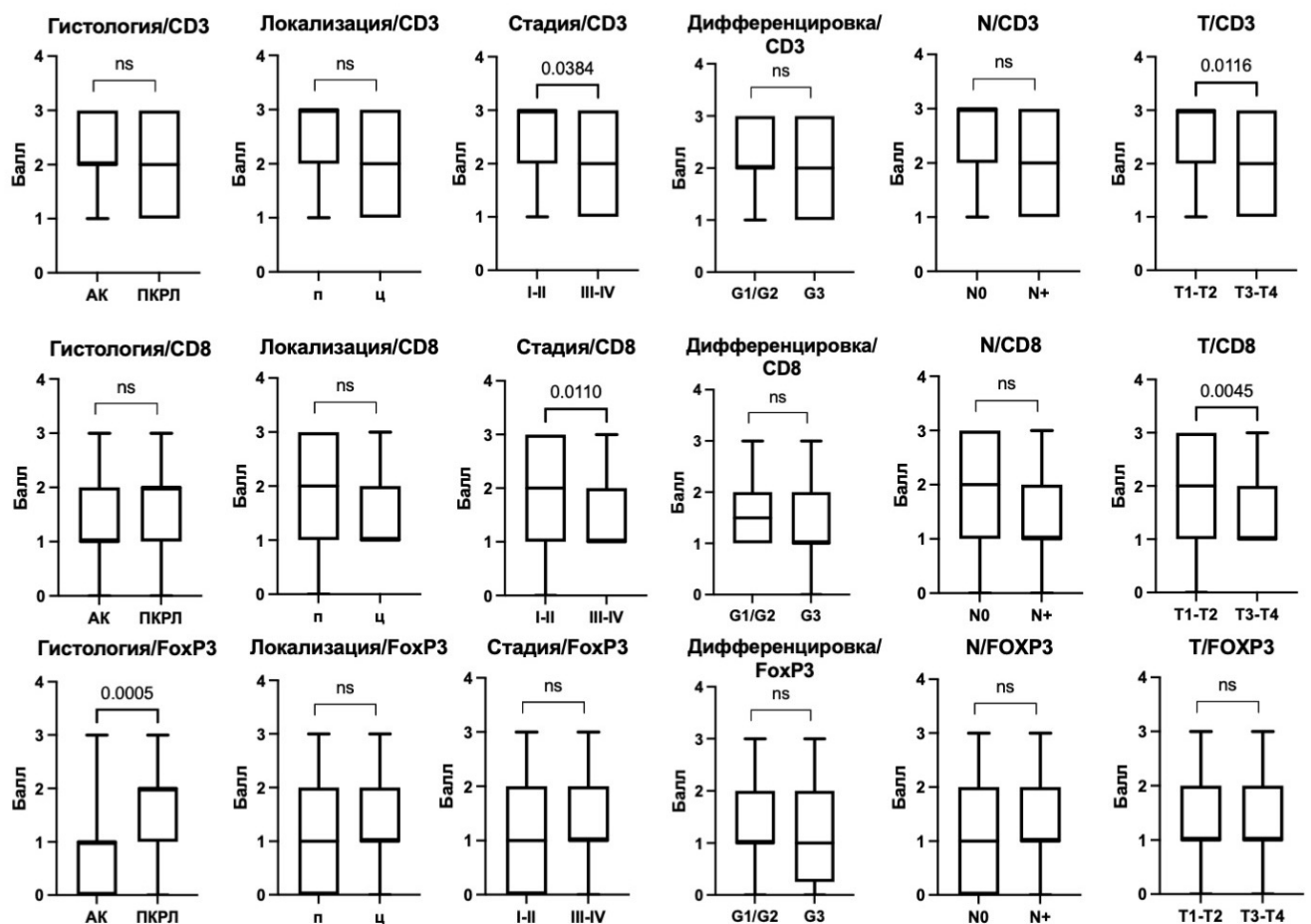


**Рисунок 29** - Пример ИГХ окрашивания образцов НМРЛ с помощью антител к CD3, CD8, и FoxP3 (400x)

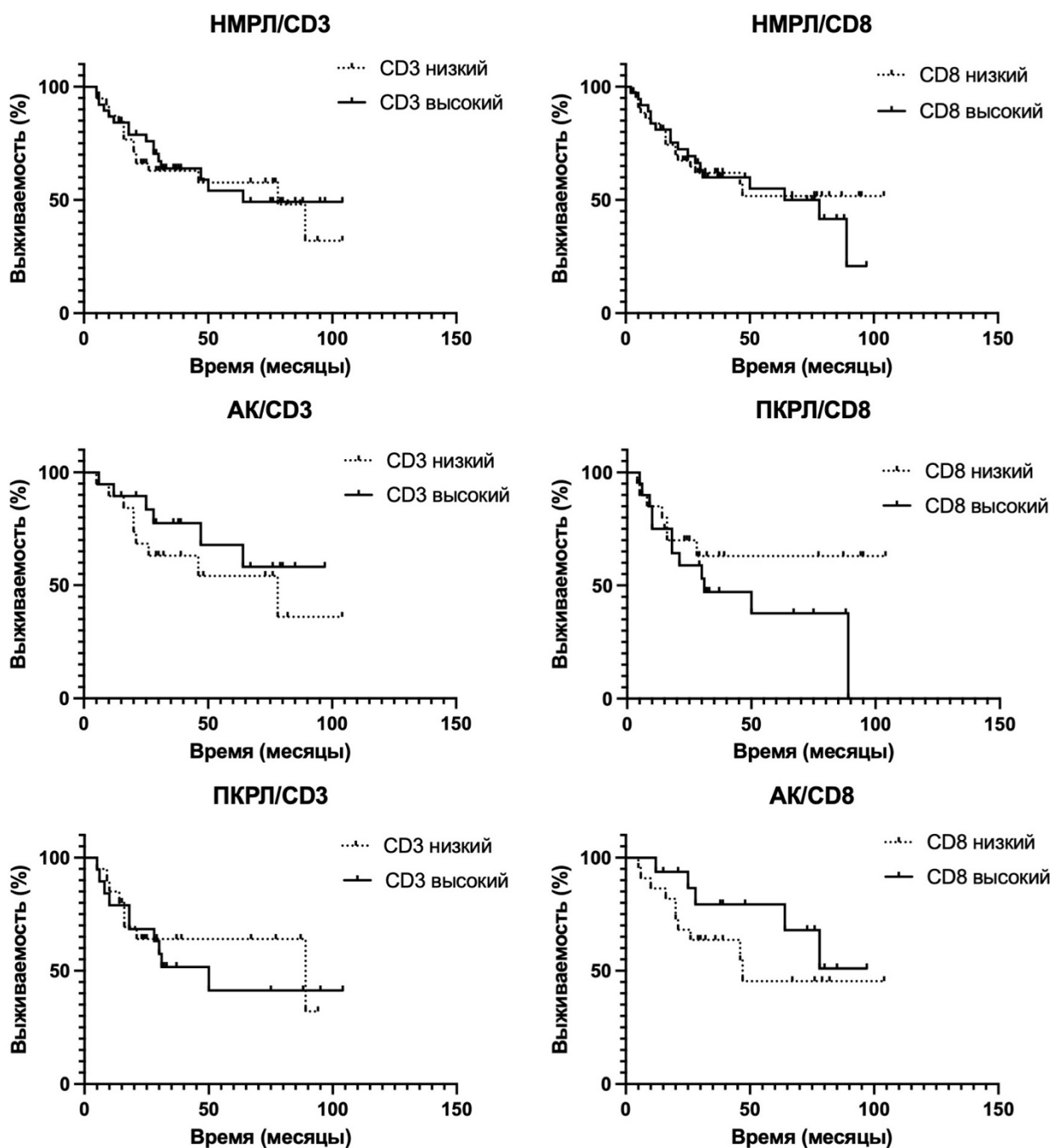
Для выявления Т-клеток были использованы маркеры CD3, CD8 и FoxP3. Для выявления В-клеток использовали CD20. CD3+ Т-клетки были выявлены в строме опухолей всех исследованных образцов, CD8+ Т-клетки - в 98% исследованных образцов. FoxP3+ Т-клетки были выявлены в 76% исследованных случаях. Клетки располагались как в строме опухолей, так и непосредственно инфильтрировали в опухолевые узлы.

Далее проведен анализ ассоциации содержания Т-клеток с клинико-морфологическими характеристиками опухолей. Выявлено, что повышенное содержание как Т-клеток в целом (CD3+), так и цитотоксических Т-клеток (CD8+) характерно для ранних стадий заболевания ( $p=0,0347$  и  $p=0,0343$  соответственно) и меньших размеров опухолей ( $p=0,0179$  и  $p=0,0184$  соответственно). Также показано, что содержание FoxP3+ клеток в строме опухолей значительно выше в образцах плоскоклеточного рака по сравнению с аденокарциномами.

Далее проведен анализ прогностической значимости Т-клеток в опухолях НМРЛ. Результаты представлены на рисунках 30-32.

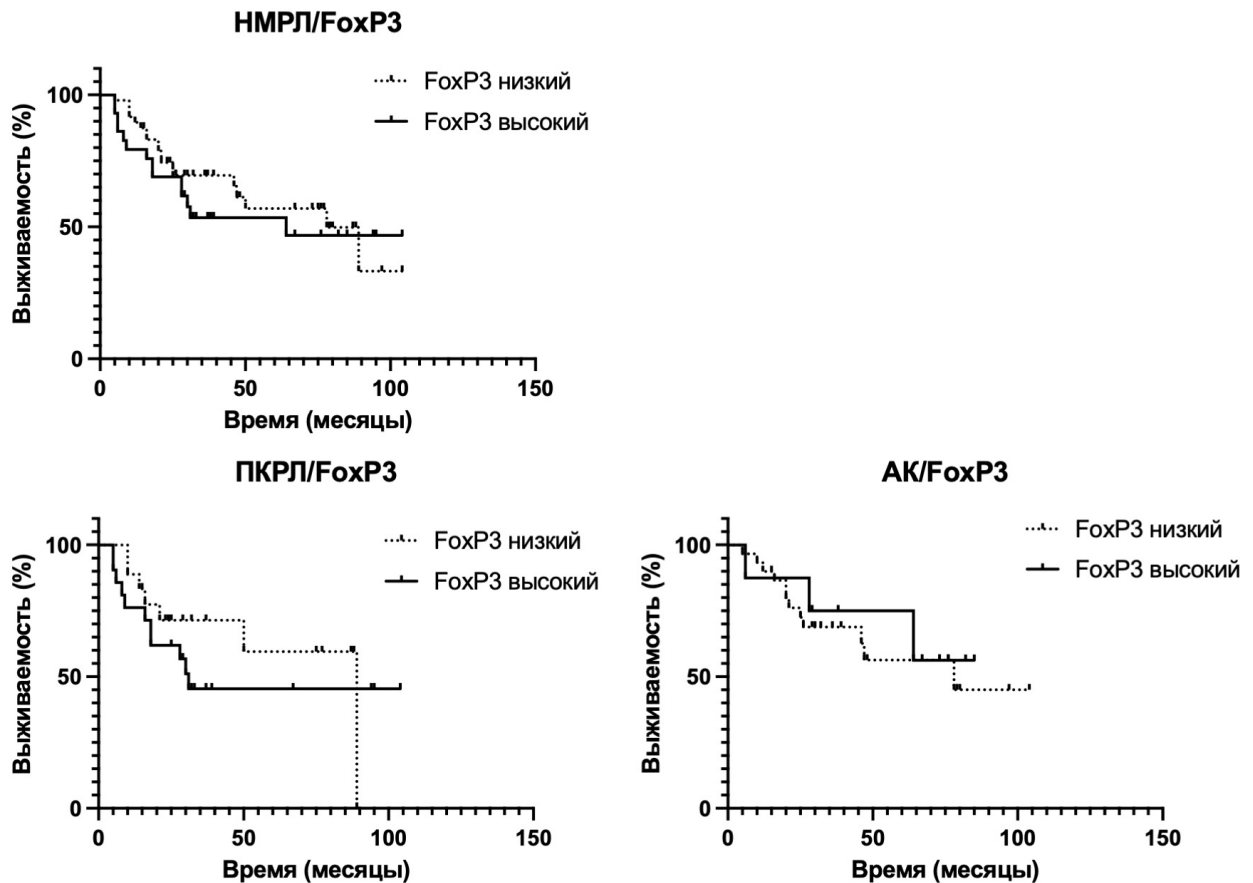


**Рисунок 30** - Анализ экспрессии CD3, CD8 и FoxP3 в образцах НМРЛ в зависимости от клинико-морфологических характеристик



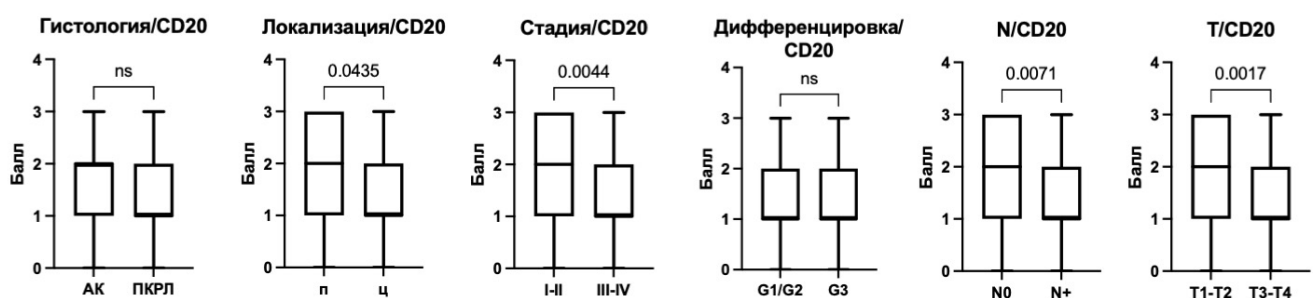
**Рисунок 31** - Общая выживаемость больных НМРЛ в зависимости от содержания CD8 и CD3 в опухолях НМРЛ

Показано, что большое количество CD8 положительных клеток на ранних стадиях заболевания может являться неблагоприятным прогностическим маркером (HR=3.152,  $p=0.0262$ ), в то время как на поздних стадиях такой закономерности не отмечено.



**Рисунок 32** - Общая выживаемость больных НМРЛ в зависимости от содержания FoxP3 в опухолях НМРЛ

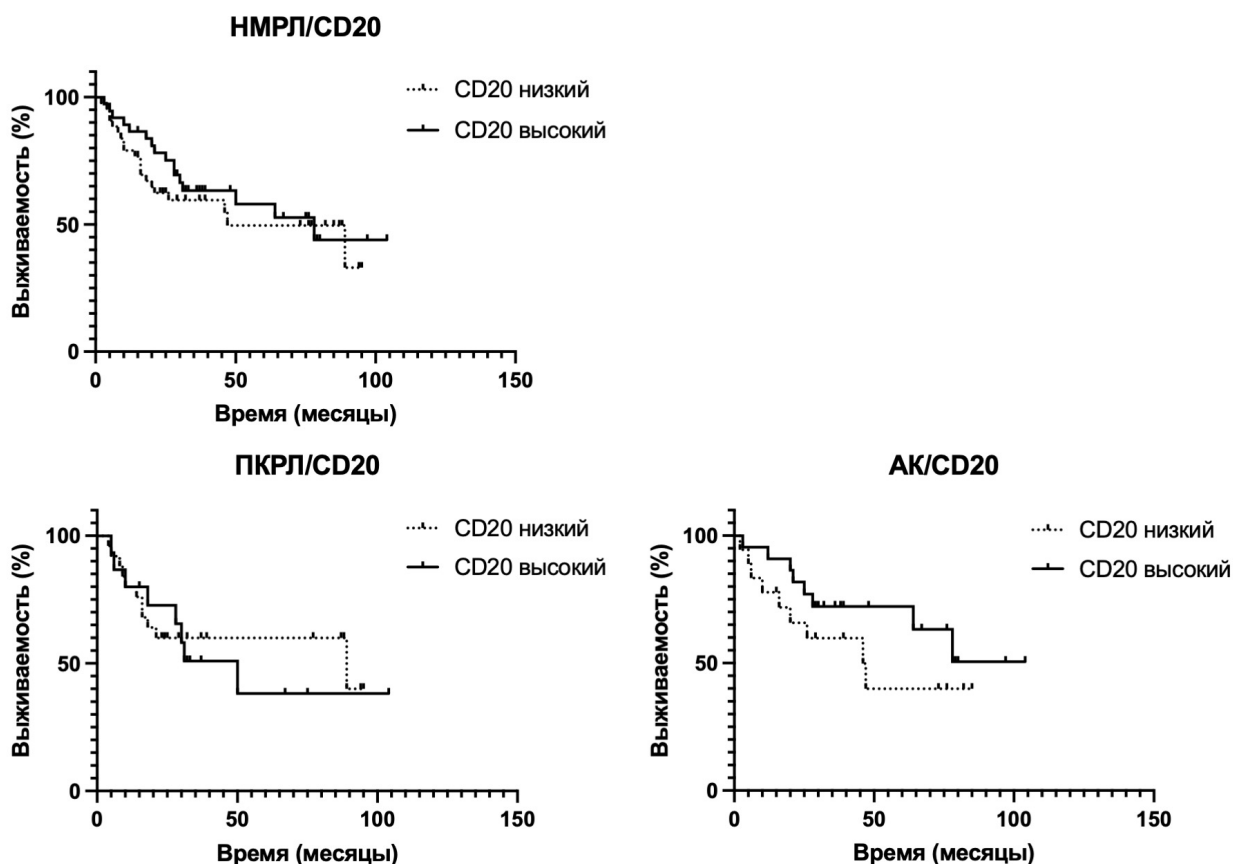
На следующем этапе работе провели оценку клинической и прогностической значимости В-клеток в опухолях легкого (Рисунок 33).



**Рисунок 33** - Анализ экспрессии CD20 в образцах НМРЛ в зависимости от клинкоморфологических характеристик

Для экспрессии CD20 в строме опухоли наблюдалась ассоциация с локализацией опухоли ( $p=0,0435$ ), со стадией заболевания ( $p=0,0044$ ), размером опухоли ( $p=0,0017$ ) и наличием регионарных метастазов ( $p=0,0071$ ). А именно, на более ранних стадиях, при меньшем размере опухоли и при отсутствии метастазов в лимфоузлах наблюдалось более высокое содержание

CD20+ В-клеток в опухолевой строме. Далее была изучена прогностическая значимость количества CD20+ клеток. Результаты представлены на рисунке 34.



**Рисунок 34** - Общая выживаемость больных НМРЛ в зависимости от содержания CD20+ клеток в опухолях НМРЛ

Проведенный анализ выявил отсутствие прогностической значимости содержания CD20+ клеток в опухолях НМРЛ. Результаты статистического анализа прогностической значимости Т- и В-клеток в строме опухолей немелкоклеточного рака легкого представлены в таблице 12.

**Таблица 12** - Статистический анализ прогностической значимости Т- и В-клеток в опухолях НМРЛ

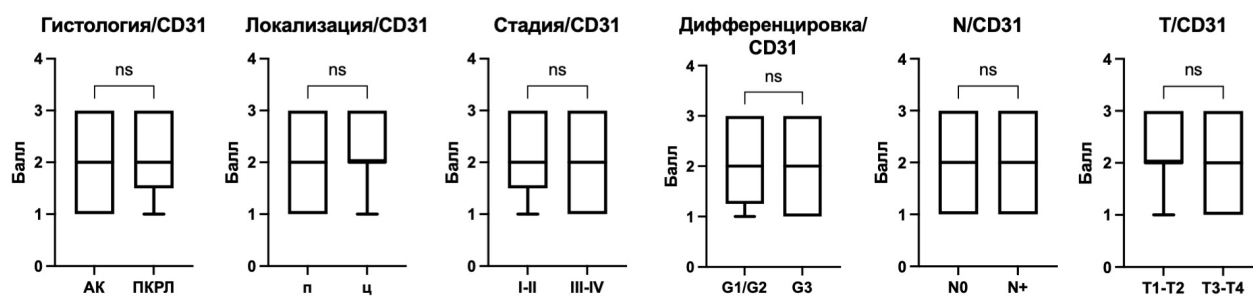
	Однофакторный анализ		
	ОР	95% ДИ	<i>p</i>
CD3/НМРЛ (высокий/низкий)	0,890	(0,449 - 1,762)	0,7366
CD3/АК (высокий/низкий)	0,599	(0,218 - 1,652)	0,3244
CD3/ПКРЛ (высокий/низкий)	1,198	(0,476 - 3,019)	0,6992
CD3/I-II стадия (высокий/низкий)	1,108	(0,329 - 3,726)	0,8699
CD3/III-IV стадия (высокий/низкий)	1,030	(0,439 - 2,416)	0,9442

CD8/НМРЛ (высокий/низкий)	1,144	(0,571 - 2,292)	0,7002
CD8/АК (высокий/низкий)	0,549	(0,199 - 1,512)	0,2622
CD8/ПКРЛ (высокий/низкий)	1,797	(0,731 - 4,418)	0,2047
CD8/I-II стадия (высокий/низкий)	3,152	(1,278 - 7,773)	0,0262*
CD8/III-IV стадия (высокий/низкий)	1,215	(0,530 - 2,781)	0,6326
FoxP3/НМРЛ (высокий/низкий)	1,277	(0,629 - 2,592)	0,4833
FoxP3/АК (высокий/низкий)	0,776	(0,239 - 2,524)	0,6923
FoxP3/ПКРЛ (высокий/низкий)	1,418	(0,562 - 3,577)	0,4606
FoxP3/I-II стадия (высокий/низкий)	1,360	(0,403 - 4,595)	0,6100
FoxP3/III-IV стадия (высокий/низкий)	1,207	(0,506 - 2,875)	0,6559
CD20/НМРЛ (высокий/низкий)	0,791	(0,412–1,520)	0,3020
CD20/АК (высокий/низкий)	0,572	(0,216–1,514)	0,2412
CD20/ПКРЛ (высокий/низкий)	1,141	(0,454–2,870)	0,7733
CD20/I-II стадия (высокий/низкий)	0,635	(0,187–2,153)	0,4321
CD20/III-IV стадия (высокий/низкий)	1,830	(0,782–4,285)	0,1127

\*-статистически значимо

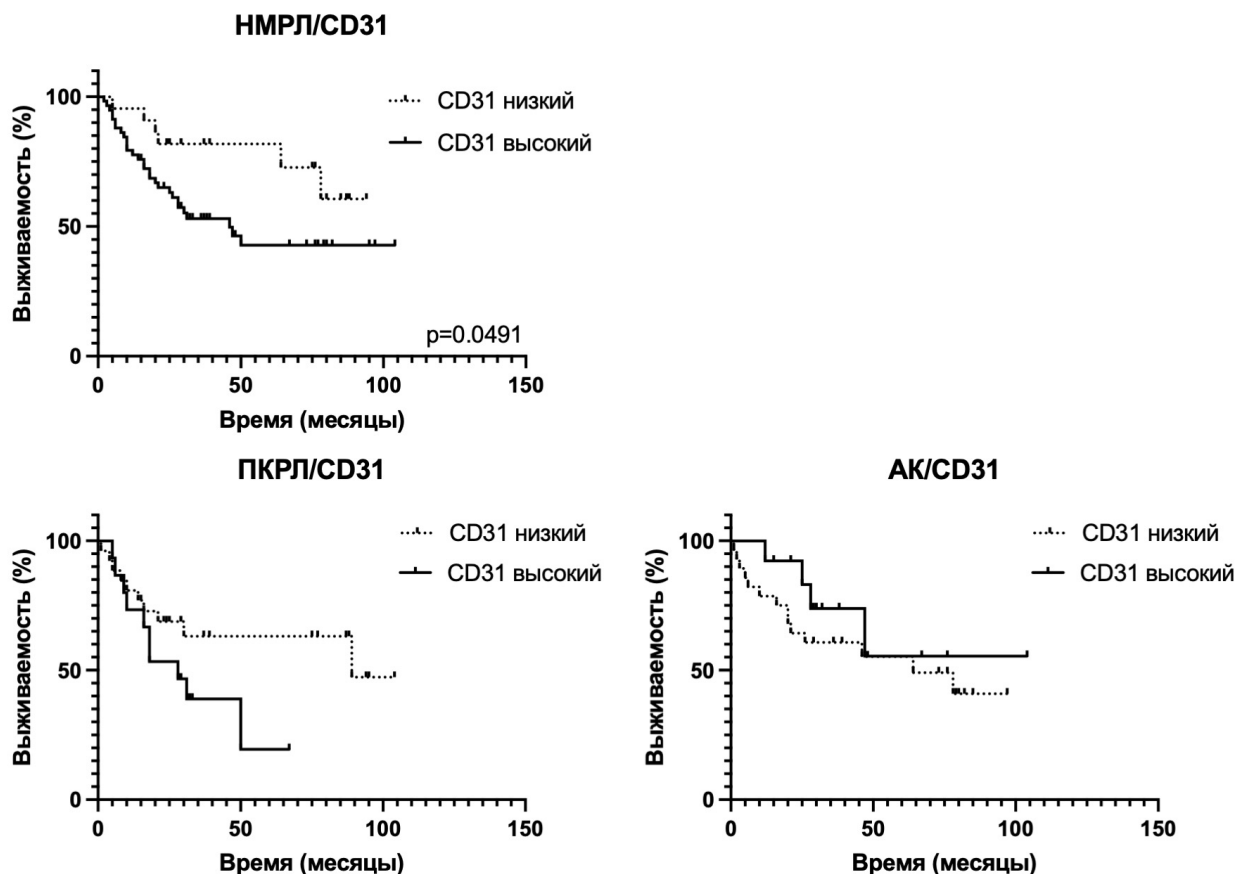
### 3.1.5 Клиническая и прогностическая значимость эндотелиальных клеток в опухолях НМРЛ

К основным свойствам опухолевых клеток относится их способность стимулировать образование новых кровеносных сосудов. В опухолевых тканях сосуды формируются в основном из эндотелиальных клеток, окружающих мелкие сосуды, т. е. за счет ангиогенеза. Эндотелиальные клетки являются неотъемлемой составляющей опухолевой стромы, и анализ их количества может выявить ассоциации с развитием и прогнозом заболевания. В данной работе в процессе комплексной характеристики стромы опухолей НМРЛ проведен анализ содержания CD31+ клеток в образцах (Рисунок 35 и 36).



**Рисунок 35** - Экспрессия CD31 в образцах НМРЛ в зависимости от клинико-морфологических характеристик





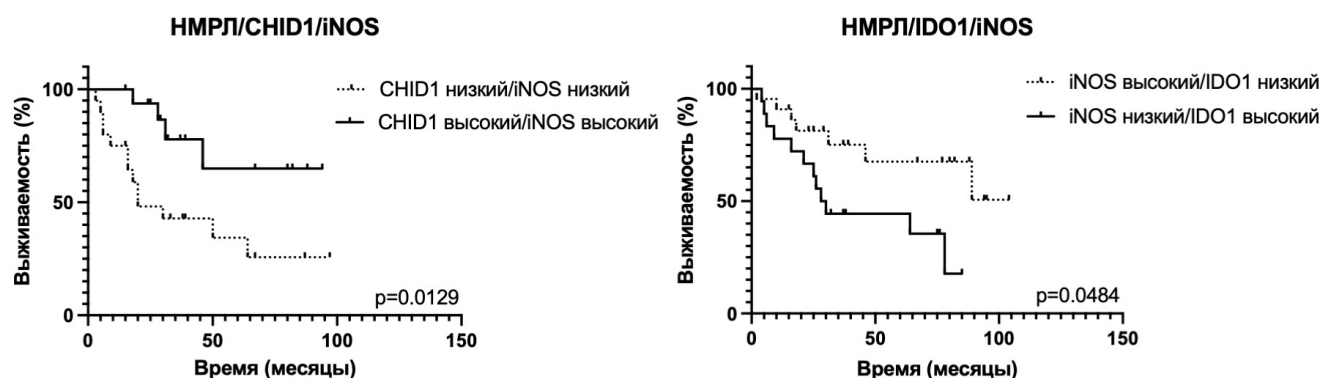
**Рисунок 36** - Общая выживаемость больных НМРЛ в зависимости от содержания CD31 положительных клеток в опухолях НМРЛ

Показано, что содержание CD31<sup>+</sup> клеток в опухоли не ассоциировано с клинико-морфологическими характеристиками, однако является неблагоприятным прогностическим фактором немелкоклеточного рака легкого (HR=2,335;  $p=0,0491^*$ ).

### 3.1.6 Комплексный анализ прогностической значимости опухолевых и стромальных маркеров при НМРЛ

Проведенный анализ показал, что многие маркеры как опухолевых, так и стромальных клеток могут являться прогностическими маркерами заболевания. Однако с накоплением большого количества данных становится понятно, что такой анализ достаточно противоречив и сильно зависит от многих характеристик, начиная от размера выборки и заканчивая популяционными особенностями изучаемой группы пациентов. В связи с этим кажется логичным, что комплексный анализ нескольких маркеров определенной опухоли сможет повысить эффективность прогнозирования течения и исхода заболевания, а также в перспективе предсказать ответ на планируемую терапию. Это особенно актуально для иммунотерапии при отсутствии однозначных критериев ее назначения и их эффективности. На данном этапе работы

проведен комплексный анализ прогностической значимости комбинаций некоторых маркеров (Рисунок 37).



**Рисунок 37** – Прогностическая значимость комплексного анализа маркеров опухолевой стромы на примере сочетаний iNOS/CHID1 и iNOS/IDO1

Проведенный анализ показал, что прогностическая значимость анализа комбинации CHID1/iNOS имеет более высокую информативность по сравнению с каждым маркером в отдельности (HR=0,2699; p=0,0129). Важно отметить, что общая выживаемость пациентов из группы с низкой экспрессией CHID1/iNOS составила 20 месяцев, в то время как общая выживаемость в группе с низкой экспрессией только CHID1 составила 28 месяцев, а в группе с низкой экспрессией только iNOS - 50 месяцев. Комбинации маркеров iNOS/IDO1 также является прогностически интересной. Если в группе с низкой экспрессией только iNOS медиана выживаемости пациентов составляет 50 месяцев, то при низком содержании iNOS в сочетании с высокой экспрессии IDO1 медиана выживаемости снижается до 29 месяцев. Таким образом, комплексный анализ позволяет более точно прогнозировать исход заболевания, что может помочь врачу применить соответствующую актуальной терапию.

### 3.2 Таксономический состав микробиома опухолей НМРЛ

После анализа фенотипа стромы опухолей НМРЛ, на следующем этапе данного исследования проведено изучение таксономического состава микробиома опухолей легкого и условно нормальной такни легкого методом метагеномного секвенирования.

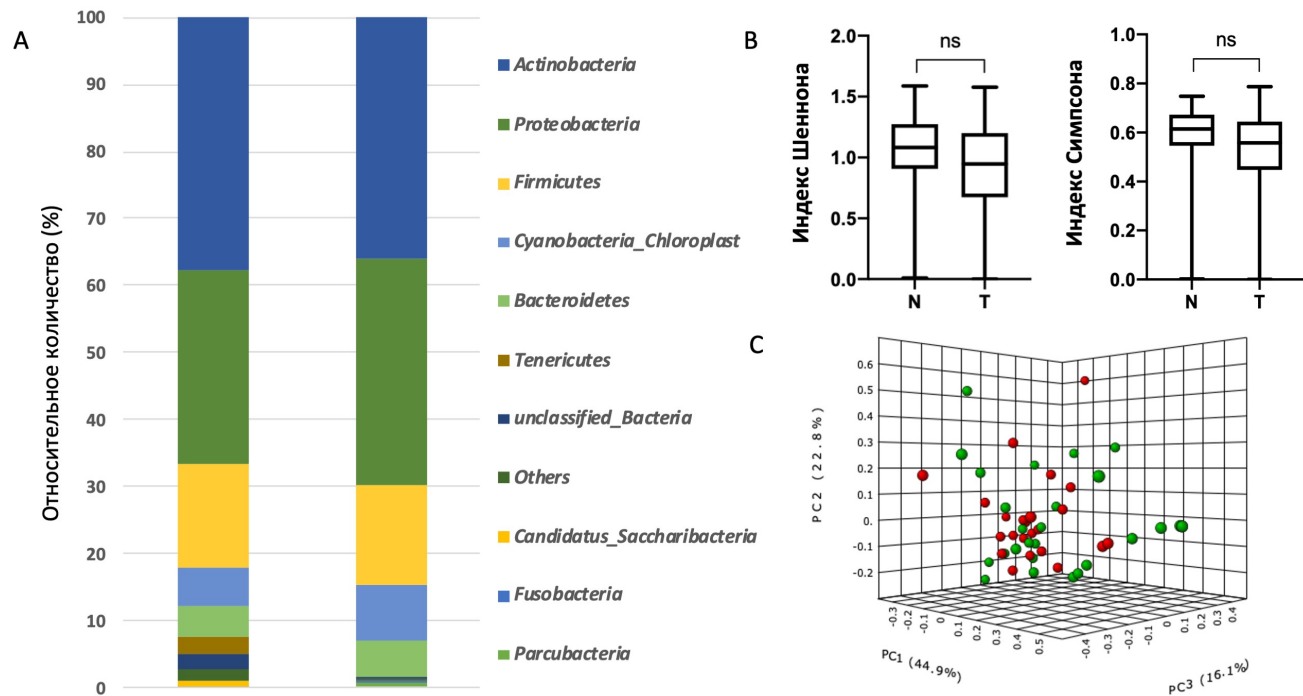
Для анализа состава микробного сообщества было проведено секвенирование гена 16S рРНК в 26 парных образцах НМРЛ. В состав выборки для проведения секвенирования входило 14 образцов аденокарцином и 12 образцов плоскоклеточного рака легкого. В целом из 26 образцов 12 относились к I-II стадиям заболевания, 9 образцов было получено от пациентов без регионарных метастазов и 14 образцов высокой и умеренной дифференцировки.

Анализ таксономического состава микробного сообщества тканей легкого выявил наличие 10 типов и 280 родов микроорганизмов (Таблица 13).

**Таблица 13** - Таксономический состав опухолей легкого на уровне типов

Тип	Норма (%)	Опухоль (%)	<i>p</i>
<i>Actinobacteria</i>	37,71	36,06	0,73
<i>Proteobacteria</i>	28,94	33,61	0,36
<i>Firmicutes</i>	15,33	14,97	0,33
<i>Cyanobacteria_Chloroplast</i>	5,92	8,31	0,93
<i>Bacteroidetes</i>	4,46	5,60	0,15
<i>Parcubacteria</i>	0,04	0,65	0,75
Others	1,60	0,50	NA
<i>Fusobacteria</i>	0,12	0,21	0,69
<i>unclassified_Bacteria</i>	2,34	0,06	0,06
<i>Candidatus_Saccharibacteria</i>	0,97	0,01	0,50
<i>Tenericutes</i>	2,52	0,00	0,50

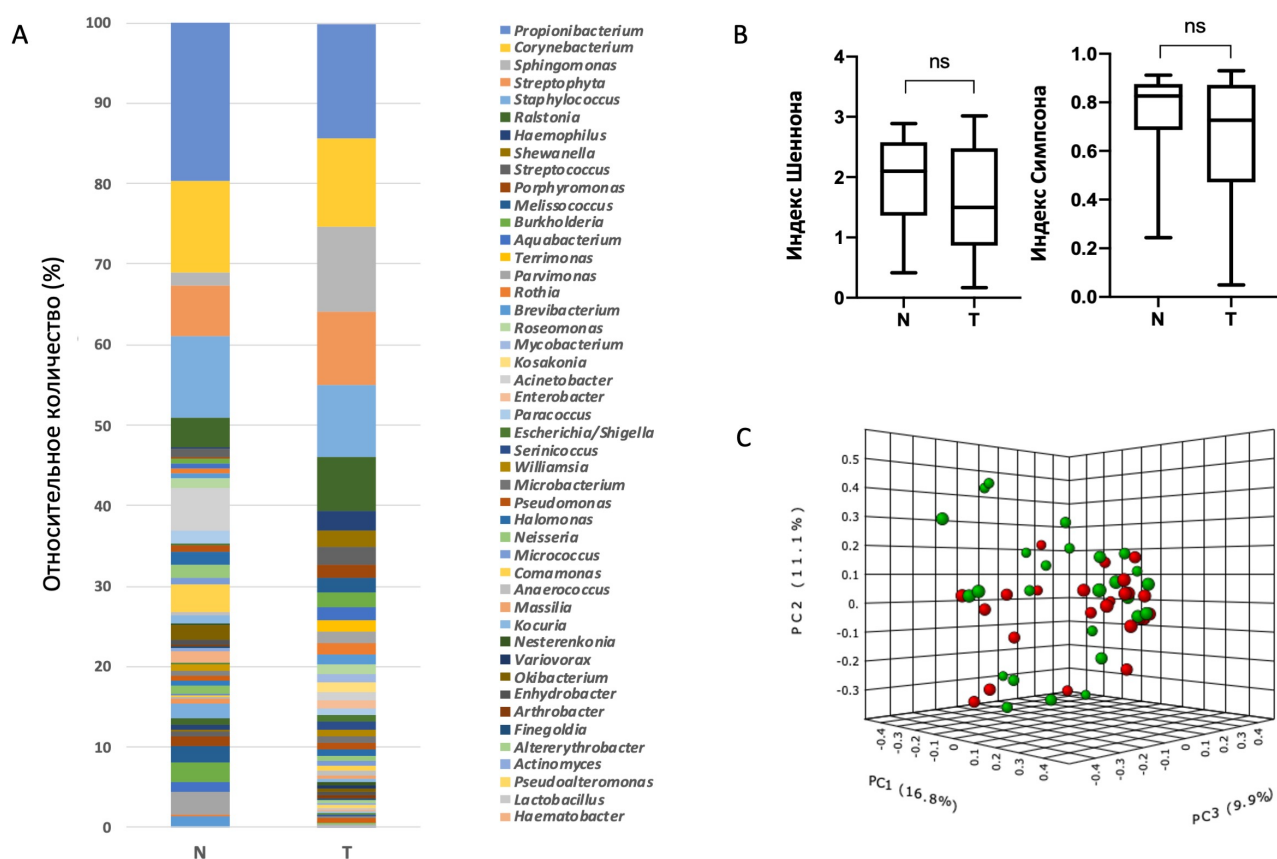
В дальнейшем анализе учитывались роды бактерий, относительное содержание которых было более 0,1%. Таких доминирующих родов насчитывалось 70. Результаты анализа таксономического состава опухолей легкого на уровне типов представлены на рисунке 38.



**Рисунок 38** - Таксономический состав опухолей легкого на уровне типов. Относительное количество типов микроорганизмов в нормальной и опухолевой ткани легкого (А). Анализ  $\alpha$ -разнообразия (индексы Шеннона и Симпсона) в опухолях легкого и условно нормальной ткани

на уровне типов (B). Анализ  $\beta$ -разнообразия опухолях легкого и условно нормальной ткани на уровне типов. [PERMANOVA] F-value: 0.81483; R-squared: 0.016692; p-value < 0.507 (C)

Преобладающими типами микроорганизмов, встречающихся как в опухолях, так и в образцах условно нормальной ткани, являлись *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Значительных отличий в качественном составе микроорганизмов на данном уровне (на уровне типов), не выявлено. Далее был проведен анализ относительного количества бактерий различных родов в опухолевой и нормальной ткани легкого. Результаты представлены на рисунке 39.

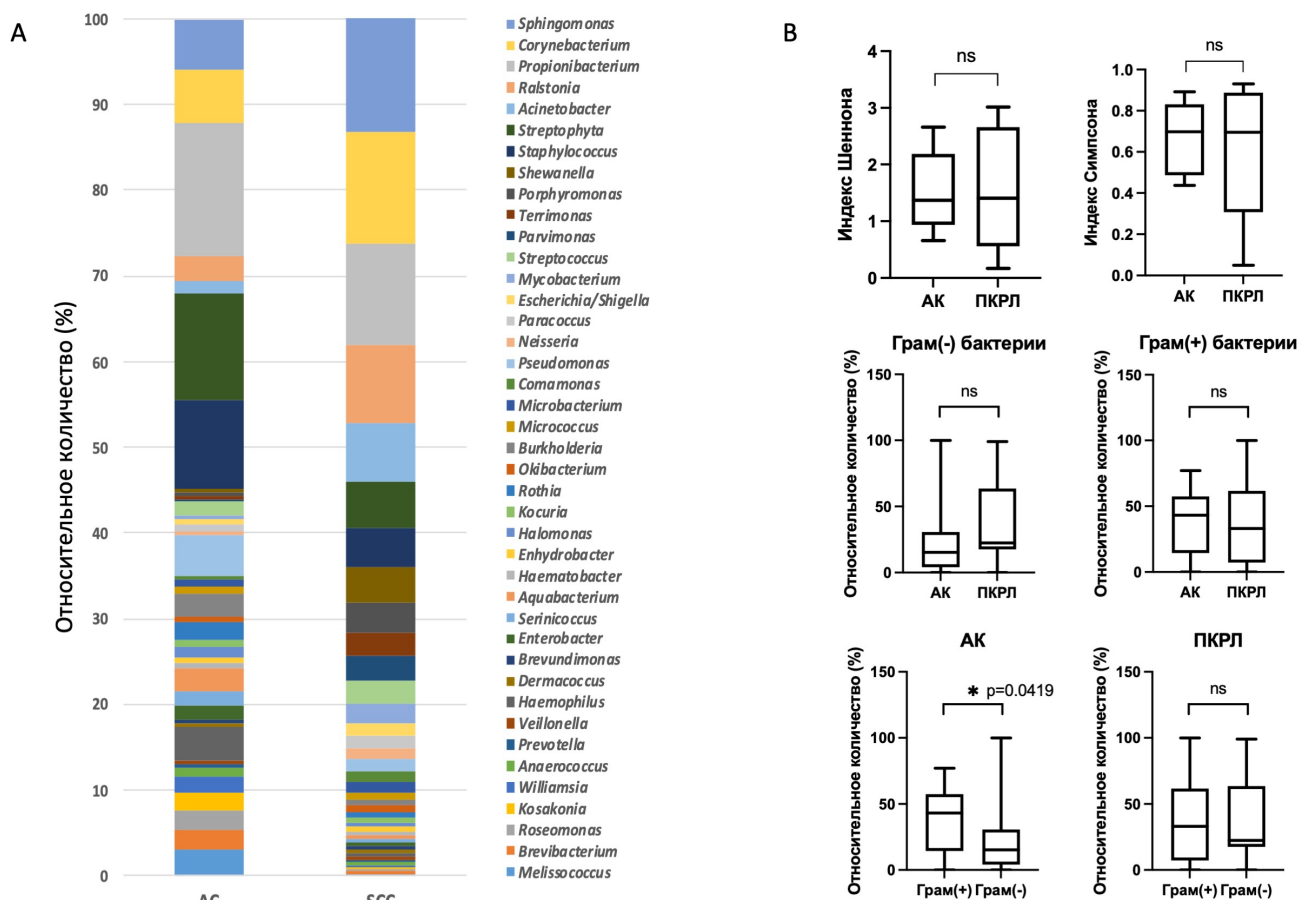


**Рисунок 39** - Таксономический состав опухолей легкого и условно нормальной ткани на уровне родов. Относительное количество родов микроорганизмов в нормальной и опухолевой ткани легкого (А). Анализ  $\alpha$ -разнообразия (индексы Шеннона и Симпсона) в опухолях легкого и условно нормальной ткани на уровне родов (В). Анализ  $\beta$ -разнообразия опухолях легкого и условно нормальной ткани на уровне родов [PERMANOVA] F-value: 1.2264; R-squared: 0.024913; p-value < 0.204 (С)

Показано отсутствие таксономического разнообразия между опухолевой и нормальной тканью. Для оценки микробиологического разнообразия биологических сообществ применяют методы вычислительной экологии, а именно оценку  $\alpha$ - и  $\beta$ -разнообразия. Эти характеристики являются численными показателями (индексами), характеризующими разнообразие одиночного

микробного сообщества или различие между двумя сообществами, которые учитывают число выявленных в сообществе таксонов и число особей в различных таксонах. Для оценки альфа разнообразия использовали несколько методов анализа, а именно определение индексов Шеннона и Симпсона. Индекс Шеннона характеризует разнообразие и выравненность в структуре сообщества. Индекс Симпсона показывает степень выраженности доминирования определенных видов в структуре сообщества. Таким образом, индекс Шеннона более чувствителен к изменениям в обилии редких видов, в то время как индекс Симпсона более чувствителен к изменению обилия самых массовых видов.

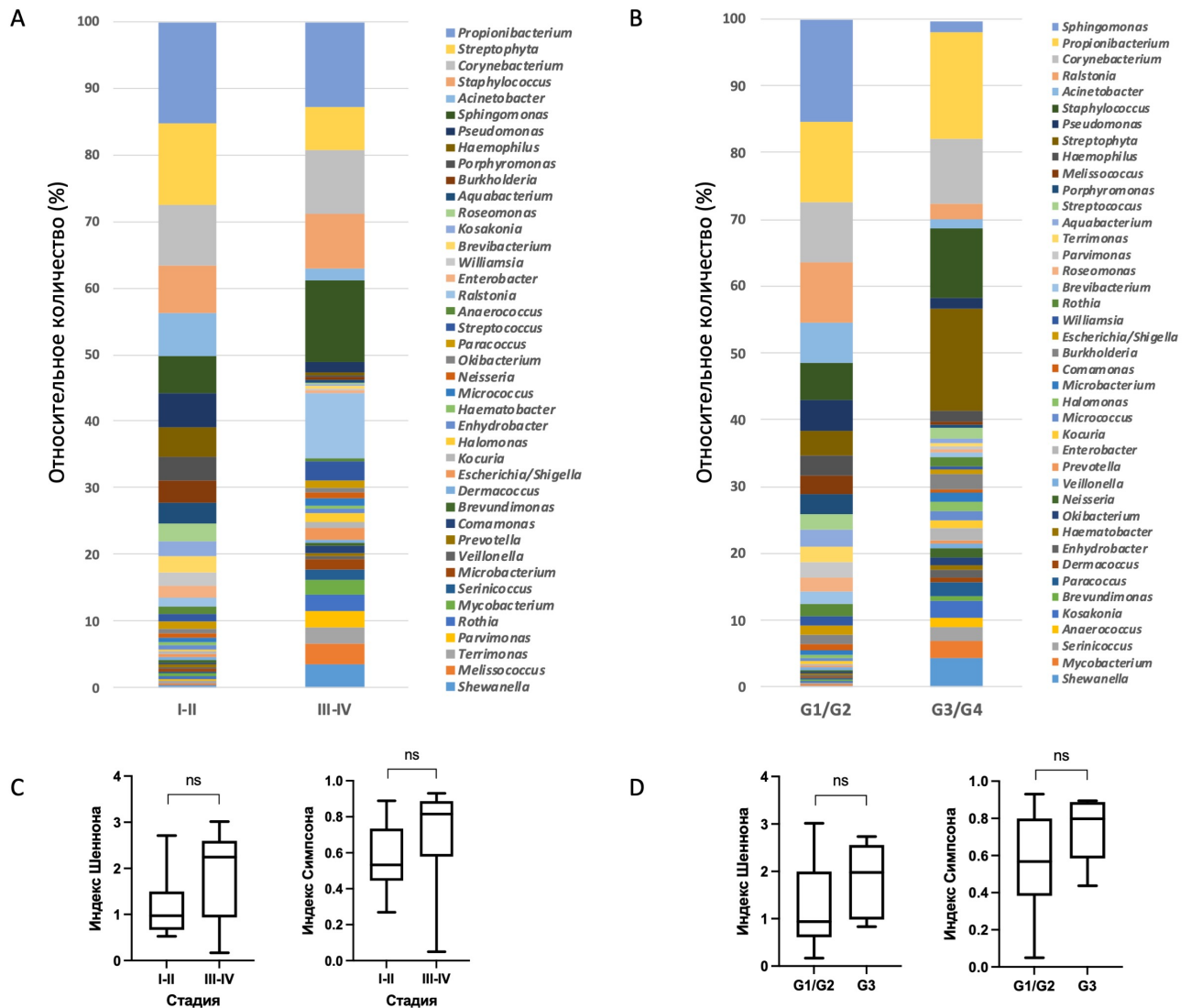
Далее проведен таксономический состав микробного сообщества на уровне родов, выявленных в опухолях легкого различных гистологических типов, стадий и степени дифференцировки. В анализе использовались те роды, которые составляли более 0,5% от общего числа бактерий. Количество таких родов насчитывало 40. Также проведен анализ альфа-разнообразия в каждой группе на уровне бактериальных родов с использованием индексов Шеннона и Симпсона, которые учитывают как таксономическое разнообразие, так и количественную выравненность сообществ (Рисунок 40).



**Рисунок 40** - Таксономический состав на уровне бактериальных родов опухолей легкого различных гистологических типов. Анализ  $\alpha$ -разнообразия (индексы Шеннона и Симпсона) в

группах АК и ПКРЛ (А). Содержание грамположительных и грамотрицательных бактерий в группах различных гистологий (В)

Проведенный анализ относительного количества 40 превалирующих родов микроорганизмов в группах аденокарцином и плоскоклеточного рака отличий не выявил. Альфа-разнообразие микробных сообществ опухолей с различной гистологией на уровне бактериальных родов не различалось. Однако интересно отметить, что в группе аденокарцином наблюдается достоверное ( $p = 0,0419$ ) преобладание грамположительных бактерий. Для группы плоскоклеточного рака подобное различие не выявлено. Относительная численность грамположительных и грамотрицательных бактерий между группами аденокарцином и плоскоклеточного рака также не отличалась. Данные представлены на рисунке 41.



**Рисунок 41** - Таксономический состав микробиома опухолей легкого на уровне родов различных стадий заболевания (А) и степени дифференцировки (В). Анализ  $\alpha$ -разнообразия

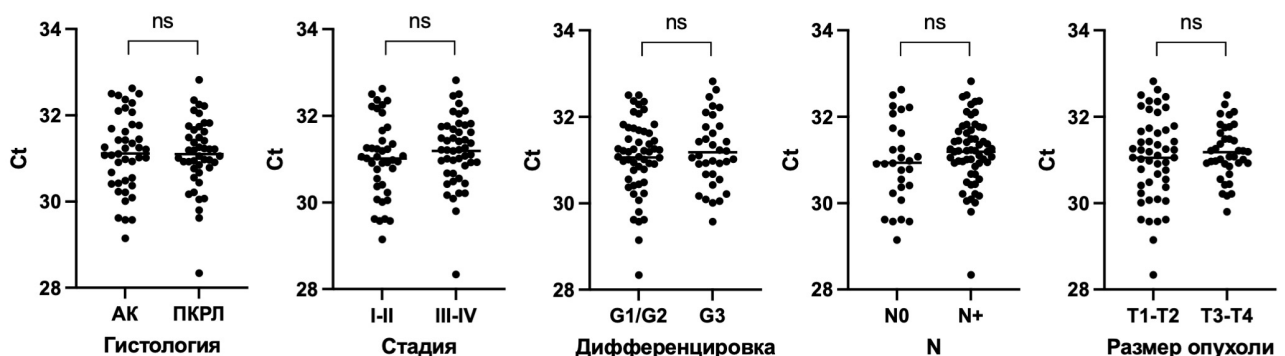
(индексы Шеннона и Симпсона) в группа различных стадий заболевания (С) и дифференцировки (D)

Таксономический анализ состава опухолей НМРЛ различных стадий показал значимые отличия между 11 родами бактерий: *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aquabacterium*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Halomonas*, *Parvimonas*, *Rothia*, *Kocuria*. Необходимо отметить, что относительное количество родов *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aquabacterium* снижается со стадией заболевания, в то время как относительное количество родов *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Halomonas*, *Parvimonas*, *Rothia*, *Kocuria* повышается при прогрессии заболевания. Анализ таксономического состава микробиома опухолей различной степени дифференцировки выявил отличия в 4 родах. Интересно отметить, что относительное содержание бактерий рода *Staphylococcus* было выше в низкодифференцированных опухолях по сравнению с высокодифференцированными.

Мы не обнаружили разницы между альфа- и бета-разнообразием в группах опухолей различных стадий и дифференцировки. Однако в процессе развития заболевания на поздних стадиях и в опухолях с более низкой дифференцировкой мы видим тенденцию к повышению индексов разнообразия ( $p=0,059$  и  $p=0,075$  соответственно).

Далее проведен количественный анализ бактерий в опухолевой ткани по сравнению с условно нормальной тканью легкого методом ПЦР в реальном времени. Мы показали, что общая бактериальная нагрузка в условно нормальной ткани легкого выше, чем в опухоли ( $p=0,0325^*$ ).

Далее проанализировано, отличается ли количество бактерий в опухоли в зависимости от различных клинко-морфологических характеристик. Результаты представлены на рисунке 42.



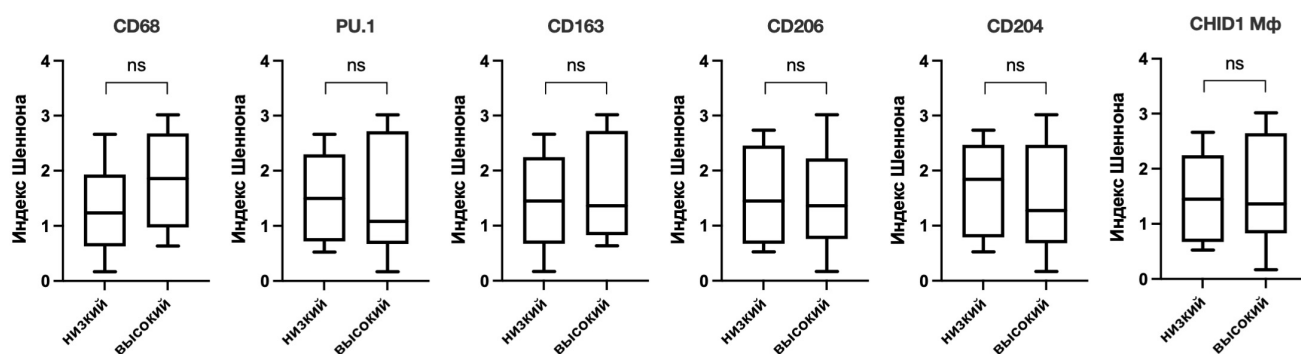
**Рисунок 42** – Анализ общей бактериальной нагрузки в опухоли в зависимости от клинко-морфологических характеристик

В результате проведенного анализа значимых изменений количества бактерий в зависимости от клинических характеристик выявлено не было, что вероятно свидетельствует о

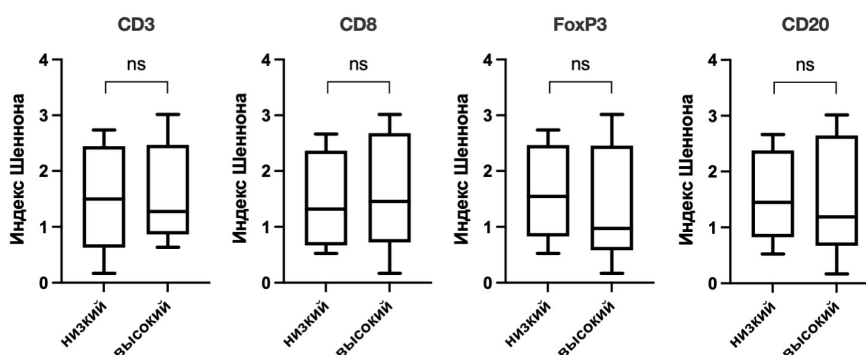
том, что ключевым моментом изменения количества резидентного микробиома является возникновение опухоли, а не ее последующая прогрессия.

### 3.3 Комплексный анализ микробиологической и иммунологической составляющих опухолевой стромы в прогрессии опухолей легкого

Для анализа корреляций между альфа-разнообразием бактериального сообщества и фенотипом воспалительного инфильтрата опухоли использовали 40 доминирующих родов бактерий с относительной численностью не менее 0,5%, по которым рассчитывали индекс Шеннона (Рисунок 43–45).



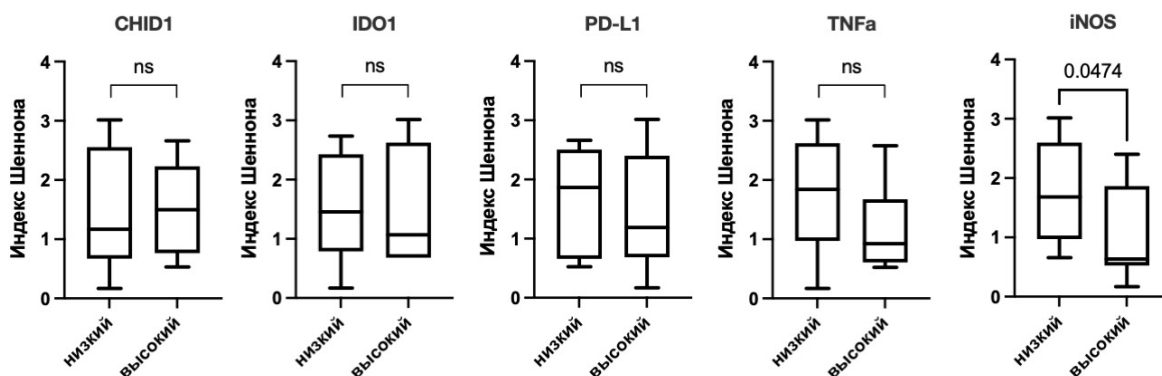
**Рисунок 43** - Анализ альфа-разнообразия на уровне родов в соответствии с фенотипом макрофагов в строме опухолей НМРЛ



**Рисунок 44** - Анализ альфа-разнообразия на уровне родов в соответствии с фенотипом Т- и В-клеток

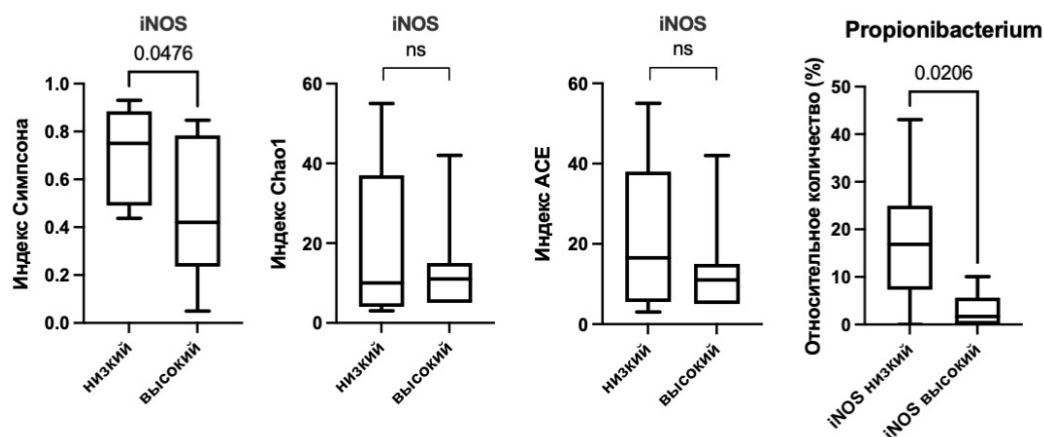
Как видно из представленных графиков, данный показатель значимо не отличался практически во всех исследованных группах, за исключением групп с различной экспрессией iNOS. Для данных групп мы наблюдали значимое отличие индексов Шеннона и Симпсона, а именно, в группе, характеризующейся более высокой экспрессией iNOS, наблюдалось снижение данных показателей.





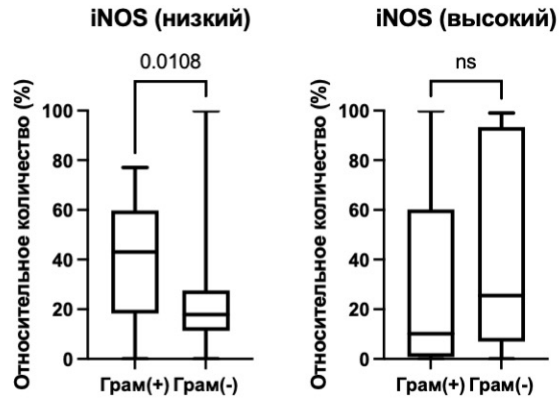
**Рисунок 45** - Анализ альфа-разнообразия на уровне родов в соответствии с экспрессией CHID1, IDO1, PD-L1, TNF $\alpha$  и iNOS опухолевыми клетками HNPCL

Так, индексы Шеннона и Симпсона учитывают две характеристики сообществ, а именно, число таксонов и их выравненность между собой; для групп с разным уровнем экспрессии iNOS вычислили дополнительные показатели, такие как индексы Chao1 и ACE, которые характеризуют только видовое разнообразие образцов (Рисунок 46).



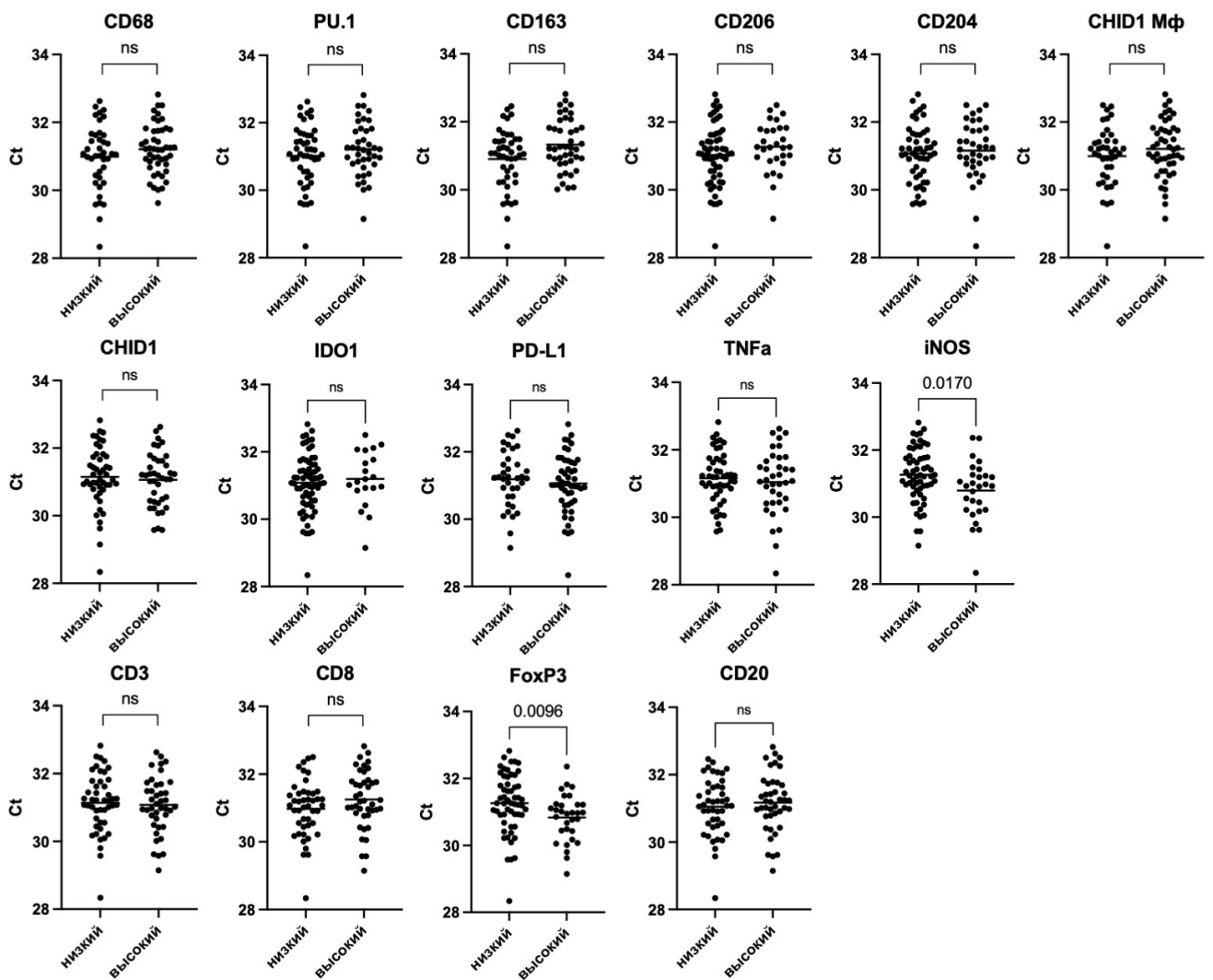
**Рисунок 46** - Анализ альфа разнообразия в группах с различной экспрессией iNOS

Показано, что исследуемые группы не отличаются по данным показателям, что свидетельствует о том, что отличия в индексах Шеннона и Симпсона обусловлены лишь относительными количественными изменениями отдельных представителей микробиома легких. Оказалось, что увеличение индексов Шеннона и Симпсона в группе с низким уровнем экспрессии iNOS сопровождалось увеличением относительной численности единственного рода *Propionibacterium*. Также в группе с низкой экспрессией iNOS было выявлено большее относительное количество грамположительных бактерий по сравнению с грамотрицательными ( $p=0,0108$ ) (Рисунок 47).



**Рисунок 47** – Относительное содержание грамположительных и грамотрицательных бактерий в зависимости от экспрессии iNOS

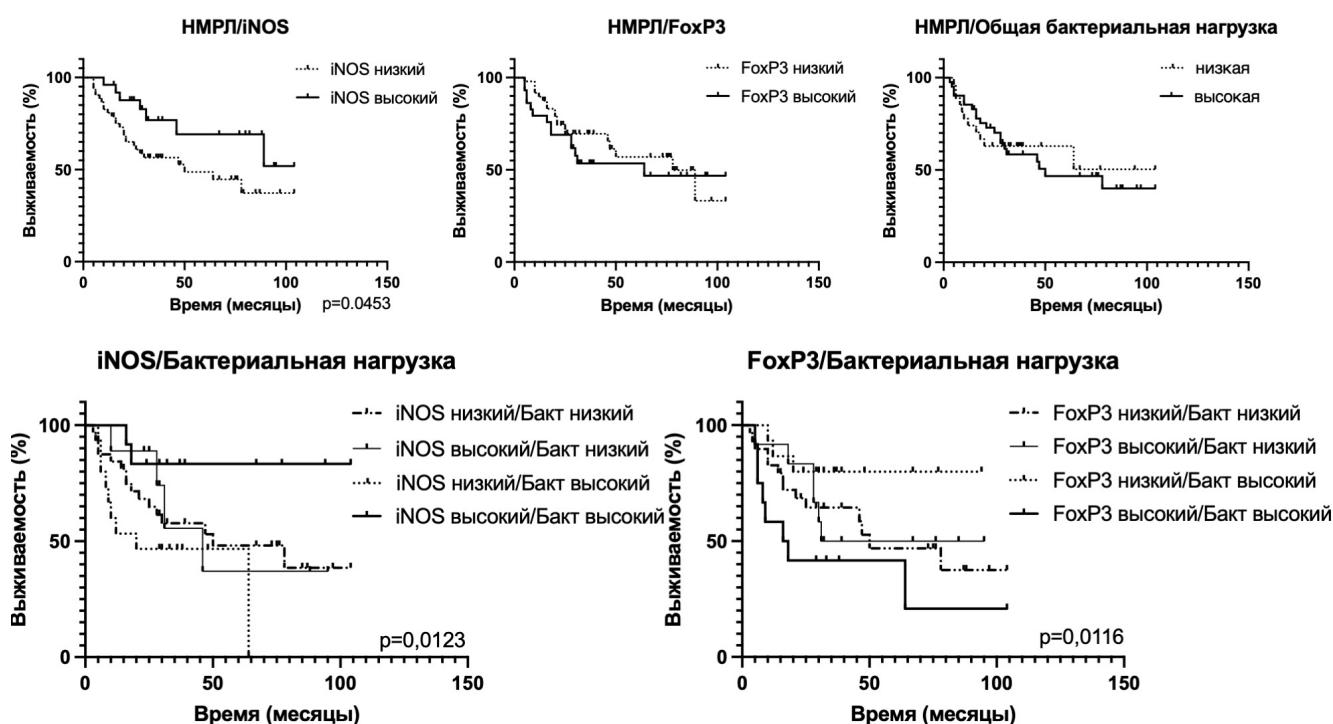
Далее проведен анализ общей бактериальной нагрузки в образцах в зависимости от фенотипа опухолевой стромы. Результаты представлены на рисунке 48.



**Рисунок 48** - Анализ общей бактериальной нагрузки в опухоли в зависимости от фенотипа опухолевой стромы

Показано значимое различие в общей бактериальной нагрузке в образцах с различным уровнем экспрессии iNOS и FoxP3 ( $p=0,0170$  и  $p=0,0096$  соответственно). В группах образцов, характеризующихся высокой экспрессией данных стромальных маркеров, наблюдалось более высокая бактериальная нагрузка.

Ранее показано, что некоторые стромальные маркеры опухоли могут иметь прогностическую значимость при НМРЛ. Проведен комплексный анализ выживаемости пациентов с НМРЛ как в группах с различным уровнем экспрессии iNOS и FoxP3, так и в зависимости от общей бактериальной нагрузки. Оценен совместный вклад данных характеристик опухоли в общую выживаемость пациентов. Результаты представлены на рисунке 49.



**Рисунок 49** - Общая выживаемость пациентов с НМРЛ в зависимости от экспрессии iNOS и FoxP3 и общей бактериальной нагрузки

Показано, что повышенная экспрессия iNOS опухолевыми клетками является благоприятным прогностическим фактором ( $p=0,0453$ ). Общая бактериальная нагрузка, как и уровень количества FoxP3 положительных клеток в опухоли, не являются прогностическими маркерами и не влияют на общую выживаемость пациентов. Далее проведен анализ выживаемости в зависимости от экспрессии исследуемых маркеров совместно с общей бактериальной нагрузкой. Показано, что высокая экспрессия iNOS в совокупности с повышенной бактериальной нагрузкой является маркером хорошего прогноза по сравнению с группой пациентов с высокой бактериальной нагрузкой и низкой экспрессией iNOS ( $HR=0,1824$ ;  $p=0,0123$ ). Интересно отметить, что в группе

случаев с низкой бактериальной нагрузкой уровень экспрессии iNOS не является прогностически значимым. Также впервые показано, что высокая бактериальная нагрузка опухоли с иммуносупрессией (большим количеством FoxP3+ клеток) является маркером плохого прогноза при НМРЛ по сравнению с группой с высоким содержанием бактерий и низким содержанием FoxP3 (HR=4,651; p=0,0116). Также, как и в случае с iNOS, FoxP3 является прогностическим маркером только для группы пациентов с высокой бактериальной нагрузкой. Статистический анализ полученных данных представлен в таблице 14.

**Таблица 14** – Статистический анализ прогностической значимости комплексного анализа стромальных маркеров с общей бактериальной нагрузкой

Маркер	Однофакторный анализ		
	ОР	95% ДИ	<i>p</i>
iNOS/НМРЛ (высокий/низкий)	0,441	(0,219 - 0,893)	0,0453*
FoxP3/НМРЛ (высокий/низкий)	1,277	(0,629 - 2,592)	0,4833
Общая бактериальная нагрузка (высокий/низкий)	1,058	(0,510 - 2,196)	0,8786
iNOS/Бактериальная нагрузка	0,182	(0,056 - 0,598)	0,0123*
FoxP3/Бактериальная нагрузка	4,651	(1,362 - 15,88)	0,0116*

\*-статистически значимо

Таким образом, в данной части исследования описаны два новых прогностических маркера НМРЛ и подтверждена значимость некоторых других. Впервые показано, что CHID1, традиционно считающийся маркером M2 макрофагов, экспрессируется опухолевыми клетками легкого, причем его экспрессия сильно зависит от гистологического типа опухоли. Также впервые показано, что экспрессия CHID1 в опухолевых клетках является фактором хорошего прогноза как для аденокарцином легкого (HR=0,3196; p=0,0127), так для НМРЛ в целом (HR=0,4019; p=0,0115). Также необходимо отметить, что CHID1 является фактором благоприятного прогноза на ранних стадиях заболевания (HR=0,2011; p=0,0264\*).

Еще одним новым прогностическим маркером для НМРЛ оказался транскрипционный фактор PU.1. Показано, что в целом для опухолей НМРЛ PU.1 не является прогностическим маркером. Однако анализ с учетом гистологического типа опухоли показал, что низкое количество PU.1+ клеток в опухоли является фактором плохого прогноза для аденокарцином (HR=4,250; p=0,0364), в то время как для плоскоклеточных опухолей такое обстоятельство является фактором хорошего прогноза (HR=0,3542; p=0,0356). Также показано, что высокая экспрессия iNOS и низкая экспрессии IDO1 являются хорошими прогностическими маркерами НМРЛ.

Далее мы впервые провели анализ общей бактериальной нагрузки опухолей совместно с фенотипом опухолевой стромы. Общая бактериальная нагрузка, как и уровень количества FoxP3 положительных клеток в опухоли, не являются прогностическими маркерами и не влияют на общую выживаемость пациентов. Проведен анализ выживаемости в зависимости от экспрессии исследуемых маркеров совместно с общей бактериальной нагрузкой. Впервые показано, что высокая экспрессия iNOS в совокупности с повышенной бактериальной нагрузкой является маркером хорошего прогноза по сравнению с группой пациентов с высокой бактериальной нагрузкой и низкой экспрессией iNOS (HR 0,1824;  $p=0,0123$ ). Также впервые показано, что высокая бактериальная нагрузка опухоли с иммуносупрессией (большим количеством FoxP3+ клеток) является маркером плохого прогноза при НМРЛ по сравнению с группой с высоким содержанием бактерий и низким содержанием FoxP3 (HR 4,651;  $p=0,0116$ ).

Таким образом, впервые показано, что общая бактериальная нагрузка опухоли может иметь противоположное прогностическое значение в зависимости от состояния местного противоопухолевого иммунитета.

#### **3.4 Анализ фенотипа иммунокомпетентных клеток стромы опухолей пищевода**

Известно, что строма опухолей органов ЖКТ зачастую отличается по фенотипическим характеристикам от большинства других солидных опухолей. Также прогностическая значимость многих маркеров большинства солидных опухолей для органов ЖКТ противоречива. Возможно, это обусловлено огромной микробиологической нагрузкой данных органов. Именно поэтому в качестве второй локализации для проведения исследования взаимодействия микробиологической и иммунологической составляющих опухолевой стромы был выбран плоскоклеточный рак пищевода. В исследование включили 48 больных (36 мужчин и 12 женщин) с плоскоклеточным раком пищевода (ПРП), проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участника получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз у всех пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей пищеварительной системы (ВОЗ, 2019). Выборка включала 10 образцов высоко дифференцированного рака, 28 образцов умеренно дифференцированного и 10 образцов низко дифференцированного рака пищевода. 23 пациента на момент хирургического вмешательства имели регионарные метастазы. Данные по выживаемости были собраны для 37 пациентов, из которых 23 (62.0%) умерли, а 14 (38.0%) оставались живы в период наблюдения. Детальная характеристика исследуемой выборки представлена в таблице 15.

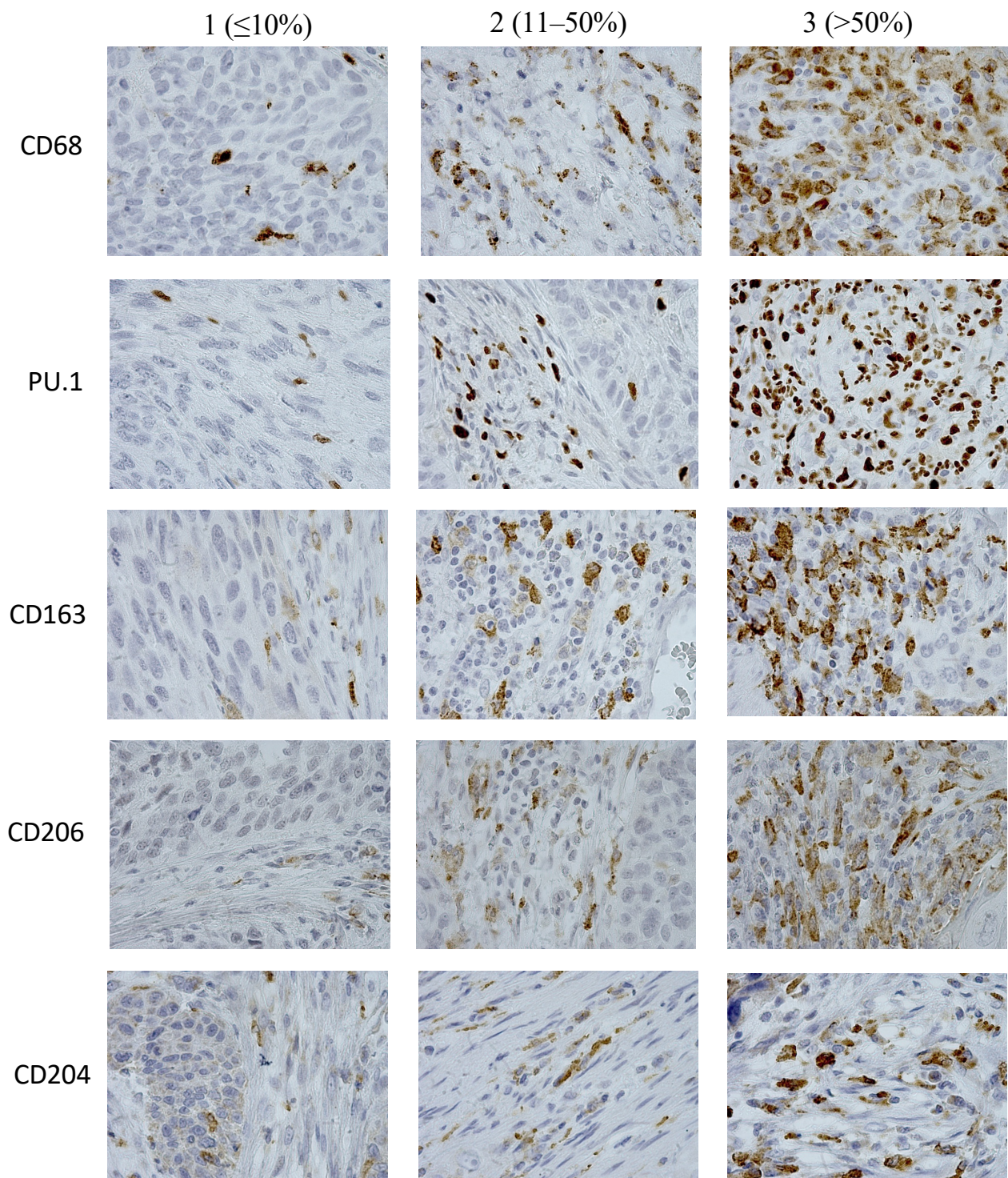
**Таблица 15** – Характеристика пациентов с плоскоклеточным раком пищевода

Характеристика	Всего (n=48)
Возраст (лет), среднее±SD	61,2±8,4
Общая выживаемость (мес), среднее±SD	29,8±32,9
Стадия, n (%)	
• I-II	25 (52%)
• III-IV	23 (48%)
Дифференцировка, n (%)	
• G1-G2	38 (79%)
• G3	10 (21%)
N (наличие регионарных метастазов), n (%)	
• N=0	25 (52%)
• N≥1	23 (48%)
T (размер опухоли), n (%)	
• T1-T2	9 (19%)
• T3-T4	39 (81%)

#### 3.4.1 Клиническая и прогностическая значимость макрофагов различных фенотипов в опухолях плоскоклеточного рака пищевода

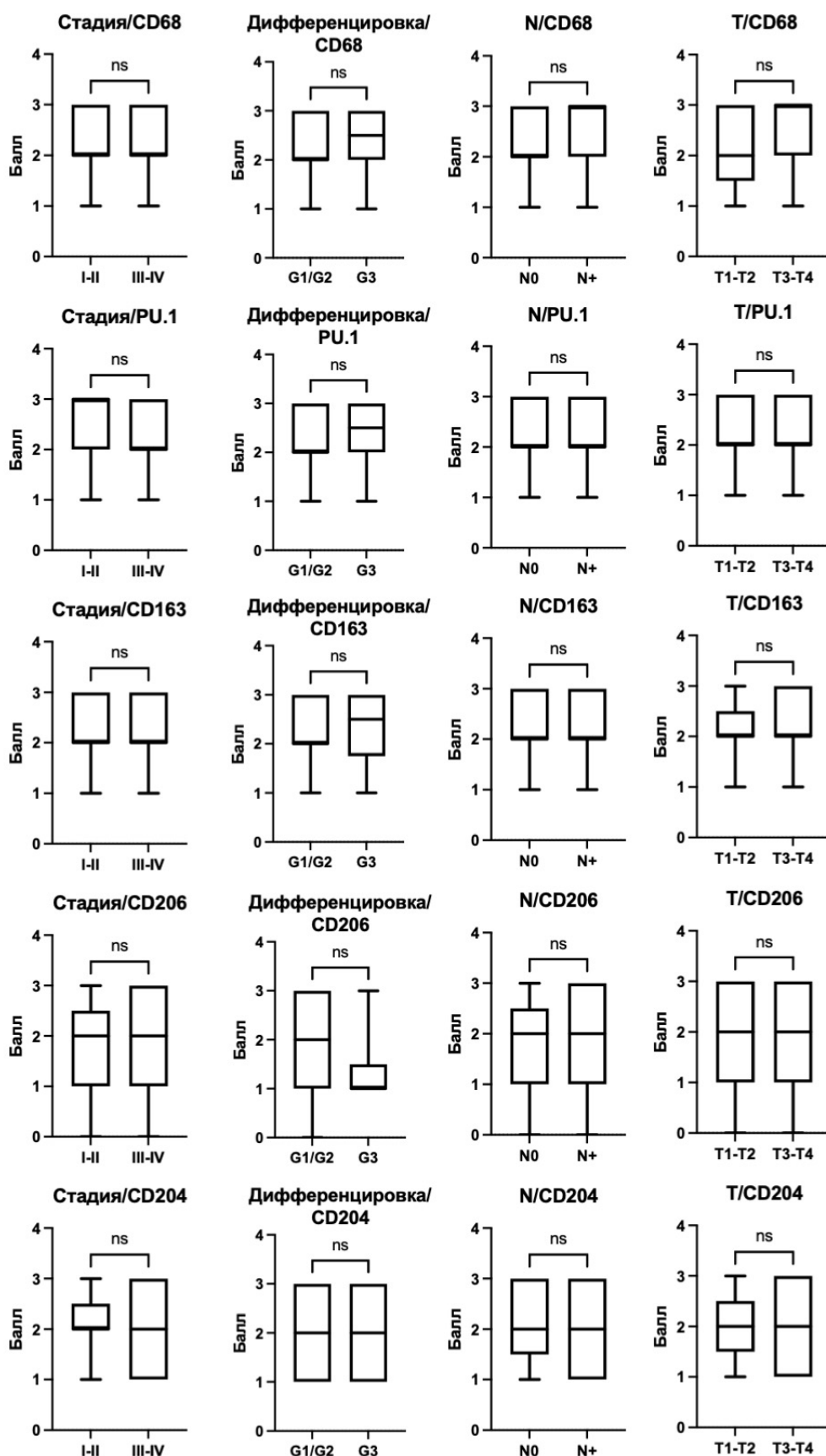
В качестве общих маркеров макрофагов использовали CD68 и PU.1. CD163, CD206 и CD204 использовали в качестве маркеров M2, а iNOS и IDO1 предполагалось использовать как маркеры M1. Показано, что CD68+, PU.1+, CD163+, CD206+ и CD204+ макрофаги располагались как в строме опухоли, так и непосредственно инфильтрировали опухолевые островки. CD68+, PU.1+, CD163+, CD206+ и CD204+ клетки обнаружены в подавляющем большинстве случаев. Примеры окрашиваний представлены на рисунке 50.





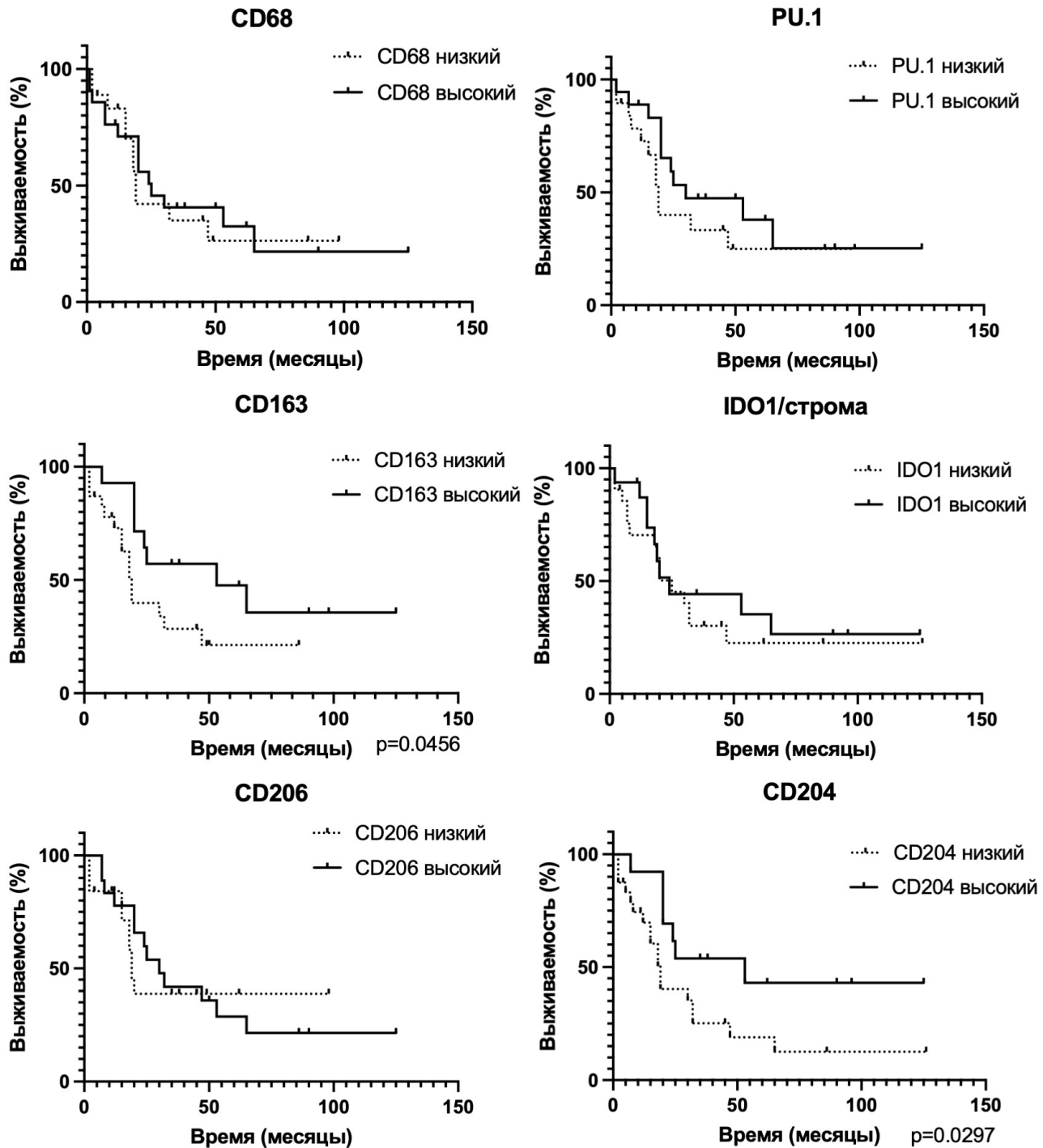
**Рисунок 50** - Пример ИГХ окрашивания образцов плоскоклеточного рака пищевода с помощью антител к CD68, PU.1, CD163, CD206 и CD204 (400x)

Далее проведен анализ ассоциации количества исследованных клеток с клинико-морфологическими характеристиками и прогнозом. Результаты представлены на рисунках 51 и 52.



**Рисунок 51** - Анализ ассоциации содержания CD68+, PU.1+, CD163+, CD206+ и CD204+ клеток в строме опухоли плоскоклеточного рака пищевода с клиничко-морфологическими характеристиками





**Рисунок 52** - Анализ ассоциации содержания CD68+, PU.1+, CD163+, CD206+ и CD204+ клеток в строме опухоли плоскоклеточного рака пищевода с прогнозом заболевания

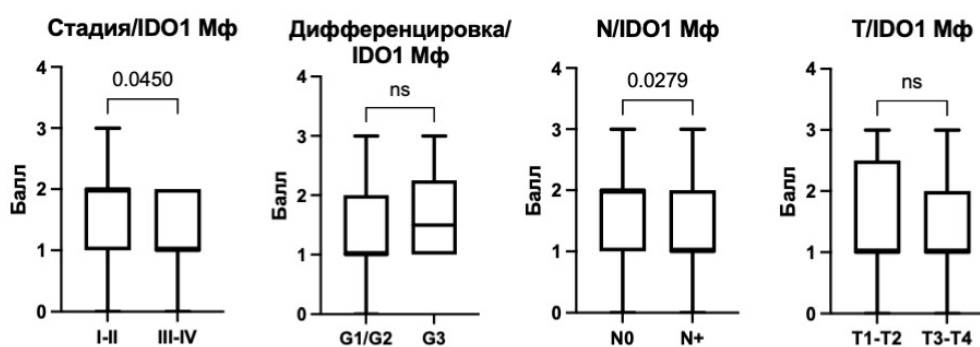
Проведенный анализ показал отсутствие ассоциации содержания макрофагов различного фенотипа с клинико-морфологическими характеристиками. Однако количество CD163+ и CD204+ макрофагов является прогностическим значимым фактором. А именно, большее их содержание ассоциировано с благоприятным прогнозом заболевания. Статистический анализ полученных результатов представлен в таблице 16.

**Таблица 16** – Статистический анализ прогностической значимости макрофагов различных фенотипов в опухолях пищевода

Маркер	Однофакторный анализ		
	ОР	95% ДИ	<i>p</i>
CD68 (высокий/низкий)	0,847	(0,895 - 1,985)	0,7781
PU.1 (высокий/низкий)	0,641	(0,279 - 1,472)	0,2700
CD163 (высокий/низкий)	0,445	(0,196 - 1,010)	0,0456*
CD206 (высокий/низкий)	0,915	(0,399 - 2,100)	0,8292
CD204 (высокий/низкий)	0,418	(0,191 - 0,917)	0,0297*
IDO1/stroma (высокий/низкий)	0,796	(0,362 - 1,749)	0,5640

\*Статистически значимое отличие

На следующем этапе данной части исследования проведен анализ содержания в строме опухоли цитотоксических (M1) макрофагов. Для их выявления использовали маркеры iNOS и IDO1. Однако оказалось, что часть маркеров M1 (iNOS и IDO1), а также некоторых маркеров M2 (PD-L1) экспрессируются опухолевыми клетками пищевода. Важно отметить, что только единичные образцы содержали iNOS<sup>+</sup> клетки в строме опухоли, при этом IDO1 в стромальных клетках обнаруживался в 92% исследованных образцов. Анализ ассоциации экспрессии данного маркера в стромальных клетках с клинико морфологическими характеристиками заболевания представлен на рисунке 53.

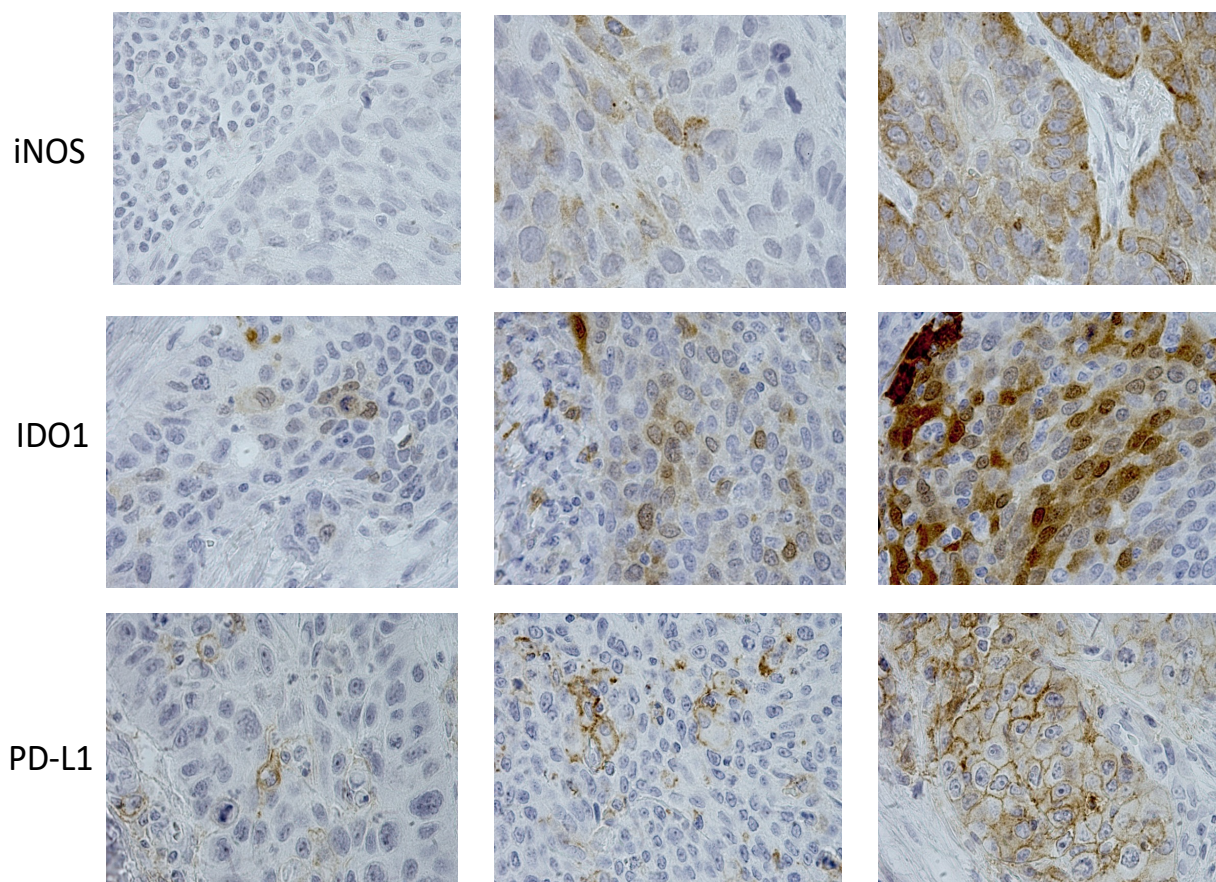


**Рисунок 53** - Анализ ассоциации содержания IDO1<sup>+</sup> клеток в строме опухоли плоскоклеточного рака пищевода с клинико-морфологическими характеристиками и прогнозом

Для экспрессии IDO1 в строме опухоли наблюдалась ассоциация со стадией заболевания ( $p=0,0450$ ) и наличием регионарных метастазов ( $p=0,0279$ ). А именно, на более ранних стадиях и при отсутствии метастазов в лимфоузлах наблюдалось значимо более высокое содержание IDO1<sup>+</sup> макрофагов в опухолевой строме. Прогностическая значимость IDO1<sup>+</sup> клеток в строме опухоли не выявлена.

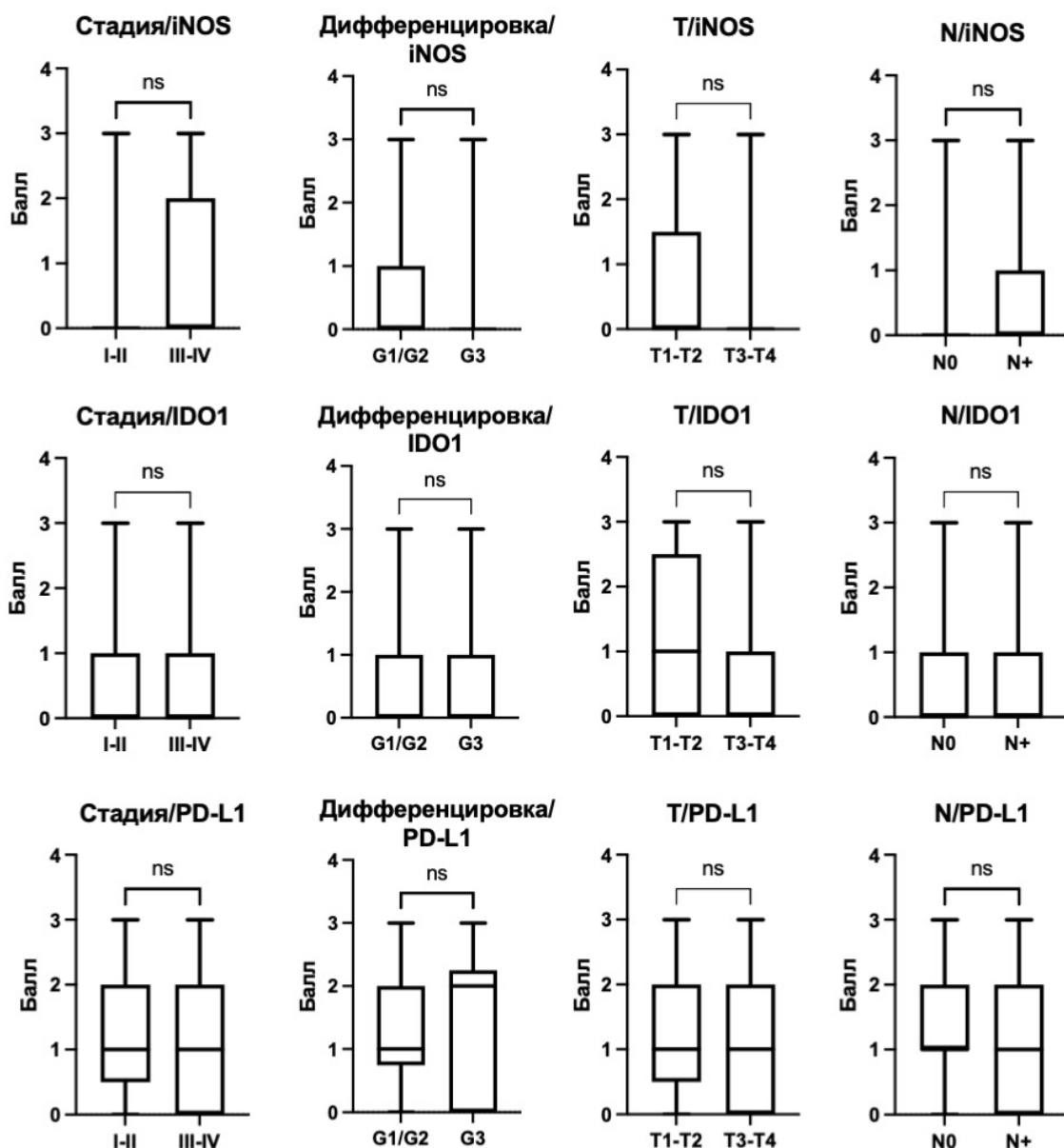
### 3.4.2 Клиническая и прогностическая значимость маркеров макрофагов, экспрессирующихся в опухолевых клетках ПРП

Проведенный анализ продемонстрировал, что ряд маркеров макрофагов экспрессируется также непосредственно в опухолевых клетках пищевода. Показано, что при раке пищевода в опухолевых клетках iNOS экспрессируется в 25% образцов (12 из 48), однако в 5 образцах его экспрессия наблюдалась меньше чем в 1% опухолевых клеток. Также показано, что проанализированные образцы не содержат iNOS+ M1 макрофагов. Таким образом, экспрессия iNOS наблюдается в небольшом количестве образцов и исключительно в опухолевых клетках. Примеры окрашиваний представлены на рисунке 54.



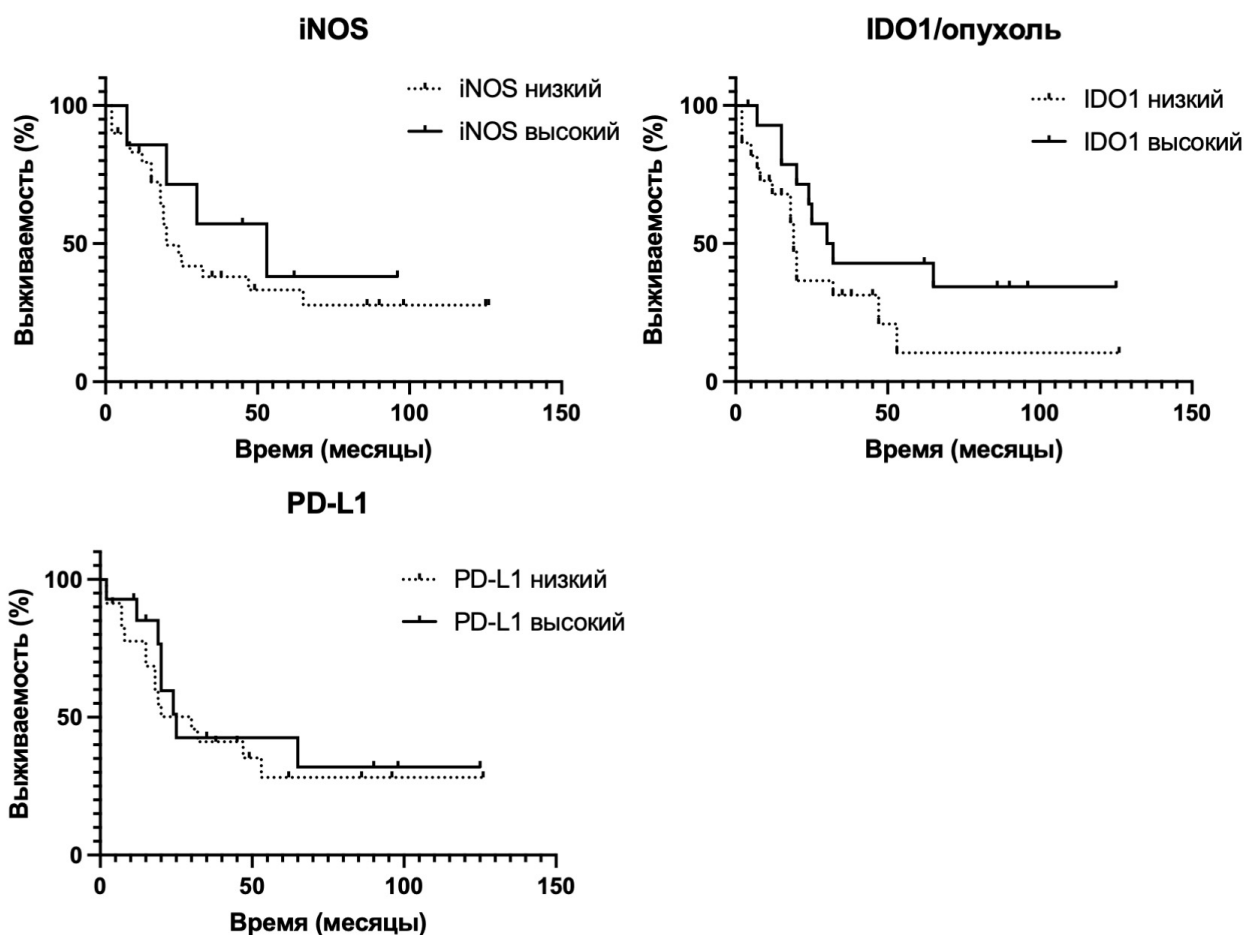
**Рисунок 54** - Пример ИГХ окрашивания образцов плоскоклеточного рака пищевода с помощью антител к iNOS, IDO1 и PD-L1 (400x)

В исследуемой выборке в 75% образцов выявлена экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках. IDO1 в опухолевых клетках был обнаружен в 44% исследованных опухолей. Результаты анализа клинической и прогностической значимости экспрессии iNOS, IDO1 и PD-L1 в опухолевых клетках плоскоклеточного рака пищевода представлены на рисунке 55 и 56.



**Рисунок 55** - Анализ ассоциации экспрессии iNOS, IDO1 и PD-L1 в опухолевых клетках плоскоклеточного рака пищевода с клинко-морфологическими характеристиками

Проведенный анализ не выявил ассоциации экспрессии исследованных белков с клиническими характеристиками и прогнозом. Результаты статистического анализа прогностической значимости экспрессии iNOS, IDO1 и PD-L1 в опухолевых клетках плоскоклеточного рака пищевода представлены в таблице 17.



**Рисунок 56** - Анализ ассоциации экспрессии iNOS, IDO1 и PD-L1 в опухолевых клетках плоскоклеточного рака пищевода с прогнозом заболевания

**Таблица 17** - Статистический анализ прогностической значимости экспрессии iNOS, IDO1 и PD-L1 в опухолях пищевода

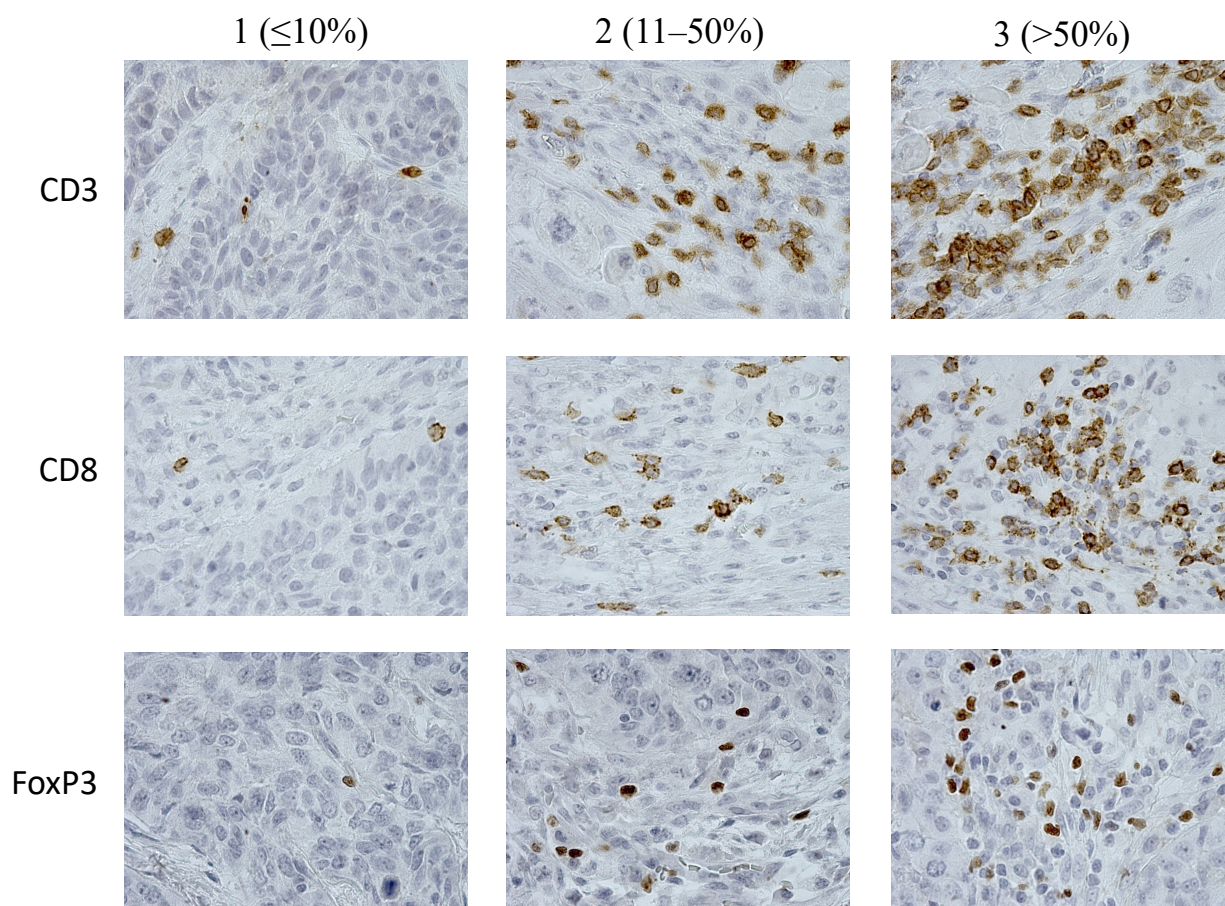
Маркер	Однофакторный анализ		
	ОР	95% ДИ	<i>p</i>
iNOS (высокий/низкий)	0,657	(0,253 - 1,705)	0,4315
IDO1 (высокий/низкий)	0,529	(0,242 - 1,160)	0,1057
PD-L1 (высокий/низкий)	0,791	(0,344 - 1,819)	0,5826

Как видно из представленных данных, экспрессия исследованных маркеров не обладает прогностической значимостью для плоскоклеточного рака пищевода, однако стоит отметить, что экспрессия IDO1 в опухолевых клетках имеет тенденцию указывать на благоприятный прогноз заболевания.



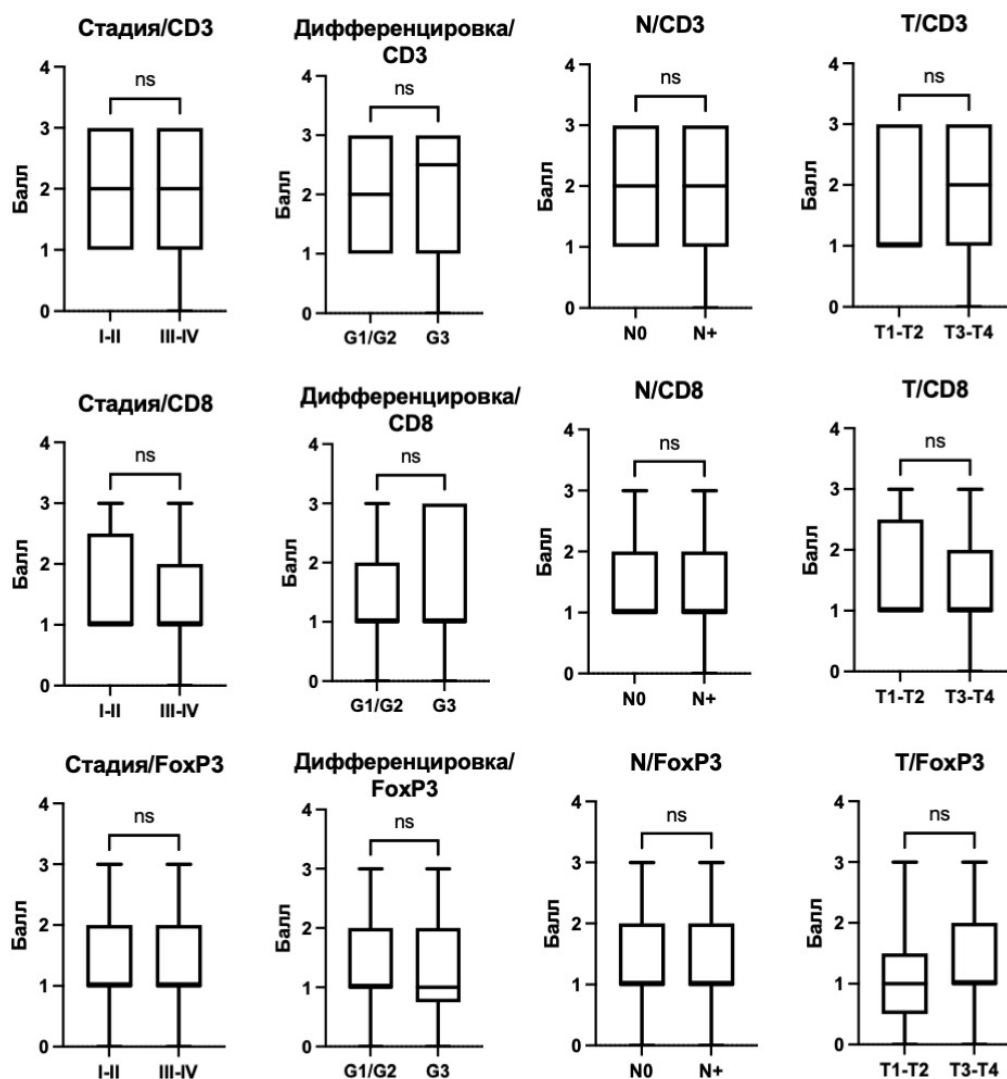
### 3.4.3 Клиническая и прогностическая значимость Т-клеток в опухолях пищевода

Далее проведен анализ содержания Т-клеток в опухолях плоскоклеточного рака пищевода. В большинстве исследованных образцов присутствовало достаточно большое количество CD3+ положительных клеток (в 98% образцов были обнаружены CD3+ клетки), расположенных как в опухолевой строме, так и в опухолевых гнездах. CD8+ клетки обнаруживались в 96% образцов. Примеры окрашиваний приведены на рисунке 57.



**Рисунок 57** - Пример ИГХ окрашивания образцов НМРЛ с помощью антител к CD3, CD8, и FoxP3 (400x)

Далее проведен анализ ассоциации содержания различных типов Т-клеток и клинικο-морфологических характеристик опухоли, а также прогноза заболевания. Результаты представлены на рисунках 58 и 59.



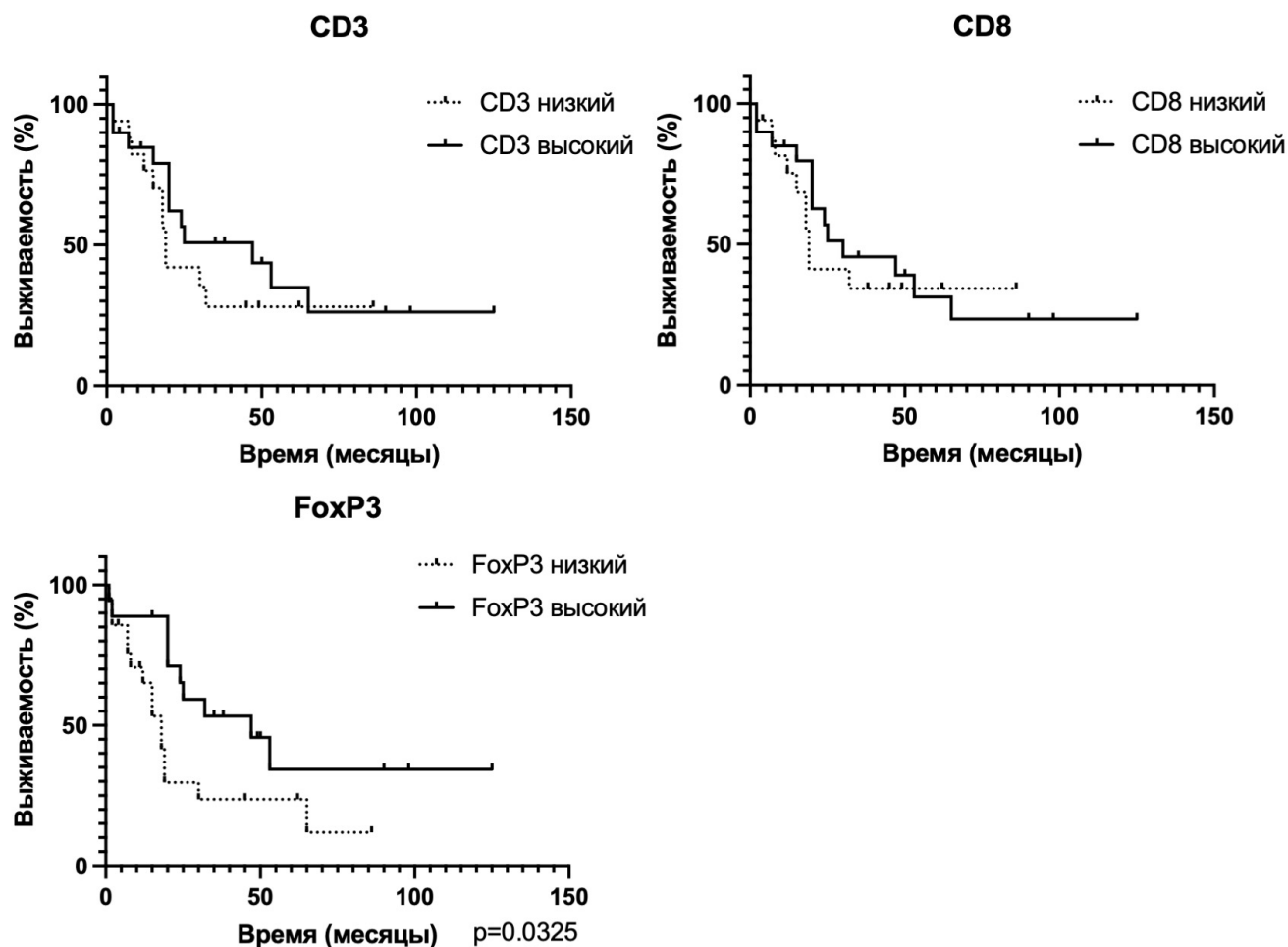
**Рисунок 58** – Анализ ассоциации CD3+, CD8+ и FoxP3+ клеток в строме опухолей плоскоклеточного рака пищевода с клинико-морфологическими характеристиками

Как видно из представленных данных, FoxP3 является благоприятным прогностическим маркером плоскоклеточного рака пищевода (HR=0,0442; p=0,0325). Ассоциации с клиническими характеристиками заболевания не выявлено. Статистический анализ прогностической значимости представлен в таблице 18.

**Таблица 18** - Статистический анализ прогностической значимости CD3+, CD8+ и FoxP3+ клеток в опухолях пищевода

Маркер	Однофакторный анализ		
	HR	95% CI	p
CD3 (высокий/низкий)	0,693	(0,299-1,603)	0,3626
CD8 ((высокий/низкий)	0,806	(0,374-1,869)	0,5979
FOX P3 (высокий/низкий)	0,442	(0,199-0,984)	0,0325*

\*Статистически значимое отличие



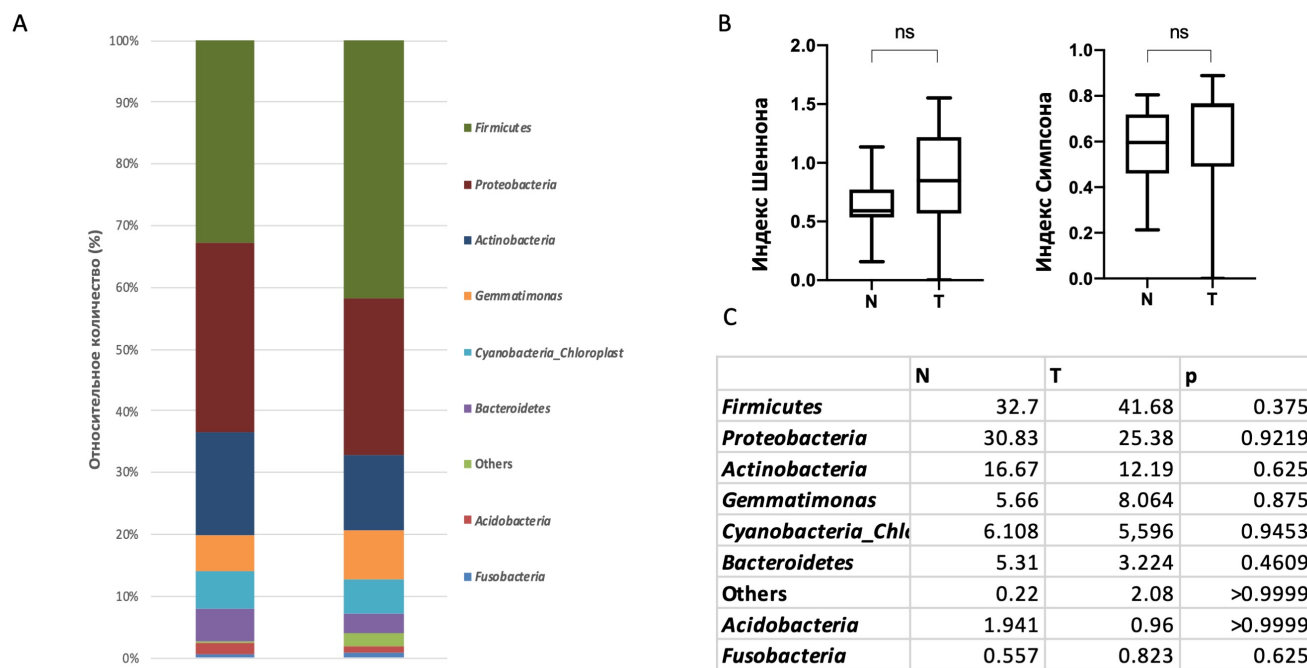
**Рисунок 59** - Анализ прогностической значимости CD3+, CD8+ и FoxP3+ клеток в строме опухолей плоскоклеточного рака пищевода

### 3.5 Таксономический состав микробиома опухолей плоскоклеточного рака пищевода

Анализ таксономического состава микробного сообщества тканей пищевода выявил наличие 7 доминирующих типов, 164 родов и 393 видов. Для дальнейшего анализа учитывались роды бактерий, относительное содержание которых составило более 0,1%. Таких доминирующих родов насчитывалось 71 в нормальной ткани и 106 - в опухолевой.

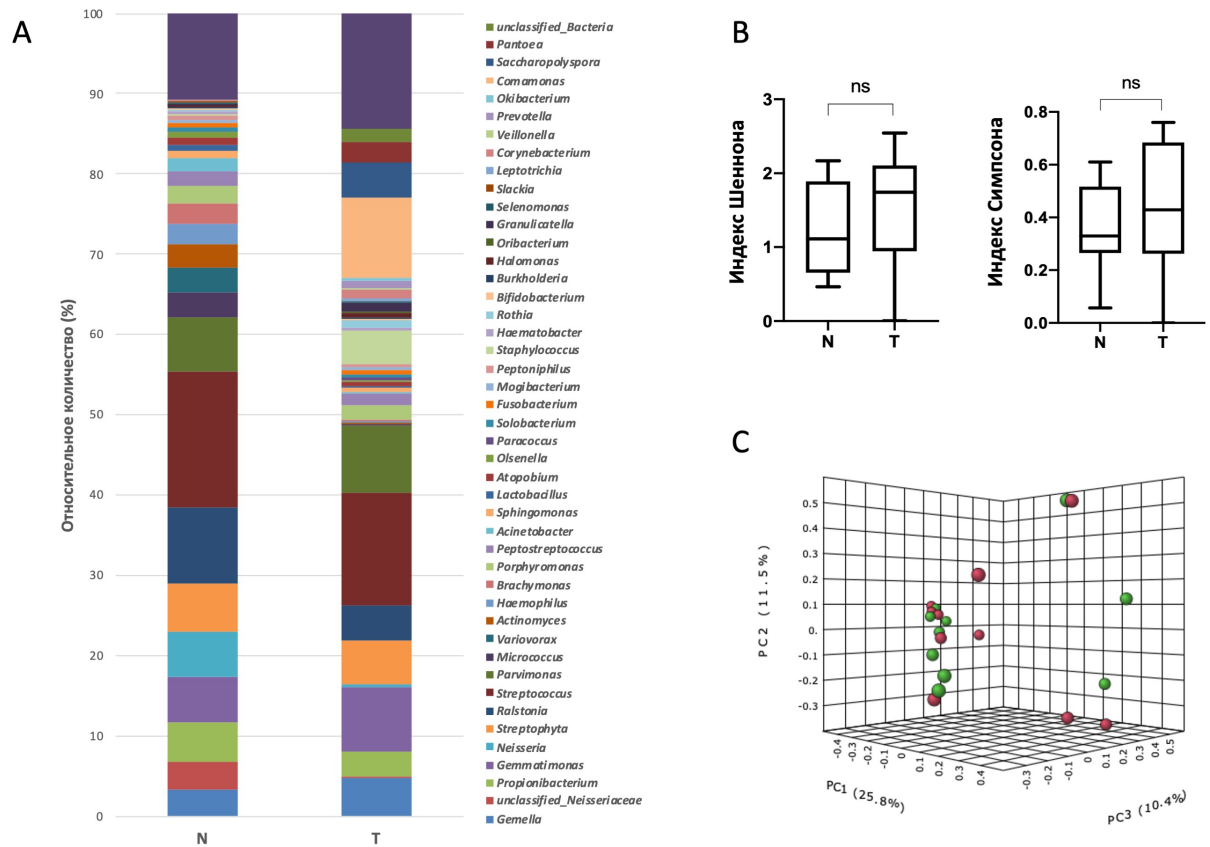
Преобладающими типами микроорганизмов, встречающихся как в опухолях, так и в образцах условно нормальной ткани, являлись *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonas* и *Bacteroidetes*. Результаты представлены на рисунке 60.





**Рисунок 60** - Таксономический состав опухолей пищевода и условно нормальной ткани на уровне типов. Относительное количество типов микроорганизмов в нормальной и опухолевой ткани пищевода (A). Анализ  $\alpha$ -разнообразия (индексы Шеннона и Симпсона) в опухолях пищевода и условно нормальной ткани на уровне типов (B). Таксономический состав опухолей пищевода на уровне типов (C)

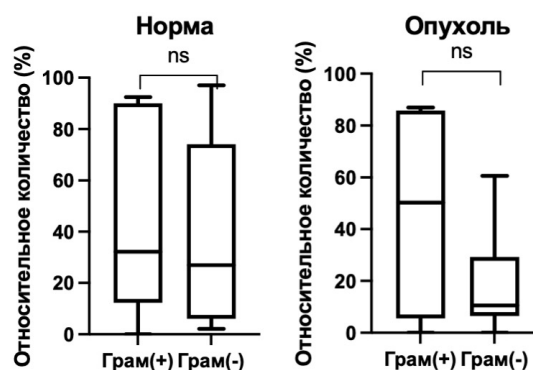
Значительных отличий в микроорганизмах, встречающихся в образцах, на уровне типов не выявлено. Показано отсутствие таксономического разнообразия между опухолевой и нормальной тканью (индексы Шеннона и Симпсона). Далее проведен таксономический состав микробного сообщества на уровне родов. Результаты представлены на рисунке 61.



**Рисунок 61** - Таксономический состав опухолей пищевода и условно нормальной ткани на уровне родов. Относительное количество родов микроорганизмов в нормальной и опухолевой ткани пищевода (A). Анализ  $\alpha$ -разнообразия (индексы Шеннона и Симпсона) в опухолях пищевода и условно нормальной ткани на уровне родов (B). Анализ  $\beta$ -разнообразия опухолях пищевода и условно нормальной ткани на уровне родов [PERMANOVA] F-value: 0.50161; R-squared: 0.027111; p-value < 0.974 (C)

Самыми представленными родами микроорганизмов, обнаруженные в опухолевой и нормальной ткани пищевода являлись роды *Streptococcus*, *Parvimonas*, *Gemmatimonas*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*. Анализ  $\alpha$ -разнообразия (индексы Шеннона и Симпсона) и анализ  $\beta$ -разнообразия на уровне родов отличий не выявил. Отличий в относительном содержании различных родов бактерий между нормальной и опухолевой тканью выявлено не было, за исключением рода *Staphylococcus*. Относительное содержание бактерий рода *Staphylococcus* в опухолевой ткани было выше по сравнению с условной нормой (*Supplementary Table 1*). Так как бактерии рода *Staphylococcus* оказались единственным родом, отличающимся по своему содержанию в группах опухолевой и нормальной ткани, далее данная группа была проанализирована на уровне видов. По результатам анализа оказалось, что в исследованных образцах присутствуют 2 вида бактерий данного рода, а именно, *Staphylococcus pasteurii* и *Staphylococcus warneri*.

Далее проведен анализ относительного количества грамположительных и грамотрицательных бактерий в опухолевой и нормальной ткани пищевода (Рисунок 62).



**Рисунок 62** - Относительное содержание грам-положительных и грам-отрицательных бактерий в условно нормальной и опухолевой ткани пищевода

Показано, что в нормальной ткани наблюдается приблизительно одинаковое количество грамположительных и грамотрицательных бактерий, в то время как в опухолях наблюдается тенденция к снижению содержания грамотрицательных микроорганизмов.

### 3.6 Комплексный анализ микробиологической и иммунологической составляющих опухолевой стромы в прогрессии опухолей пищевода

Далее проведен анализ альфа-разнообразия микробиома пищевода в зависимости от фенотипа опухолевой стромы. Результаты представлены в таблице 19.

**Таблица 19** - Анализ  $\alpha$ -разнообразия в зависимости от фенотипа воспалительного инфильтрата

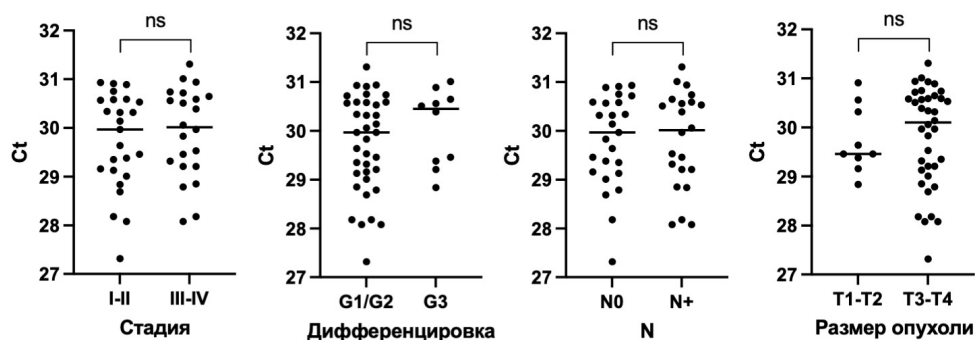
	Индекс Шеннона $\pm$ SD			Индекс Симпсона $\pm$ SD		
	низкий	высокий	p	низкий	высокий	p
CD68	2.029 $\pm$ 0.15	1.084 $\pm$ 0.35	0,0556	0,7650 $\pm$ 0.03	0,4889 $\pm$ 0.14	0,1508
PU.1	1,953 $\pm$ 0.14	0,962 $\pm$ 0.31	0,1143	0,7643 $\pm$ 0.03	0,4210 $\pm$ 0.15	0,1143
CD163	1,674 $\pm$ 0.30	1,282 $\pm$ 0.39	0,5167	0,6552 $\pm$ 0.11	0,5612 $\pm$ 0.10	0,5167
CD206	1,493 $\pm$ 0.24	1,599 $\pm$ 0.38	0,4762	0,6690 $\pm$ 0.08	0,5990 $\pm$ 0.13	0,7619
CD204	1,935 $\pm$ 0,21	0,962 $\pm$ 0.42	0,2000	0,7912 $\pm$ 0.03	0,4210 $\pm$ 0.16	0,2000
PD-L1	1,717 $\pm$ 0.36	1,316 $\pm$ 0.25	0,2571	0,6731 $\pm$ 0.11	0,5195 $\pm$ 0.06	0,1167
iNOS	1,752 $\pm$ 0.24	1,101 $\pm$ 0.39	0,1833	0,6783 $\pm$ 0.06	0,5073 $\pm$ 0.21	0,6667
IDO1	1,764 $\pm$ 0.24	0,501 $\pm$ 0.49	0,1429	0,7214 $\pm$ 0.06	0,2603 $\pm$ 0.26	0,1429
CD3	1,874 $\pm$ 0.09	1,081 $\pm$ 0.31	0,2571	0,7434 $\pm$ 0.02	0,4524 $\pm$ 0.11	0,2571
CD8	1,970 $\pm$ 0.12	0,593 $\pm$ 0.30	0,0167*	0,7642 $\pm$ 0.02	0,3069 $\pm$ 0.15	0,0167*
FOXP3	1,584 $\pm$ 0.29	1,447 $\pm$ 0.41	0,8889	0,6244 $\pm$ 0.10	0,6374 $\pm$ 0.11	0,5333

\*Статистически значимо

Показано, что в группах с высоким и низким содержанием макрофагов (как M1, так и M2) отличий альфа-разнообразия микробиома не наблюдается. При анализе воспалительного инфильтрата со стороны Т-клеток показано, что группы с высоким и низким содержанием цитотоксических Т-клеток отличаются по своему альфа-разнообразию, а именно, в группе с большим содержанием CD8+ клеток наблюдается значимое снижение индекса разнообразия.

Наличие CD8 в опухолях обратно коррелирует с содержанием бактерий рода *Staphylococcus* ( $r = -0,784$ ,  $p = 0.011$ ). Относительное количество бактерий данного рода значимо снижается в группе опухолей с высоким содержанием CD8. Возможно, это влечет за собой изменение индекса Шеннона, так как снижение данного индекса свидетельствует о снижении разнообразия и увеличении доминирования определенных родов. Для подтверждения увеличения доминирования отдельных родов мы посчитали также индекс Симпсона. Он также был значимо снижен в группе опухолей с высокой инфильтрацией CD8+ клеток.

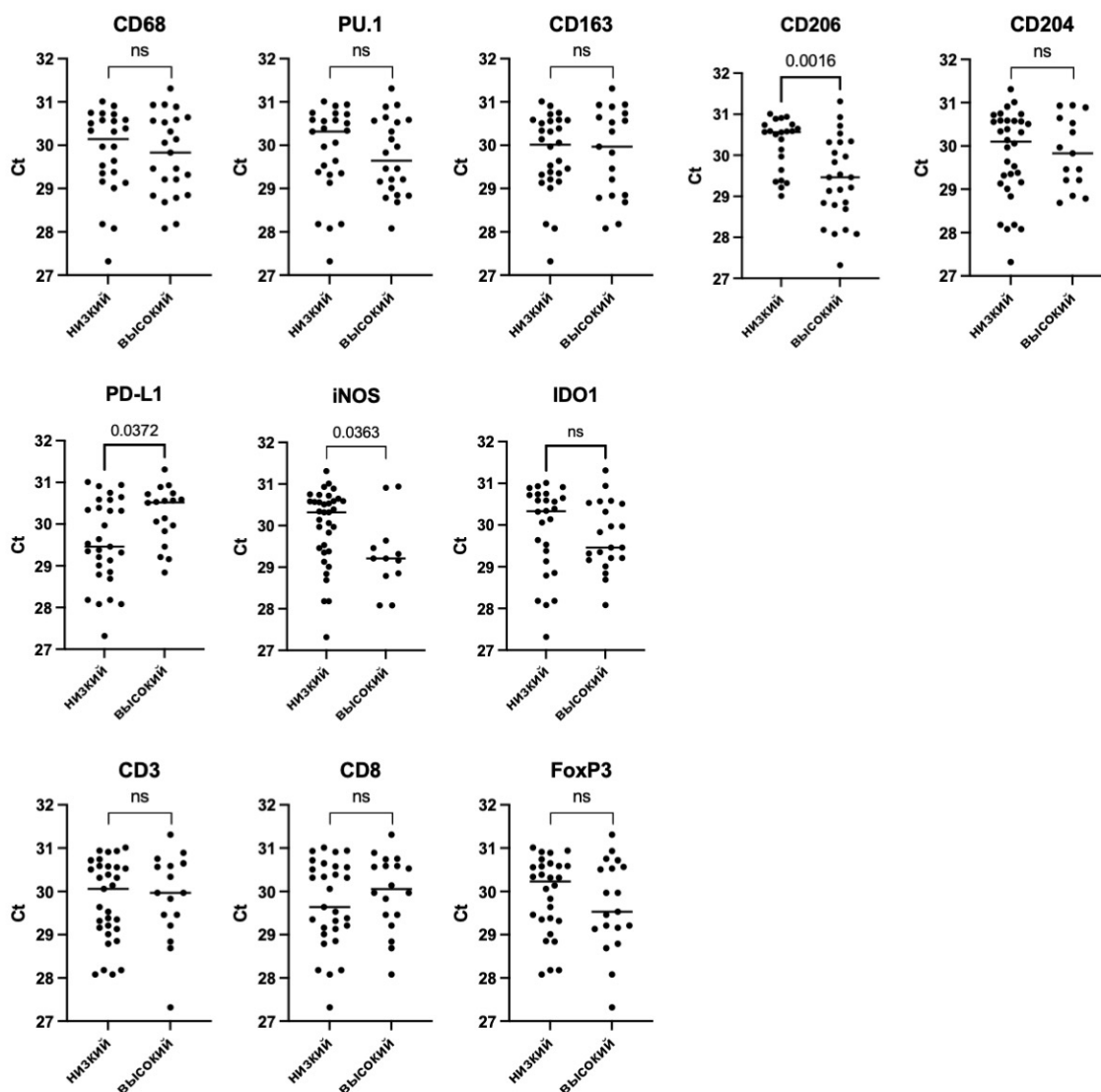
Далее проведен количественный анализ общей бактериальной нагрузки в опухолях в зависимости от клиничко-морфологических характеристик. Результаты представлены на рисунке 63.



**Рисунок 63** - Анализ общей бактериальной нагрузки в зависимости от клиничко-морфологических характеристик опухоли

Ассоциации между общим содержанием бактерий и клиничко-морфологическими характеристиками опухолей пищевода не выявлено.

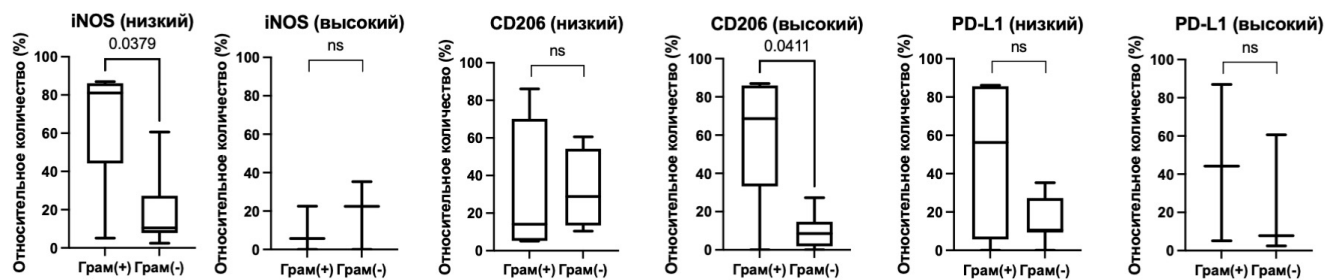
Далее проведен количественный анализ общей бактериальной нагрузки в опухолях в зависимости от фенотипа клеток стромы. Результаты представлены на рисунке 64.



**Рисунок 64** - Анализ ассоциации общей бактериальной нагрузки в опухолях пищевода с и фенотипом опухолевой стромы

Как видно из представленных графиков, ассоциация между уровнем бактериальной нагрузки и фенотипом опухолевой стромы наблюдается для CD206, iNOS и PD-L1. А именно, группа опухолей, характеризующаяся большим содержанием CD206 в строме и iNOS в опухоли, характеризуется большей бактериальной нагрузкой в целом. Интересно отметить, что в группе опухолей, характеризующейся высокой экспрессией PD-L1, наблюдалось более низкий уровень общей бактериальной нагрузки по сравнению с группой опухолей с низкой экспрессией PD-L1. Далее показано, что в группе с большим содержанием CD206 макрофагов наблюдается преобладание грамположительных бактерий над грамотрицательными. Для iNOS наблюдается противоположная картина. А именно в группе опухолей с низкой экспрессией iNOS наблюдается преобладание грамположительных бактерий над грамотрицательными. В группе с высоким

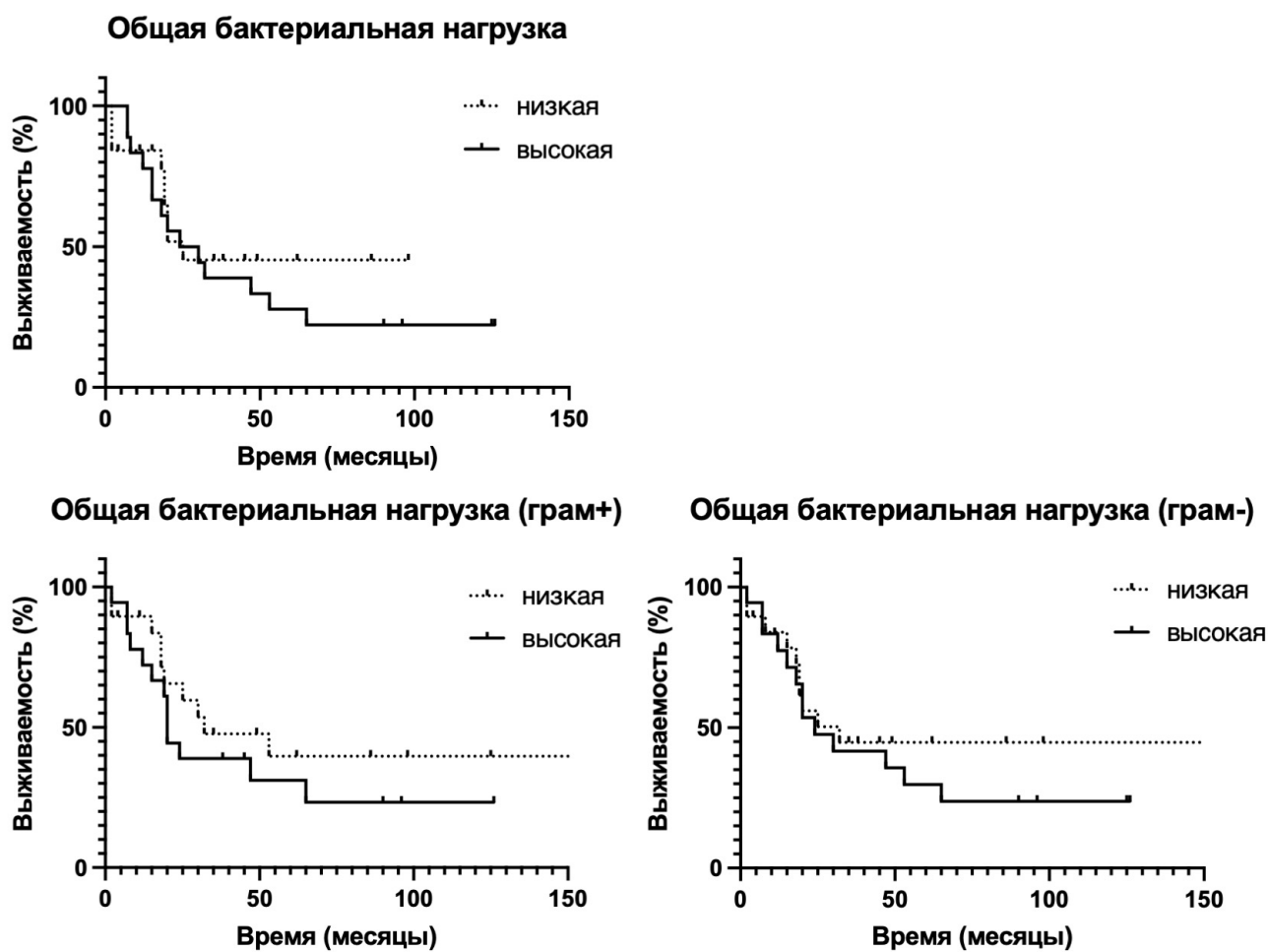
содержанием iNOS наблюдается обратная тенденция. Для PD-L1 таких закономерностей не выявлено. Результаты представлены на рисунке 65.



**Рисунок 65** - Относительное содержание грамположительных и грамотрицательных бактерий в зависимости от экспрессии iNOS, PD-L1 и количества CD206 положительных клеток в опухолях пищевода

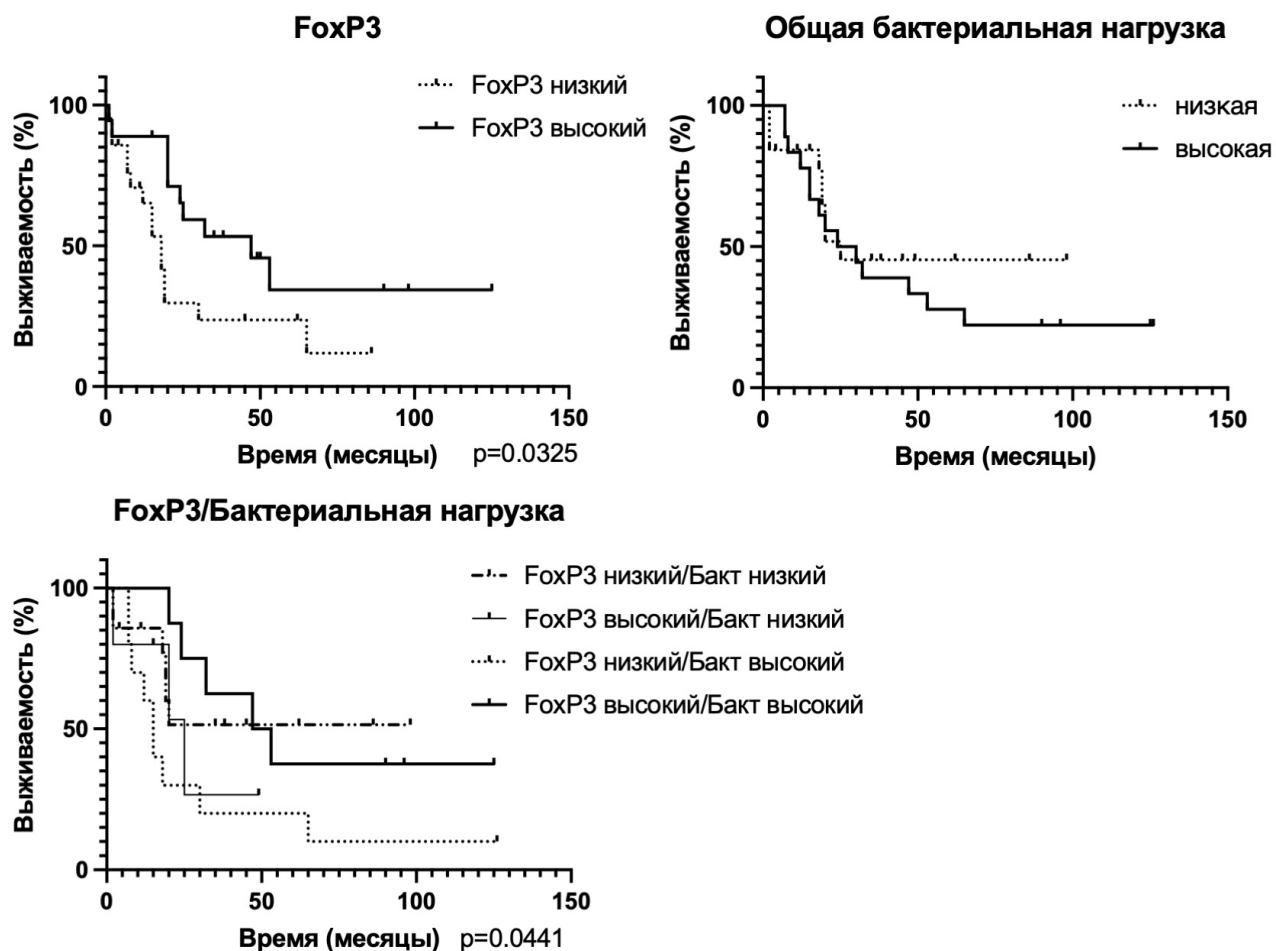
Для анализа корреляций микробиома (на уровне родов) с фенотипом опухолевой стромы выбрали те роды, относительное количество которых больше, чем 0.5% и встречается более, чем в 1 образце. С использованием этих критериев в анализ включили 45 родов. Анализ проводили с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Ранее показано, что в группе опухолей с большим содержанием CD206+ клеток наблюдается большее количество бактерий. Родовой анализ показал обратную корреляцию между содержанием CD206+ клеток и грамотрицательных бактерий родов *Burkholderia* и *Gemmatimonas* ( $r=-0,742$ ,  $p=0,033$ ;  $r=-0,742$ ,  $p=0,033$  соответственно), а также прямую корреляцию между содержанием CD206+ клеток и грамотрицательных бактерий рода *Sphingomonas* ( $r=-0,778$ ;  $p=0,013$ ). Для опухолей с высокой экспрессией PD-L1 наблюдалась обратная корреляция между содержанием PD-L1+ опухолевых клеток и грамотрицательных бактерий родов *Haemophilus*, *Halomonas* и *Neisseria* ( $r=-0,560$ ,  $p=0,016$ ;  $r=-0,560$ ,  $p=0,032$ ;  $r=-0,470$ ,  $p=0,044$ ).

Далее проведен анализ выживаемости пациентов в зависимости от общей бактериальной нагрузки в опухолях, содержания грамположительных и грамотрицательных бактерий и стромальных маркеров с помощью построения кривых дожития Каплан-Мейера. Результаты представлены на рисунке 66.



**Рисунок 66** - Выживаемость пациентов с плоскоклеточным раком пищевода в зависимости от общей бактериальной нагрузки

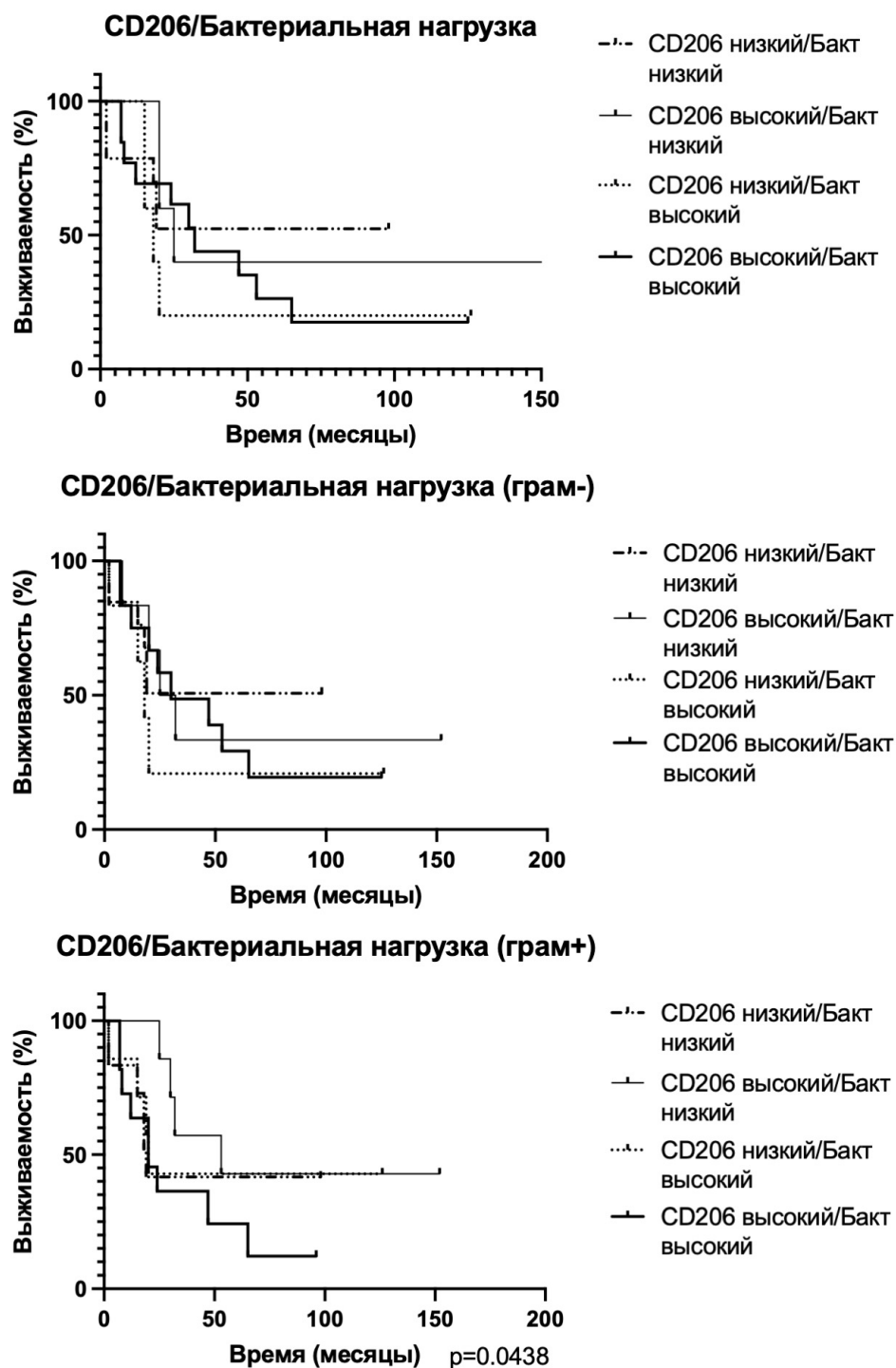
Как видно из представленных графиков, общая бактериальная нагрузка не является прогностически значимым параметром для плоскоклеточного рака пищевода. Далее проведен анализ выживаемости в зависимости от общей бактериальной нагрузки и фенотипа опухолевой стромы. Ранее показано, что FoxP3 является благоприятным прогностическим маркером рака пищевода. При добавлении оценки бактериальной нагрузки в этих опухолях обнаружено, что FoxP3 является маркером благоприятного прогноза в группе опухолей с высокой бактериальной нагрузкой ( $HR=0,3534$ ;  $p=0,0441$ ), в то время как в опухолях с низкой бактериальной нагрузкой он прогностически не значим. Результаты представлены на рисунке 67. Для других проанализированных маркеров закономерностей связи выживаемости с уровнем бактериальной нагрузки не выявлено.



**Рисунок 67** - Выживаемость пациентов с плоскоклеточным раком пищевода в зависимости от общей бактериальной нагрузки и экспрессии FoxP3

Проведенный ранее анализ выявил корреляционную связь между содержанием CD206 в опухолях и общей бактериальной нагрузкой. Однако анализ выживаемости в зависимости от содержания CD206 и общей бактериальной нагрузки не выявил закономерностей. Также мы показали, что в опухолях, характеризующихся высоким содержанием CD206, преобладают грамположительные бактерии, поэтому мы провели анализ выживаемости в группах в зависимости от содержания CD206 вместе с грамположительными или грамотрицательными микроорганизмами. Результаты представлены на рисунке 68.





**Рисунок 68** - Выживаемость пациентов с ESCC в зависимости от бактериальной нагрузки и CD206+ макрофагов

При анализе выживаемости в зависимости от содержания CD206 и грамположительных бактерий оказалось, что именно при такой комбинации (CD206 высокий/грам+ высокий) прогноз наиболее неблагоприятный в сравнении с группой (CD206 высокий/грам+ низкий) (HR=2,651;  $p=0,0438$ ). Таким образом, анализ содержания различных бактерий в опухоли может являться прогностическим фактором при определенном фенотипе клеток микроокружения.

### **3.7 Механизмы отбора опухолевых клеток под воздействием цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета**

Проведенное на предыдущем этапе работы исследование выявило новые и интересные закономерности между фенотипом клеток стромы опухолей различных нозологий и их микробиологической составляющей. Поэтому следующая часть данного исследования посвящена поиску и изучению механизмов взаимовлияния микробиома и локального внутриопухолевого иммунитета, а именно, механизмов формирования цитотоксичности и/или толерантности макрофагов под воздействием бактерий опухолевой стромы и механизмов отбора опухолевых клеток под воздействием цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета.

#### **3.7.1 Получение модели опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток**

Для указанной задачи использована модель, разработанная автором данного исследования, основанная на кокультивировании опухолевых клеток с цитотоксическими макрофагоподобными клетками (M1) для получения клеточных линий, устойчивых к их цитотоксическому действию. Для работы были использованы следующие клеточные линии: моноцитарная клеточная линия THP-1; клеточные линии НМРЛ: Н1975, Н1299 и Н292; рака почки А498 и рака предстательной железы РС3 и DU145.

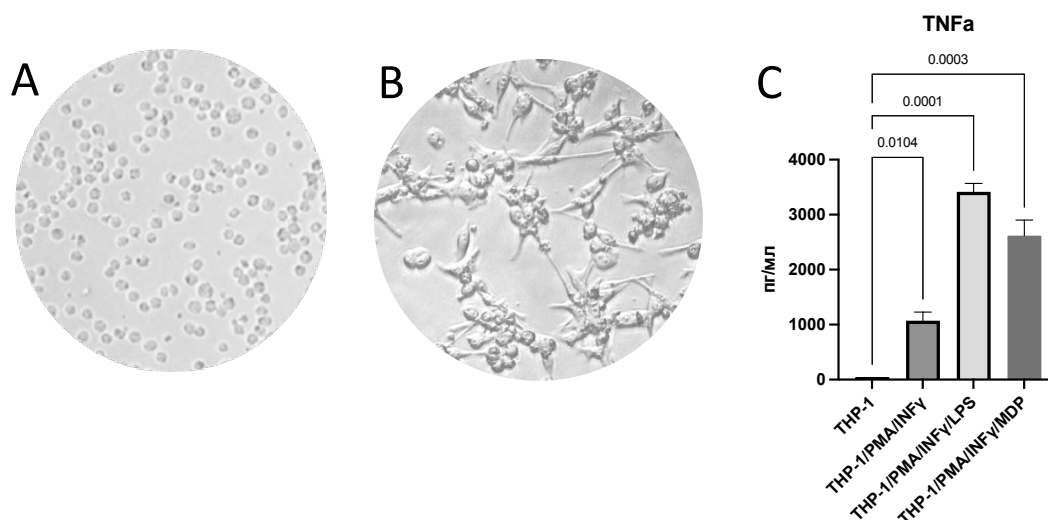
Поскольку планируемые эксперименты требовали достаточно долгого культивирования клеток *in vitro* и предполагали кокультивирование клеток, первым этапом работы было получение стабильной популяции клеток THP-1 с конститутивной экспрессией GFP. Для этого был использован ретровирусный вектор рLXSN, содержащий полноразмерную транскрибируемую область GFP, полученный ранее в лаборатории.

Следующим этапом работы было получение поликлональных клеточных линий, стабильно экспрессирующих GFP. Для этого клетки GP2-293 трансфицировались ретровирусными конструкциями совместно с плазмидой рVSVG, кодирующей G-белок вируса везикулярного стоматита, с помощью реагента «Lipofectamin 2000» (Invitrogen), согласно протоколу производителя. В результате были получены дефектные по репликации ретровирусные частицы, тропные к большинству клеток млекопитающих. Среду от трансфицированных клеток, содержащих вирусные частицы, отбирали и использовали для инфекции клеточной линии THP-1 с последующей селекцией на антибиотике. Результаты инфекции проверяли при помощи иммунофлуоресценции.

На первом этапе работы проводился подбор условий для получения цитотоксических макрофагоподобных клеток из клеточной линии THP-1 (далее THP-1/M1-макрофаги). Для этого

были использованы следующие реагенты: PMA (67 мкМ), IFN $\gamma$  (0,1 мкг/мл), LPS 0,1 (мкг/мл), MDP 0,1 (мкг/мл). Необходимо отметить, что концентрации веществ подобраны таким образом, что THP-1 погибают после стимуляции в течение 5-7 дней и не образуют смешанную популяцию клеток. Контроль отсутствия THP-1 M1 макрофагов в культуре клеток проводили с помощью иммунофлуоресценции.

Получение цитотоксического фенотипа THP-1 M1 макрофагов подтверждено путем анализа экспрессии TNF $\alpha$  методом иммуноферментного анализа. Результаты представлены на рисунке 69.

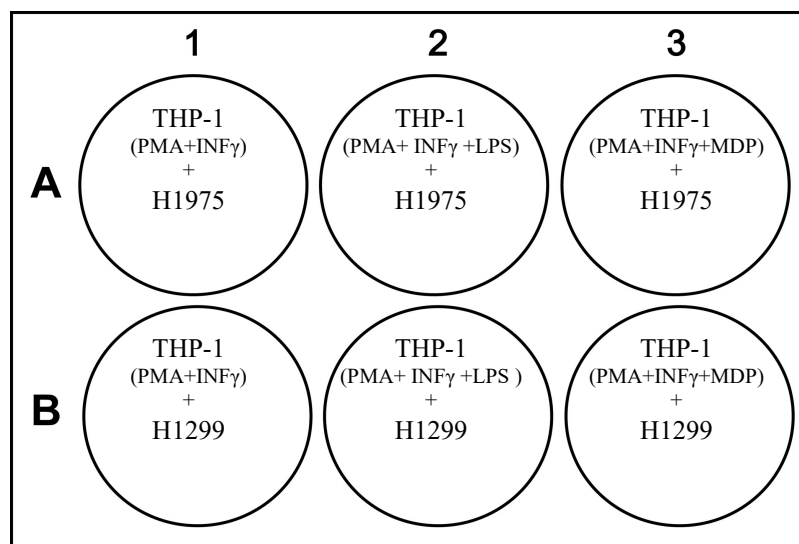


**Рисунок 69** – Изменение фенотипа (А – THP-1, В – THP-1/PMA/ IFN $\gamma$ /LPS) и анализ продукции TNF $\alpha$  макрофагоподобными клетками под воздействием PMA, IFN $\gamma$ , LPS и MDP (С)

Проведенный анализ показал, что под воздействием всех используемых веществ, а в особенности LPS, клетки THP-1 начинают активно производить фактор некроза опухоли, что соответствует цитотоксическому фенотипу макрофагов.

Для получения опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток, в лаборатории была разработана уникальная модель кокультивирования *in vitro*. Кокультивирование проводилось по следующему протоколу:

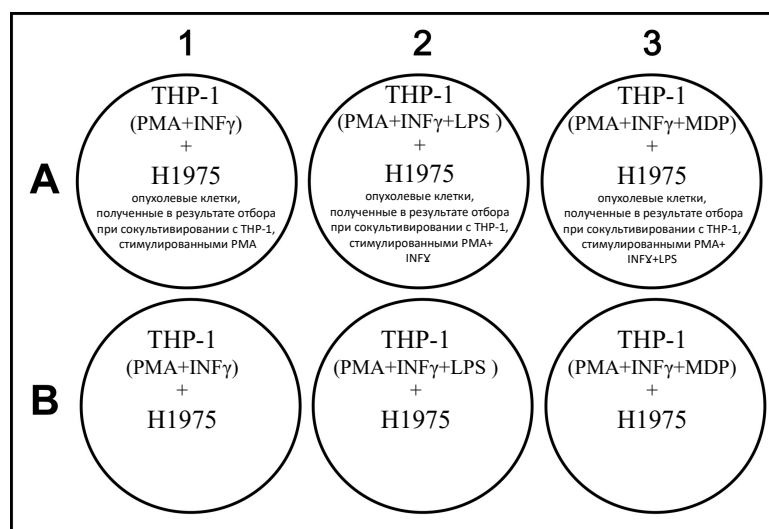
- 1–е сутки: клетки THP-1 рассаживались в 6-ти луночные культуральные планшеты в количестве  $4 \cdot 10^5$  с добавлением IFN $\gamma$  и PMA в соответствующих концентрациях;
- 2–е сутки: добавление LPS и MDP в соответствующие лунки в соответствующих концентрациях;
- 3–е сутки: отмывка полученных макрофагов от добавленных веществ; высаживание опухолевых клеток в количестве  $4 \cdot 10^4$ . В работе использованы клеточные линии НМРЛ Н1975, Н1299 и Н292, рака почки А498. Схема кокультивирования представлена на рисунке 70.



**Рисунок 70** - Схема кокультивирования макрофагоподобных и опухолевых клеток

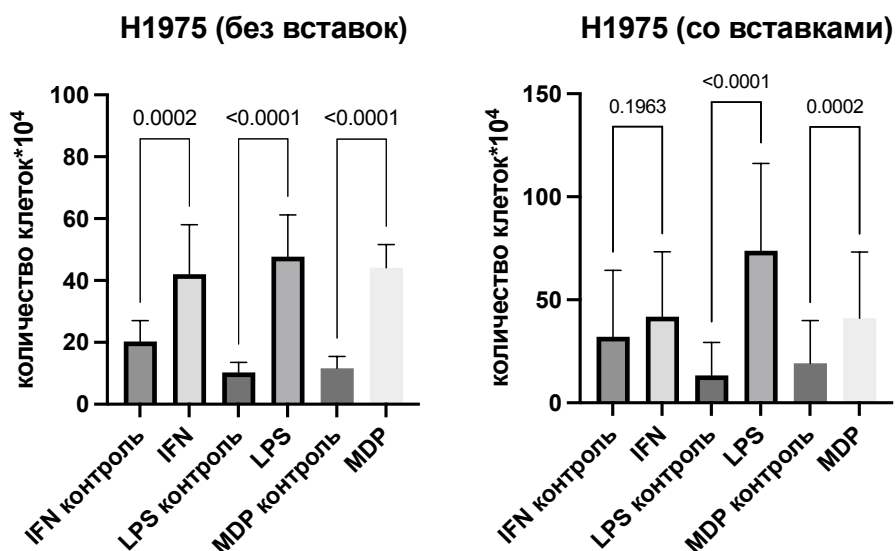
Один эксперимент включает в себя три раунда кокультивирования, т.е. после первого раунда остаются устойчивые опухолевые клетки, которые затем используются для кокультивирования со вновь стимулированными макрофагоподобными клетками. После прохождения 3 раундов кокультивирования полученные клетки проверяются на приобретение устойчивости к цитотоксической активности. В случае подтверждения их устойчивости полученные клеточные линии используются для проведения дальнейших экспериментов.

Проверка устойчивости к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток проводится аналогично методике их получения. В качестве контроля используются исходные клеточные линии. Схема эксперимента представлена на рисунке 71.



**Рисунок 71** - Схема эксперимента по проверке устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности THP-1/M1 макрофагов на примере клеточной линии H1975

Помимо прямого кокультивирования аналогичная серия экспериментов проводилась с использованием культуральных вставок с полупроницаемой мембраной с размером пор 3 мкм, которые позволяют осуществлять совместное культивирование клеток в лунке при отсутствии их прямого взаимодействия. В результате проведенных экспериментов были получены клеточные линии опухолей различных нозологий, устойчивые к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток. Результаты представлены на рисунке 72.



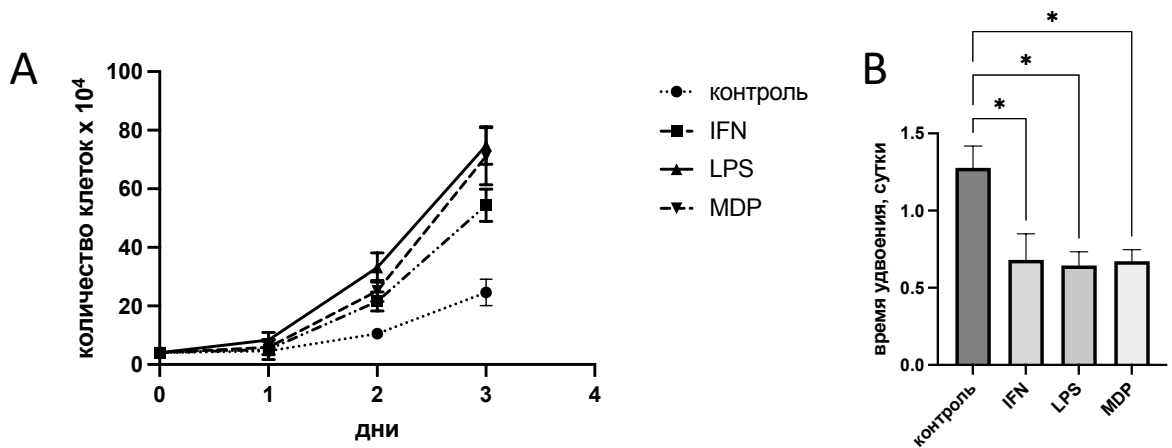
**Рисунок 72** – Сравнительный анализ чувствительности исходных и производных клеточных линий к цитотоксической активности на примере клеточной линии H1975

В результате проведенных исследований были получены производные сублинии НМРЛ, рака простаты и рака почки, устойчивые к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток. Полученные сублинии были использованы в дальнейшей работе для изучения основных клеточных характеристик *in vitro* и *in vivo*, а также для анализа транскриптома и для выявления механизмов, вовлеченных в приобретение клетками новых свойств. Стоит отметить, что полученные клетки сохраняют свой устойчивый фенотип при длительной культивации. Результаты проведенных экспериментов продемонстрировали, что по истечении 6 месяцев культивирования полученные клетки сохранили свой устойчивый фенотип.

### 3.7.2 Определение основных клеточных характеристик полученных клеточных линий *in vitro*

#### 3.7.2.1 Исследование динамики роста полученных культур

Одной из основных характеристик злокачественных клеток является повышенная скорость деления. Анализ динамики роста клеточных линий проводился при помощи прямого подсчета количества клеток в камере Горяева каждые 24 часа на протяжении 5 дней. Эксперимент повторяли дважды для каждой линии в двух независимых повторах (Рисунок 73).



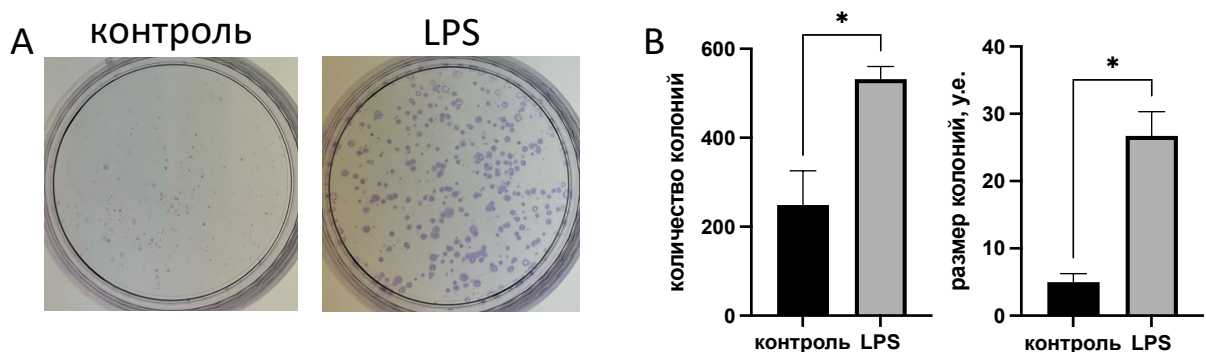
**Рисунок 73** - Динамика роста (А) и среднее время удвоения (В) клеток производных и контрольных линий на примере клеточной линии НМРЛ Н1975

Следует отметить, что исходная клеточная линия Н1975 делится очень интенсивно. Время удвоения для контрольной линии Н1975 составило приблизительно 1,3 суток. Производные данной клеточной линии, устойчивые к цитотоксической активности статистически достоверно делится быстрее контрольной линии – среднее время удвоения составляет 0, 6 суток.

Полученные результаты свидетельствуют об изменении скорости пролиферации полученных сублиний, устойчивых к цитотоксической активности.

### 3.7.2.2 Исследование клоногенности полученных культур

Другим важнейшим показателем агрессивности трансформированных клеток *in vitro* является их способность формировать колонии (пролиферировать) в отсутствие стимуляции окружающими клетками. В условиях дефицита ростовых факторов, секретируемых клетками микроокружения в среду, когда клетки находятся в условиях сильно разреженной популяции, менее малигнизированные культуры останавливаются в росте или погибают (Рисунок 74).

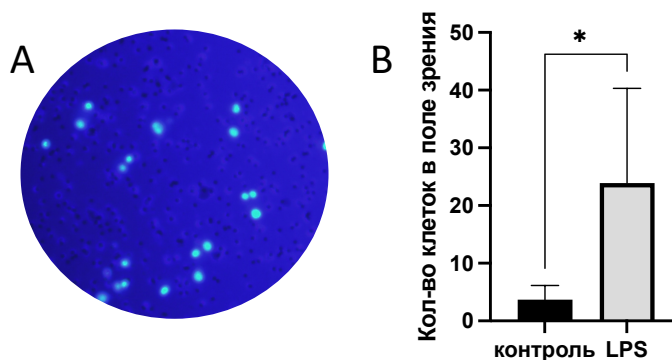


**Рисунок 74** - Пример фотографий чашек с колониями клеток линии Н1299, сформированными в условиях «бедного» микроокружения (А) и статистический анализ клоногенности полученных клеточных линий (В)

Проведен тест на способность формирования колоний в условиях разреженной клеточной популяции, или клоногенность, для всех полученных сублиний. Тест на клоногенность повторяли трижды для каждой линии. Не все исследованные клеточные линии способны к формированию колоний из единичных клеток. Статистический анализ выявил увеличение как среднего количества колоний, так и их размера для всех производных клеточных линий, устойчивых к цитотоксической активности, что свидетельствует как об увеличении способности клеток к автономному росту, так и о повышении скорости их пролиферации.

### 3.7.2.3 Анализ миграционной способности клеток

Миграционная активность или подвижность злокачественных клеток является следствием эпителиально-мезенхимального перехода и во многом определяет их способность распространяться по организму. Направленная миграция клеток в организме определяется градиентом различных факторов, которые задают направление движения. В упрощенной модели этого процесса *in vitro* исследуется миграция клеток через поры мембраны по градиенту ростовых факторов в составе сыворотки. Принцип эксперимента заключается в том, что клетки высаживаются в камеру, заполненную средой, не содержащей сыворотки. Камера Бойдена, дно которой состоит из пористой мембраны, помещается в среду с 10% содержанием сыворотки, и таким образом создается градиент концентрации факторов роста, по которому клетки «стремятся» проползти сквозь поры мембраны. Результаты анализа миграционной активности клеток в камере Бойдена представлены на рисунке 75.

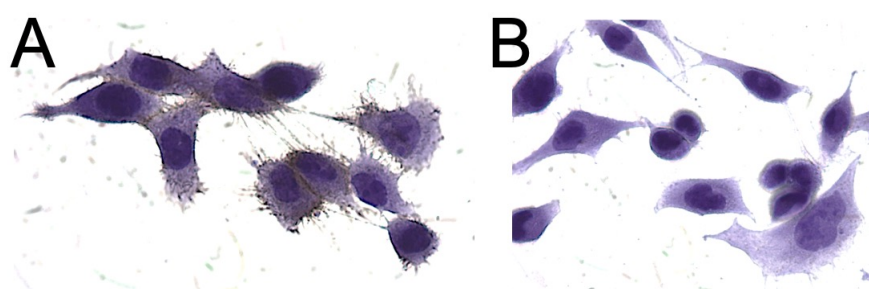


**Рисунок 75** – Пример фотографии мембраны камеры Бойдена (А) и статистический анализ миграционной активности (В) на примере клеточной линии НМРЛ Н1975

Проведенный анализ показал, что при приобретении клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток наблюдается усиление их миграционной способности. Однако, так как проведенный ранее анализ выявил значимые изменения в скорости пролиферации клеток, возможно, изменение их миграционной

способности связано не только с изменением миграционных свойств, но и с повышением скорости пролиферации.

Е-кадгерин является одной из основных молекул клеточной адгезии. При развитии многих эпителиальных опухолей наблюдается потеря экспрессии данного белка посредством генетических и эпигенетических механизмов. В результате потери экспрессии Е-кадгерина нарушаются межклеточные контакты, что приводит к усилению миграционной способности клеток, а также к накоплению  $\beta$ -катенина в ядре и повышению его транскрипционной активности, что приводит к стимуляции пролиферации. Выявив изменения миграционных и пролиферативных свойств клеток, далее был проведен иммуноцитохимический анализ экспрессии Е-кадгерина. Результаты представлены на рисунке 76.



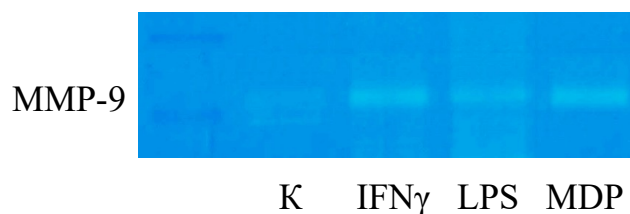
**Рисунок 76** – Иммуноцитохимическое окрашивание исходных (А) и производных (В) клеток НМРЛ Н1975 с использованием антител к Е-кадгерину

Проведенные эксперименты показали, что у полученных в результате отбора клеток, устойчивых к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток, наблюдается потеря экспрессии Е-кадгерина.

### 3.7.2.3 Анализ уровня секреции матриксных металлопротеиназ (ММР)

Согласно литературным данным, матриксные металлопротеиназы гиперэкспрессированы во многих типах опухолей и способствуют их прогрессии, путем перестройки внеклеточного матрикса, что способствует процессам инвазии и метастазирования [318]. Семейство металлопротеиназ состоит из шести групп, различающихся по химическому составу и типу расщепления субстрата. В данной работе производился анализ активности ММР-2 и ММР-9, которые относятся к группе желатиназ. Для оценки активности желатиназ проведен сравнительный анализ их секреции в кондиционированной культуральной среде от полученных клеточных линий. Необходимо отметить, что металлопротеиназы секретируются клетками в качестве предшественников (зимогенов), их активация наступает после отщепления ингибиторного участка. В результате данного анализа на зимограммах могут выявляться полосы, соответствующие 2-м формам ММР-2 (~72 кДа) и ММР-9 (~92 кДа) (Рисунок 77).



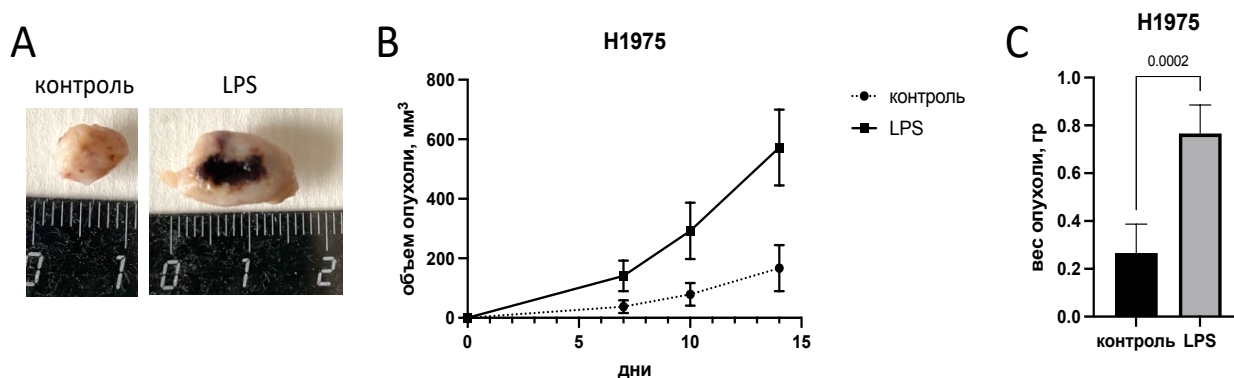


**Рисунок 77** - Желатиновая зимография кондиционированных сред, полученных от исследованных клеточных линий НМРЛ Н1299

При анализе полученных результатов оказалось, что не все исследованные линии экспрессируют MMP-2 и MMP-9. В частности, в исследованных клеточных линиях рака почки и некоторых линий НМРЛ не наблюдалось экспрессии данных ферментов. В то же время, в клеточных линиях рака предстательной железы наблюдалась активность как MMP-9, так и MMP-2. Для клеточной линии НМРЛ Н1299 наблюдается активность только MMP-9. Как видно из рисунка 69, в полученных сублиниях Н1299 наблюдается усиление активности MMP-9.

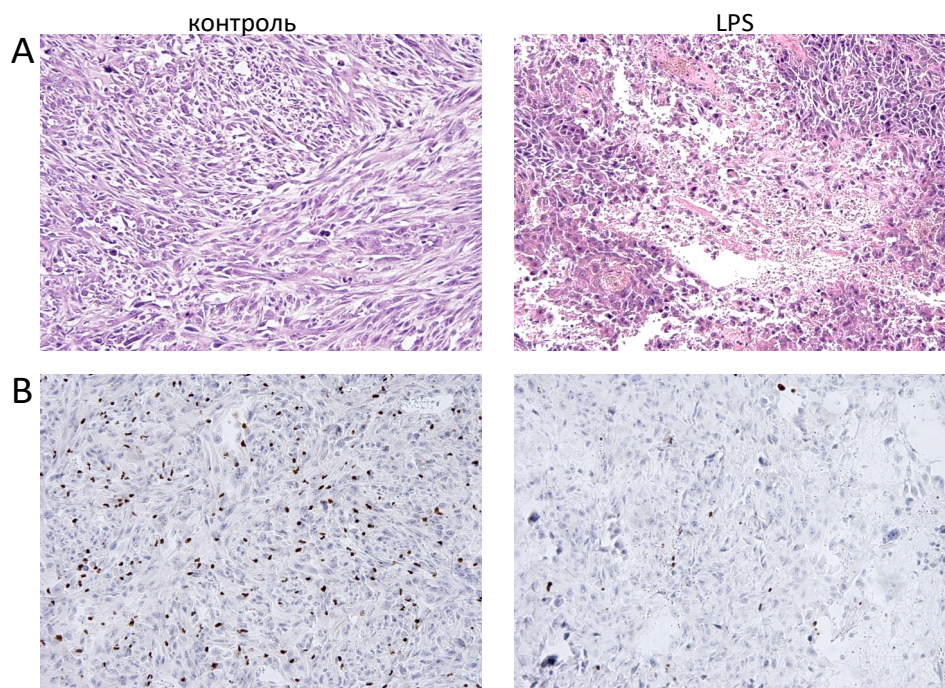
#### 3.7.2.4 Динамика роста опухолей *in vivo*

В связи с тем, что устойчивость к цитотоксической активности оказала значительное влияние на изменение клеточных характеристик *in vitro*, следующей задачей данной работы было изучение полученных сублиний *in vivo*. В работе использовались самки бестимусных мышей линии D2ЧJ в возрасте 6–8 недель. Каждому животному подкожно прививалось по 2 опухоли (прививочная доза составляла  $5 \times 10^6$  клеток, суспендированных в 100 мкл физиологического раствора). Размер опухолей измерялся каждые несколько дней, их объем высчитывался по формуле:  $V = \text{ГЧ(шир)} \times \text{Ч(дл)} \times 0,5$ . Продолжительность эксперимента составляла 3 недели. Образовавшиеся опухоли использовали для иммуногистохимического анализа. Эксперименты повторяли как минимум 2 раза. Результаты представлены на рисунке 78.



**Рисунок 78** – Внешний вид (А), скорость роста (В) подкожных ксенографтов и терминальный вес образовавшихся опухолей (С)

Проведенные эксперименты на животных показали, что клетки, обладающие устойчивостью к цитотоксической активности макрофагов, характеризуются более высоким злокачественным потенциалом, а именно, скоростью роста подкожных ксенографтов по сравнению с клетками исходной линией. Гистологический тип опухоли и степень инфильтрации ее макрофагами представлены на рисунке 79.



**Рисунок 79** – Примеры гистологического окрашивания опухолей подкожных ксенографтов гематоксилин-эозином (А) и иммуногистохимического окрашивания с использованием антител к PU.1 (В)

Опухоли, образуемые клетками, устойчивыми к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток, характеризовались большим размером, большим количеством очагов некроза и повышенной васкуляризацией, что свидетельствует об их более высоком злокачественном потенциале. Также необходимо отметить, что в опухолях, образуемых клетками, устойчивыми к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток наблюдалось меньшее количество PU.1+ клеток, по сравнению с контролем. Полученные результаты согласуются с отмеченными нами ранее закономерностями, что для аденокарциномы легкого неблагоприятным прогностическим фактором служит низкая инфильтрация PU.1+ клетками, а не высокая.

Так как клеточные тесты *in vitro* выявили изменения в миграционной способности клеток, экспрессии E-кадгерина и активности MMP-9, дополнительно была проведена оценка их метастатического потенциала. Эксперимент продемонстрировал отсутствие верифицируемых метастазов в регионарных лимфоузлах, а также в печени и легких экспериментальных животных

во всех исследованных клеточных линиях, как исходных, так и устойчивых к цитотоксической активности.

Таким образом, при анализе клеточных характеристик *in vitro* и *in vivo* исследуемых клеточных линий можно сделать следующие выводы: приобретение опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагоподобных клеток оказывает сходное опухоль-промотирующее влияние на различные клеточные линии НМРЛ, рака предстательной железы и почки. Данный факт может свидетельствовать о наличии общих клеточных механизмов регуляции приобретения клетками данного фенотипа. Основные различия в поведении клеток, устойчивых к цитотоксичности, выражались преимущественно в регуляции скорости роста опухолей *in vivo* и динамике пролиферации *in vitro*. В связи с этим далее проведен анализ возможных механизмов, лежащих в основе проведения различных митогенных сигналов.

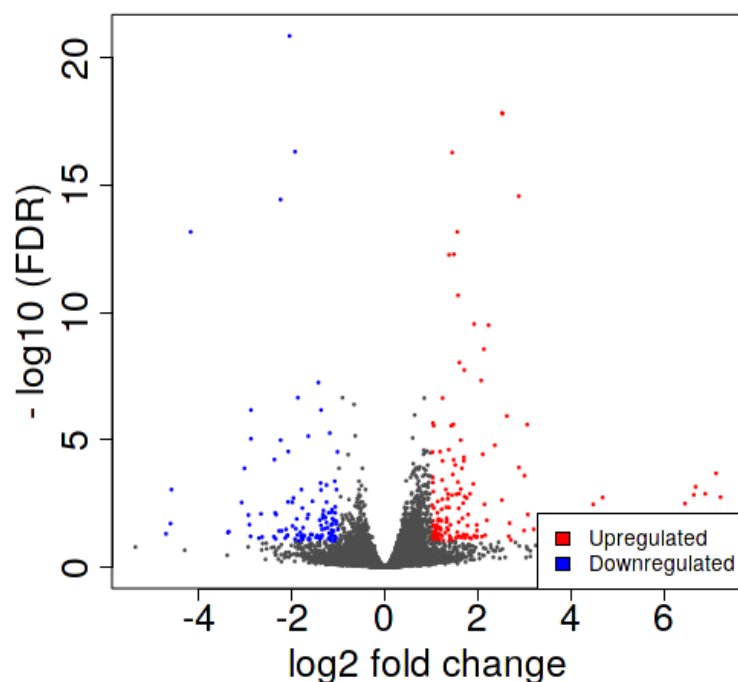
### 3.7.2.5 RNA seq

На следующем этапе работы проведен анализ транскриптома исследуемых клеточных линий: Н1975 и сублинии Н1975 LPS, устойчивой к цитотоксической активности. В результате секвенирования на платформе Illumina HiSeq 2000 было получено 172,253,533 одноконцевых прочтений (Таблица 20). После удаления адаптеров, а также прочтений рРНК, на каждую библиотеку приходилось  $28.18 \pm 2.91$  млн. прочтений. На эталонный геном человека *GRCh38.p12* выравнивалось от 97.79% до 97.93% всех прочтений, причем большая их часть картировалась уникально (>86%).

**Таблица 20** - Статистика фильтрации и картирования ридов

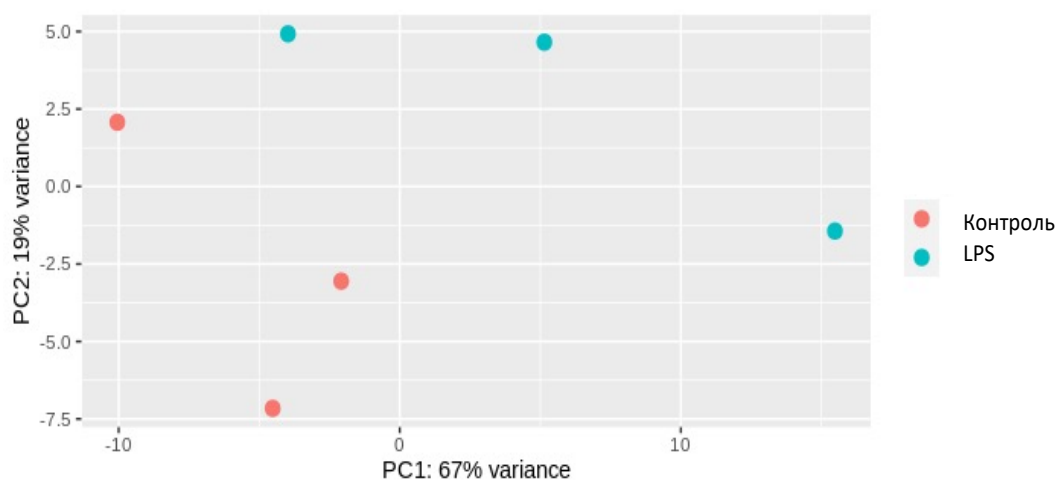
Образец	Total reads	bbmap filtered	rRNA clean	Aligned
H1975K	27871480	27734280 (99.51%)	27567573	26986514 (97.89%)
H1975K1	31113964	30950121 (99.47%)	30721788	30073177 (97.89%)
H1975K2	24521550	24410069 (99.55%)	24212548	23694367 (97.86%)
H1975LPS	26026011	25687457 (98.70%)	25373667	24812058 (97.79%)
H1975LPS1	31677969	31060891 (98.05%)	30861954	30211422 (97.89%)
H1975LPS2	31042559	30596683 (98.56%)	30365428	29737614 (97.93%)

В результате проведенного анализа обнаружено 207 дифференциально экспрессирующихся генов (Рисунок 80), с достоверно ( $\log_2$  fold change >1, FDR corrected p-value < 0.05) изменяющейся экспрессией в библиотеках Н1975 LSP по сравнению с контролем. Среди них экспрессия 165 генов находилась в положительной регуляции, экспрессия 118 генов подвергались отрицательной регуляции.



**Рисунок 80** - Диаграмма рассеяния, отображающая дифференциальную экспрессию генов между образцами. Гены, экспрессия которых достоверно повышена, обозначены красным цветом; экспрессия которых достоверно понижена - синим цветом

Библиотеки контрольных и экспериментальных образцов образуют отдельные кластеры на плоте анализа главных компонент на основе нормализованных данных (Рисунок 81).



**Рисунок 81** — Анализ главных компонент PCA для библиотек H1975 и H1975 LPS на основе нормализованных значений

На основе анализа обогащения генных онтологий дифференциально экспрессирующихся генов (Таблица 21), в группе H1975 LPS по сравнению с контролем повышается уровень экспрессии генов, ассоциированных с ответом на внешние воздействия, формирование

внечелочного матрикса, сигнальные пути от рецепторов клеточной поверхности, регуляция иммунного ответа и активация комплемента. Гены, уровень которых понижается в группе H1975 LPS относительно контрольной группы, относятся к сигнальным путям, регулирующим развитие тканей и негативной регуляции клеточной пролиферации.

**Таблица 21** - Результаты анализа обогащения генных онтологий дифференциально экспрессирующихся генов в библиотеках H1975 LPS по сравнению с контролем

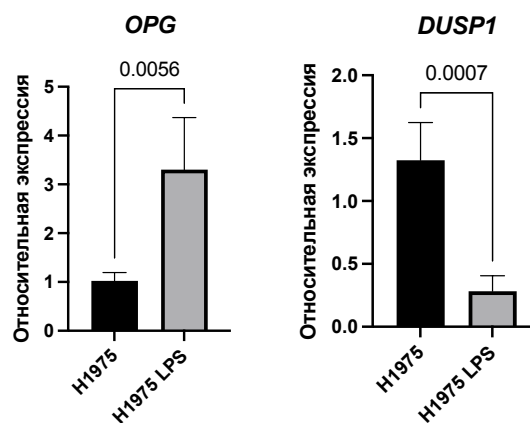
	<i>P</i> значение	n (генов)	Процесс
Up-regulated	5.0e-07	43	Response to external stimulus
	5.0e-07	16	Extracellular matrix organization
	5.1e-07	46	Response to organic substance
	1.4e-06	43	Cell surface receptor signaling pathway
	4.4e-06	43	Regulation of multicellular organismal process
	6.1e-06	8	Regulation of humoral immune response
	6.3e-06	43	Immune system process
	1.2e-05	29	Regulation of transport
	1.6e-05	20	Positive regulation of transport
	1.6e-05	42	Cellular response to chemical stimulus
Down-regulated	5.7e-05	8	Smooth muscle cell proliferation
	6.4e-04	6	Positive regulation of smooth muscle cell proliferation
	7.0e-04	6	Molting cycle
	1.5e-03	22	Tissue development
	2.6e-03	12	Negative regulation of cell population proliferation
	2.9e-03	19	Regulation of cell population proliferation
	9.1e-03	2	Negative regulation of phospholipase A2 activity
	9.7e-03	8	Regulation of Wnt signaling pathway
	9.7e-03	6	Regulation of ossification
	9.7e-03	5	Response to hydrogen peroxide
	9.7e-03	19	Homeostatic process

По результатам функциональной аннотации дифференциально экспрессирующихся генов на следующем этапе исследования проведен выбор отдельных генов, потенциально вовлеченных в регуляцию пролиферации. Результаты представлены в таблице 22.

**Таблица 22** — Дифференциально экспрессирующиеся гены в библиотеках H1975 LPS по сравнению с контролем

Gene ID	Log2 Fold Change	P значение	Название
SDC2	3,07	0,005	syndecan 2
MAP2	2,88	7,16E-16	microtubule associated protein 2
TLR2	2,36	6,29E-06	toll like receptor 2
CHI3L1	2,07	1,73E-08	chitinase 3 like 1
TNFSF10	1,83	0,0006	TNF superfamily member 10
COL4A6	1,39	0,047	collagen type VIII alpha 1 chain
ITGA1	1,63	0,0005	integrin subunit alpha 1
OPG	1,59	0,011	TNF receptor superfamily member 11b
PLCD4	1,56	0,030	phospholipase C delta 4
PLAT	1,45	1,63E-16	plasminogen activator, tissue type
COL4A6	1,39	0,047	collagen type IV alpha 6 chain
CAVIN2	1,38	1,75E-12	caveolae associated protein 2
TGFB1	1,19	2,21E-05	transforming growth factor beta 1
DUSP1	-1,04	0,013	dual specificity phosphatase 1
TP63	-1,25	0,013	tumor protein p63
WNT10B	-1,28	0,023	Wnt family member 10B
RRAGD	-1,55	0,002	Ras related GTP binding D
NKD2	-1,96	0,001	NKD inhibitor of WNT signaling pathway 2
SCIN	-2,87	2,62E-06	scinderin
PLCB1	-2,93	0,007	phospholipase C beta 1

Для подтверждения данных, полученных при помощи транскриптомного секвенирования, экспрессия мРНК генов *OPG* и *DUSP1* была исследована при помощи количественной ПЦР. Результаты представлены на рисунке 82.



**Рисунок 82** – Относительная экспрессия генов *OPG* и *DUSP1* в клеточной линии H1975 и ее производной, устойчивой к цитотоксической активности макрофагов

Проведенный анализ показал статистически достоверные изменения экспрессии исследуемых генов. Так для гена *OPG* наблюдалось усиление экспрессии, в то время как для *DUSP1* наблюдалось снижение экспрессии в устойчивых производных.

Помимо анализа дифференциально экспрессирующихся генов, дополнительно проведен анализ некодирующих РНК, экспрессия которых достоверно изменялась в экспериментальных библиотеках по сравнению с контролем. В библиотеках LSP по сравнению с контролем было обнаружено 8 некодирующих РНК, экспрессия которых достоверно ( $\log_2$  fold change >1, FDR corrected p-value < 0.05) изменялась. Все они относились к классу длинных некодирующих РНК (lncRNA). Среди них экспрессия 6 некодирующих РНК была повышена в образцах LSP по сравнению с контролем, а двух - понижена. Данные представлены в таблице 22.

**Таблица 23** – Некодирующие РНК, экспрессия которых достоверно изменялась в библиотеках H1975 LPS по сравнению с контролем

Ensembl gene ID	Log2 Fold Change	adj. p value	Описание
LINC00639	2,66	0,047	long intergenic non-protein coding RNA 639
IGFL2-AS1	2,62	4,41E-07	IGFL2 antisense RNA 1
POT1-AS1	1,54	0,001	POT1 antisense RNA 1
MBNL1-AS1	1,33	0,010	MBNL1 antisense RNA 1
ZNF710-AS1	1,20	0,026	ZNF710 antisense RNA 1
PSMB8-AS1	1,02	3,27E-05	PSMB8 antisense RNA 1 (head to head)
LINC01291	-1,38	0,0004	long intergenic non-protein coding RNA 1291
LINC01508	-2,88	0,047	long intergenic non-protein coding RNA 1508

### 3.7.2.6 Анализ сигнальных путей, потенциально вовлеченных в регуляцию пролиферации

Проведенный анализ сравнения метаболических путей между исследуемыми группами позволил идентифицировать сигнальные пути, вовлеченные в регуляцию клеточной пролиферации. К таким сигнальным путям относятся, в частности, интегрин-зависимые сигнальные пути. Интегриновые рецепторы – трансмембранные гликопротеины, специфически связывающиеся с различными компонентами внеклеточного матрикса. Структурно интегриновые рецепторы представляют собой гетеродимеры - каждый состоит из одной альфа- и одной бета-субъединицы. Внутриклеточный домен интегринового рецептора через цепь различных соединенных между собой цитоплазматических белков, таких как паксиллин и др., связывается с актиновыми микрофиламентами клетки. Тем самым интегриновые рецепторы обеспечивают структурную связь матрикса с цитоскелетом. Помимо этого, с помощью интегриновых рецепторов запускается различные сигнальные каскады, приводящих к активации многих ключевых белков, вовлеченных в канцерогенез.

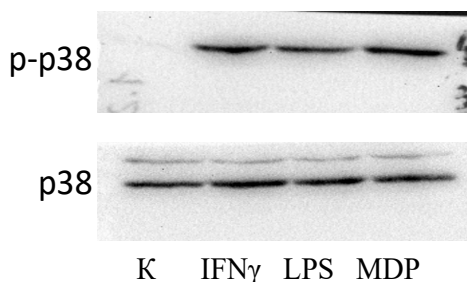
Так как в результате секвенирования не было выявлено очевидных ключевых регуляторов пролиферации на уровне экспрессии генов, было выдвинуто предположение, что регуляции пролиферации в данном случае может осуществляться не на уровне экспрессии генов, а на уровне активности белков. К таким ключевым механизмам регуляции клеточного деления относятся MAP-киназы. В пользу активации MAP-киназ также свидетельствует выявленная нами повышенная экспрессия TGF $\beta$ .

Митоген-активируемые киназы (MAP-киназы) включены в каскад передачи сигналов от различных клеточных рецепторов, в частности интегринов, ко многим транскрипционным факторам. В настоящее время выделяют три различных митоген-активируемых сигнальных каскада, приводящих к активации трех основных MAP-киназ: ERK1/2, JNK и p38 [319]. ERK1/2 – является основной MAP-киназой, проводящей митогенные сигналы от различных ростовых факторов, цитокинов и гормонов, приводящие к стимуляции клеточного роста.

В связи с тем, что полученные результаты показали, что приобретение клетками различных типов устойчивости к цитотоксической активности маркофагоподобных клеток сопряжено с повышением их пролиферативной способности, проведен анализ уровня фосфорилирования MAP-киназ. На первом этапе проведен анализ статуса фосфорилирования ERK1/2 (p44/42 MAPK) исследуемых клеточных линий. Вестерн-блот анализ уровня фосфорилирования ERK1/2 с помощью антител к ERK1/2: ERK1 - фосфорилированной по 202 остатку треонина и 204 остатку тирозина, а ERK2 по 185 остатку треонина и 187 остатку тирозина, показал, что устойчивость к цитотоксической активности не приводит к увеличению количества фосфорилированных ERK1/2 в различных клеточных линиях.



Исследование влияния отбора на активацию киназы JNK1 (МАРК8) также не выявило повышения ее фосфорилирования по 183 треонину клеточных линиях, в тот время как активность киназы p38 значительно изменялась (Рисунок 83).



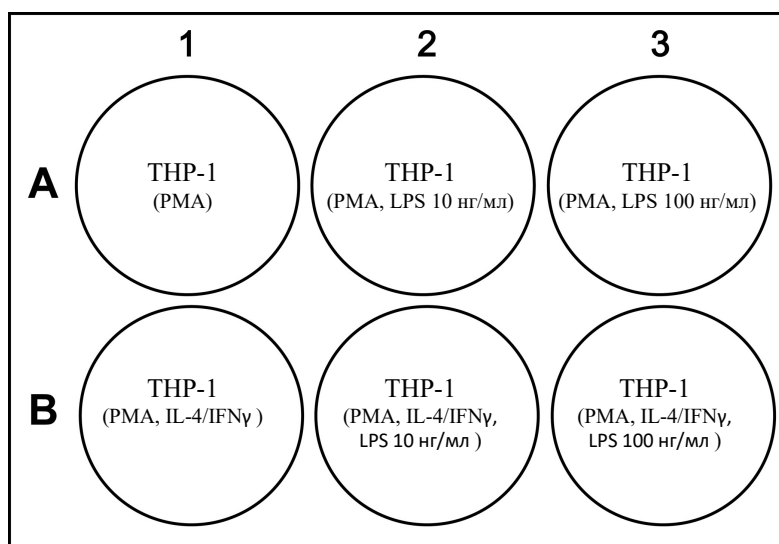
**Рисунок 83** - Вестерн-блот анализ уровня фосфорилирования и экспрессии p38 на примере клеточной линии H1975 и ее производных

Проведенный анализ выявил заметное увеличение уровня фосфорилированной формы p38 во всех исследованных клеточных линиях. Таким образом проведенный анализ уровней активности ERK1/2, p38 и JNK в полученных клеточных линиях показал, что приобретение клетками устойчивости к цитотоксичности приводит к активации p38, которая и является кандидатом на роль “активатора” пролиферации.

### 3.8 Механизм развития толерантности макрофагов в микроокружении опухоли

Микробиом опухоли может оказывать многогранное влияние на ее формирование и развитие. С одной стороны, под воздействием микробиома формируется популяция цитотоксических макрофагов, которые могут способствовать элиминации опухолевых клеток, а с другой стороны- осуществлять отбор более злокачественных клонов. С другой стороны, постоянное воздействие микробиома в опухоли может приводить к “толерантности” макрофагов, которые не способны адекватно отвечать на провоспалительные стимулы. Данная часть исследования посвящена изучению феномена формирования толерантности макрофагов под воздействием бактерий и цитокинов опухолевого микроокружения.

Для проверки данной гипотезы была разработана клеточная модель. Макрофаги получали путем дифференцировки клеток миелоидного происхождения линии ТНР-1 (Рисунок 84).

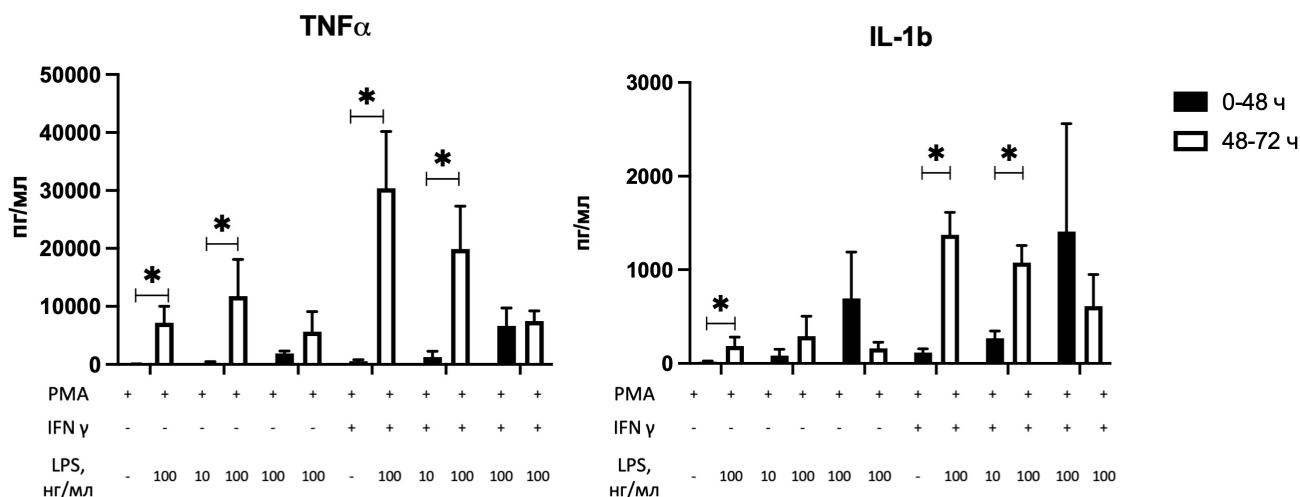


**Рисунок 84** - Схема эксперимента индукции толерантности макрофагов

Концентрации PMA и IFN $\gamma$  составили 67 нМоль и 0,1 мкг/мл, соответственно. Толерантность индуцировали путем предварительной инкубации в течение 48 часов THP-1 с LPS в концентрациях 10 и 100 нг/мл, полученным из *Escherichia coli* O111:B4. После такой первичной инкубации производился отбор сред для определения концентрации продуцируемых цитокинов. Затем клетки THP-1 промывали свежей средой RPMI, добавляли новую среду с LPS (100 нг/мл) и инкубировали 48 ч, после чего отбирали среды для определения концентрации продуцируемых цитокинов. Рабочая концентрация клеток THP-1 составила  $5 \times 10^5$  кл/мл. Все временные диапазоны и концентрации LPS были выбраны на основе экспериментальных данных по подбору условий индукции толерантности и демонстрировали наиболее выраженный ответ.

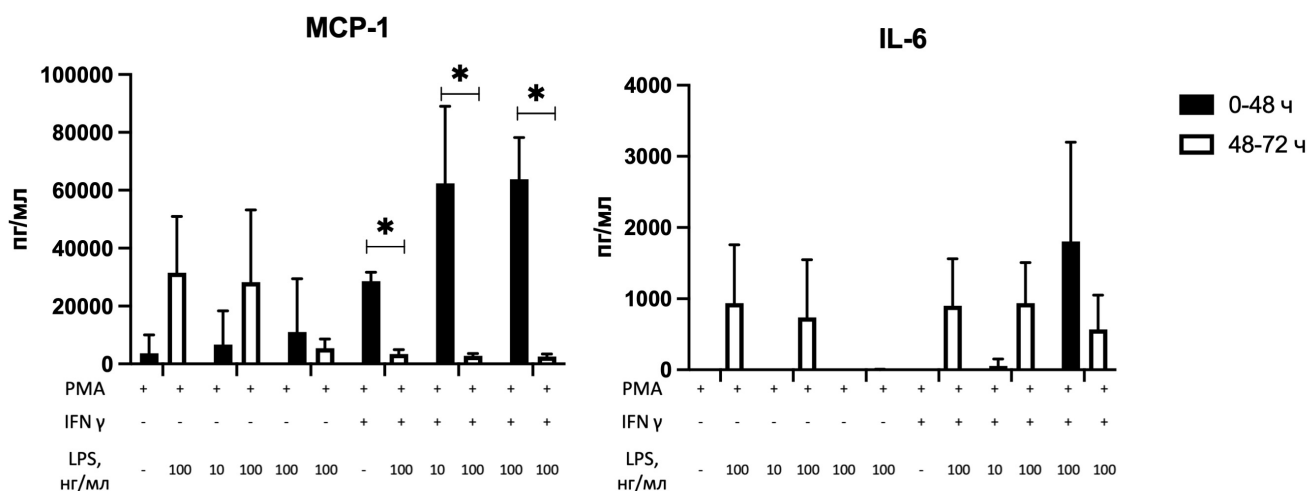
Степень цитотоксической активности клеток оценивалась путем количественного измерения продуцируемых цитокинов, ответственных за воспаление, в культуральной жидкости методом иммуноферментного анализа (ИФА) при помощи наборов ИФА в соответствии с инструкциями производителя. Оценивалась продукция таких цитокинов, как TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , моноцитарный хемотаксический фактор-1 (MCP-1), интерлейкин – 8 (IL-8), интерлейкин – 6 (IL-6), интерлейкин-10 (IL-10). Количество продуцируемых цитокинов было нормировано на количество жизнеспособных клеток.

На первом этапе методом ИФА было определено количество продуцируемых цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в культуральной среде спустя 48 часов инкубации THP-1 с первичными провоспалительными стимулами (PMA, IFN $\gamma$ , LPS) и спустя 48 часов после вторичной инкубации после отмывки от первых компонентов и добавления LPS в количестве 100 нг/мл (Рисунок 85).



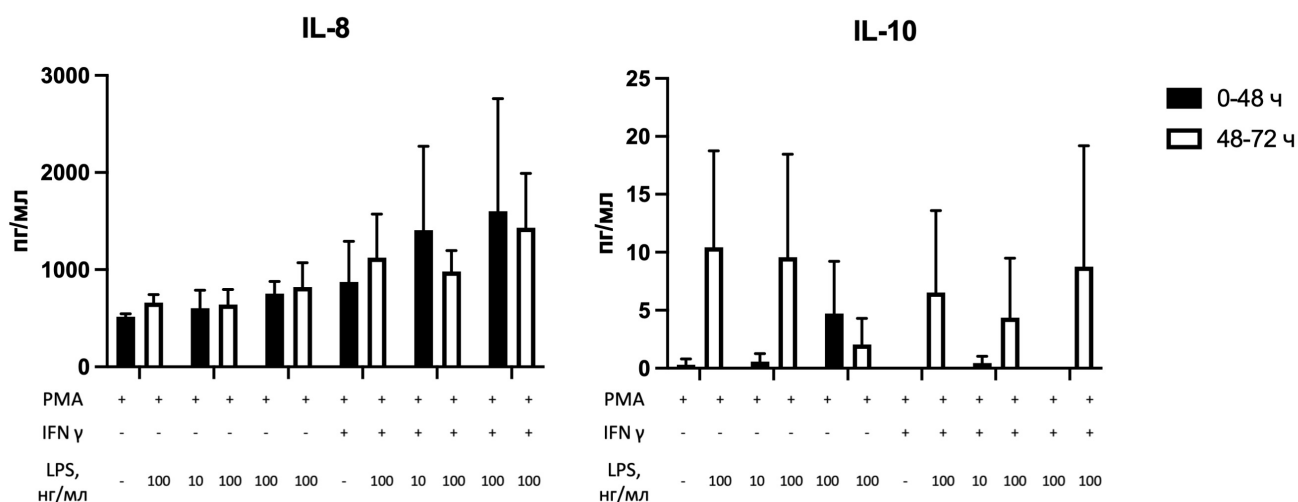
**Рисунок 85** - Количество продуцируемых цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в условиях индукции толерантности при помощи PMA, IFN $\gamma$ , LPS. \* - статистически значимо

Далее было определено количество продуцируемых цитокинов MCP-1 и IL-6 в культуральной среде спустя 48 часов инкубации THP-1 с первичными провоспалительными стимулами (PMA, IFN $\gamma$ , LPS) и спустя 48 часов после вторичной инкубации после отмывки от первых компонентов и добавлении LPS в количестве 100 нг/мл (Рисунок 86).



**Рисунок 86** - Количество продуцируемых цитокинов MCP-1 и IL-6 в условиях индукции толерантности при помощи PMA, IFN $\gamma$ , LPS. \* - статистически значимо

Далее было определено количество продуцируемых цитокинов IL-8 и IL-10 в культуральной среде спустя 48 часов инкубации THP-1 с первичными провоспалительными стимулами (PMA, IFN $\gamma$ , LPS) и спустя 48 часов после вторичной инкубации после отмывки от первых компонентов и добавлении LPS в количестве 100 нг/мл (Рисунок 87).

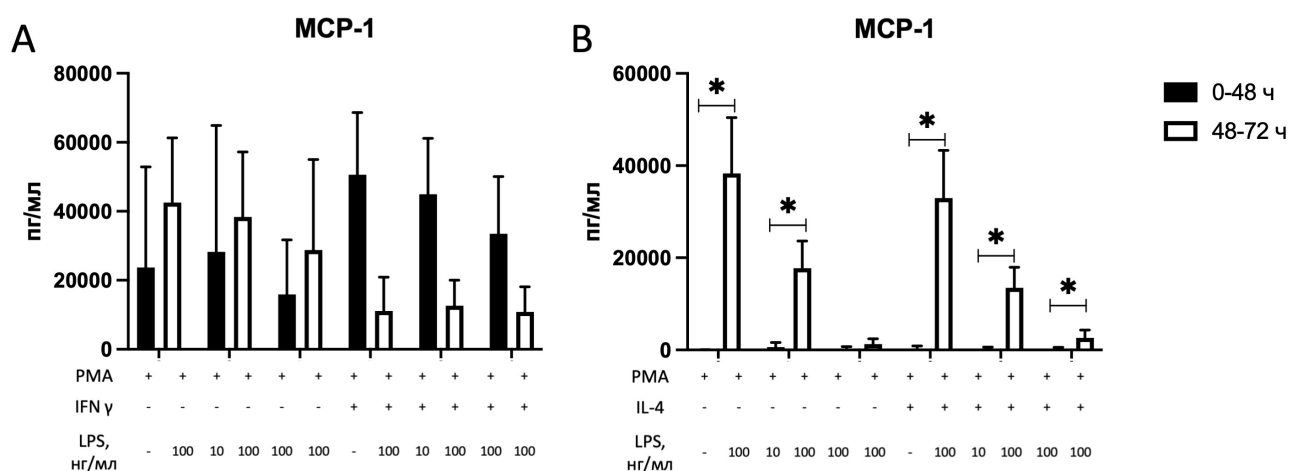


**Рисунок 87** - Количество продуцируемых цитокинов IL-8 и IL-10 в условиях индукции толерантности при помощи PMA, IFN $\gamma$ , LPS

Результаты исследования показали, что при вторичном воздействии факторов воспаления макрофаги достоверно теряли активность продукции таких провоспалительных цитокинов, как TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и MCP-1. Было отмечено, что наиболее яркий эффект толерантности наблюдается в отношении продукции MCP-1, а экспрессия TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  имела дозозависимый эффект от первичного стимула. Более того, продукция ингибитора синтеза цитокинов, IL-10, запускалась при воздействии вторичного провоспалительного стимула, что также иллюстрирует наблюдаемый эффект толерантности. Следует отметить, что эффект толерантности наиболее выражен в присутствии IFN $\gamma$ , а для ее формирования необходимо 100 нг/мл LPS. Интересно, что в случае MCP-1 формирование толерантности не было опосредовано первичным действием LPS, для ее формирования оказалось достаточным присутствия IFN $\gamma$ .

Для анализа вклада опухолевых факторов в развитие толерантности макрофагов, эксперименты, описанные выше, проводились с использованием среды, кондиционированной клетками H1975. Клетки H1975 рассеивали до 50% конфлюэнтности и культивировали в течение 48 часов. После этого культуральную жидкость собирали, стерилизовали фильтрованием и использовали для культивирования макрофагов. Для анализа вклада иммуносупрессорных факторов, продуцируемых опухолью, эксперимент проводили по схеме, описанной выше с добавлением интерлейкина 4 (IL-4) в концентрации 20 нг/мл.

Далее оценили вклад факторов, производимых опухолевыми клетками в развитие фенотипа и функции TLR-1/M1 макрофагов (Рисунок 88).



**Рисунок 88** – Продукция MCP-1 в присутствии кондиционированной среды от клеток H1975 (А) и IL-4 (В). \* - статистически значимо

Показано, что кондиционированная среда от клеток H1975 повышает способность макрофагов продуцировать MCP-1 в ответ на вторичное действие эндотоксина, однако не отменяет формирования толерантности. IL-4 – один из наиболее изученных иммуносупрессорных факторов, продуцируемых опухолевыми клетками. Было сделано предположение, что данный фактор может вносить вклад в формирование толерантности в условиях среды, кондиционированной опухолевыми клетками. Результаты исследования опровергли гипотезу относительно вклада IL-4 в формирование толерантности (рисунок 88В). Эксперимент с добавлением IL-4 также подтвердил вклад LPS в формирование толерантности. С повышением первичной концентрации эндотоксина наблюдался дозозависимый эффект снижения продукции MCP-1 в ответ на вторичное воздействие провоспалительного фактора.

Полученные результаты позволяют впервые установить связь между толерантностью врожденного иммунитета и микробиологической составляющей опухолей. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что в условиях микроокружения опухоли формируется толерантность макрофагов под действием факторов воспаления и компонентов клеточной стенки бактерий. Опухолевые клетки также могут вносить свой вклад в процесс формирования толерантности посредством продукции иммуносупрессорных факторов. Лучшее понимание механизмов формирования толерантности макрофагов в условиях микроокружения опухоли, вероятно, будет способствовать реализации новых диагностических и терапевтических подходов в лечении онкологических заболеваний.

## ГЛАВА 4 Обсуждение

Онкологические заболевания остаются важной социальной современной проблемой. Разносторонние механизмы их возникновения и индивидуальная особенность течения болезни создают значительные проблемы в терапии. Известно, что опухолевые клетки имеют ряд отличительных особенностей, таких как отсутствие репликативного старения, способность избегать клеточной гибели, снижение реакции на рост-ингибирующие сигналы и пониженная потребность в ростовых факторах. Помимо этого, опухолевые клетки приобретают способность к инвазии и стимуляции ангиогенеза, а также избегают противоопухолевого иммунного ответа и обладают генетической нестабильностью [320]. Дальнейшие исследования показали, что многие вышеописанные свойства опухолевые клетки могут приобретать за счет своего микроокружения. Во время прогрессии опухоли возникает взаимодействие между неопластическими клетками и стромой, которое может осуществляться непосредственно через межклеточные контакты или паракринно, т.е. посредством сигналов от цитокинов и факторов роста. Для некоторых опухолей, например для опухолей желудочно-кишечного тракта, характерно сильное влияние микробиологической составляющей, которая развивается из нормальной микробиологической флоры под воздействием опухолевых факторов и может отличаться от нормальной микробиоты органа. На сегодняшний день микробиом опухоли считается полноценным компонентом ее микроокружения и относится к ключевым особенностям опухоли, наряду с вышеперечисленными признаками [321].

Различные компоненты микробиоты могут вносить свой вклад в развитие уже сформировавшихся опухолей как путем непосредственного влияния на опухолевые клетки, так и посредством влияния на опухолевое микроокружение, что может приводить как к прогрессии, так и к регрессии опухолевого роста. В условиях опухолевого микроокружения происходит интеграция противовоспалительных сигналов, поступающих от опухолевых клеток и провоспалительных сигналов от бактерий на иммунокомпетентные клетки стромы. Как происходит данное взаимодействие, как изменяется качественный и количественный состав микробиома опухоли, какой именно фенотип приобретают клетки стромы, и каким образом все это влияет на прогноз заболевания, на данный момент изучено недостаточно.

Данное исследование направлено на выявление новых маркеров опухолевой стромы рака легкого и пищевода, отражающих характеристики опухолеассоциированного воспаления и позволяющих осуществлять мониторинг опухолевого роста, прогнозировать течение заболевания, следить за эффективностью терапии.

В опухолях НМРЛ, как и в большинстве других типов солидных опухолей, воспалительный инфильтрат играет немаловажную роль в развитии и прогрессии заболевания. С

одной стороны, он может и должен участвовать в противоопухолевом иммунном ответе, но часто наблюдается обратная ситуация, и иммунокомпетентные клетки опухолевой стромы совместно с опухолевыми подавляют иммунный ответ и способствуют росту опухоли.

Цитотоксические лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, являются основными эффекторными клетками, принимающими участие в противоопухолевом иммунном ответе. В зависимости от степени инфильтрации TILs, все опухоли можно классифицировать как “холодные” (низкая инфильтрация) или “горячие” опухоли (высокая инфильтрация), что играет важную прогностическую роль, особенно при использовании иммунотерапии. В данном исследовании проведен количественный анализ общего содержания Т-клеток, цитотоксических Т-клеток и Т-клеток регуляторного фенотипа с использованием маркеров CD3+, CD8+ и FOXP3+ соответственно в 100 образцах НМРЛ различно гистологического типа. Показано, что низкое количество CD8+ лимфоцитов является благоприятным прогностическим фактором на ранних стадиях заболевания. Это согласуется с литературными данными, где показано, что высокое содержание CD8+ клеток в опухолях НМРЛ является фактором неблагоприятного прогноза [322]. Также показано, что для ранних стадий НМРЛ характерно большее количество как цитотоксических Т-лимфоцитов, так и TILs в целом. Полученные результаты позволяют предположить, что иммуносупрессия в опухолях НМРЛ развивается в процессе прогрессии заболевания.

Прогностическая значимость FoxP3+ клеток, инфильтрирующих опухоли легкого, в литературе описана. Большинство исследователей склоняются к тому, что большое количество регуляторных Т клеток является неблагоприятным прогностическим фактором [166, 167]. Однако для некоторых типов опухолей, например для рака пищевода и КРР, большое количество FoxP3+ регуляторных Т-клеток в опухолях может быть маркером хорошего прогноза [168]. В данном исследовании показано, что инфильтрация опухоли регуляторными Т-клетками значительно выше в образцах плоскоклеточного рака, нежели аденокарцином. В целом для НМРЛ FoxP3 не может служить достоверным прогностическим критерием.

Другим немаловажным компонентом опухолевой стромы являются макрофаги, ассоциированные с опухолью. В целом, макрофаги, могут быть классически активированы, чтобы впоследствии стать супрессорами опухолевого роста (M1 фенотип), или альтернативно активированными, способствующими опухолевой прогрессии (M2 фенотип). Такая классификация несколько упрощена, но достаточно эффективна для оценки состава опухолевой стромы. Для ИГХ анализа чаще всего используется общий макрофагальный маркер CD68, а также маркеры, характеризующие иммуносупрессорные M2 макрофаги CD163, CD206 и CD204. Для многих типов опухолей показана ассоциация MAO с неблагоприятным прогнозом заболевания [323, 324].

Однако, для опухолей органов ЖКТ четкая корреляция с плохим прогнозом отсутствует, а зачастую, как в случае колоректального рака, наблюдается обратная корреляция.

В данном исследовании для описания макрофагов опухолевой стромы были использованы CD163, CD206, CD204 и CHID1. В качестве общих макрофагальных маркеров был использован маркер CD68. В рамках данного исследования предпринята попытка использования транскрипционного фактора PU.1 в качестве маркера макрофагов. Ввиду того, что для анализа некоторых клинически релевантных маркеров, например PD-L1, важно понимать тип клеток, которые данный маркер экспрессируют, важно подобрать маркер, при использовании которого локализации окрасок не будут совпадать. Так как PU.1 имеет ядерную локализацию, его удобно комбинировать с любыми другими маркерами, экспрессирующимися на мембране или цитоплазме. PU.1 (*Sp1*) представляет собой транскрипционный фактор, принимающий участие в гемопоэзе, максимальная экспрессия которого наблюдается в макрофагах и их предшественниках [325]. Он экспрессируется в миелоидных и В-клетках, но отсутствует в Т-клетках. Нокаут PU.1 является летальным во время эмбрионального развития из-за нарушений гемопоэза и формирования аномальных лимфоидных и миелоидных клеток [326-328]. PU.1 также принимает участие в прогрессии лимфопролиферативных заболеваний [329]. Несмотря на это, его высокая экспрессия ассоциирована с увеличением выживаемости при фолликулярной лимфоме [330]. В случае солидных опухолей прогностическая значимость PU.1 показана для опухолей молочной железы и ассоциирована с плохим прогнозом [102]. Для глиом показана предположительная роль PU.1 в прогрессии заболевания [101]. Прогностическая значимость PU.1 для рака легкого не изучена, поэтому в данном исследовании дополнительно проведено изучение экспрессии PU.1 в строме опухолей НМРЛ и ее ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками опухолей, а также оценка ее прогностической значимости для опухолей легкого различных гистологических типов. Проведенный анализ показал отсутствие значимых корреляций между количеством PU.1+ клеток и основными характеристиками исследованных образцов. Наблюдалась тенденция к увеличению содержания исследованных клеток в образцах плоскоклеточного рака по сравнению с аденокарциномами по аналогии с регуляторными Т-клетками. Далее проведен анализ прогностической значимости экспрессии PU.1 в опухолях легкого в целом, в зависимости от гистологического типа опухоли и в зависимости от стадии заболевания. Установлено, что в целом для опухолей НМРЛ PU.1 не является прогностическим маркером. Однако анализ с учетом гистологического типа опухоли показал, что низкое количество PU.1+ клеток в опухоли является фактором плохого прогноза для аденокарцином, в то время как для плоскоклеточных опухолей такое обстоятельство является фактором хорошего прогноза. При том, что прогностические маркеры опухолевых клеток рака легкого, специфические для определенного гистологического типа опухолей, описаны [331],



стромальные маркеры, обладающие подобными свойствами, на данный момент не известны. Таким образом впервые показано, что PU.1 может являться стромальным прогностическим маркером НМРЛ в зависимости от гистологического типа опухоли.

Далее в данной работе показано, что низкое содержание CD163+ макрофагов в опухоли достоверно ассоциировано с благоприятным прогнозом, что в целом согласуется с существующей концепцией, согласно которой сильная инфильтрация опухоли M2 макрофагами является плохим прогностическим признаком для НМРЛ [91]. Для CD204+ макрофагов, которые также относят к макрофагам второго типа, показана благоприятное прогностическое значение на ранних стадиях заболевания. Также некоторые опубликованные исследования показывают, что большое количество как CD68+ клеток в опухоли, так и CD204+ макрофагов, может являться и благоприятным прогностическим фактором [98].

Некоторые маркеры макрофагов, планировавшиеся для выявления M1 фенотипа, активно экспрессируются опухолевыми клетками изучаемых нозологий. К таким маркерам относятся, в частности iNOS и TNF $\alpha$ .

Немногочисленные литературные данные показывают, что повышенная экспрессия iNOS, как в M1 макрофагах, так и в опухолевых клетках НМРЛ, может являться хорошим прогностическим фактором [140, 332, 333]. В данной работе выявлено, что повышенная экспрессия iNOS опухолевыми клетками характерна для плоскоклеточного рака легкого и является благоприятным прогностическим фактором НМРЛ в целом.

TNF- $\alpha$  является одним из основных цитокинов воспаления, который участвует в активации клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе. Основными источниками TNF- $\alpha$  являются цитотоксические макрофаги и некоторые другие иммунокомпетентные клетки. Связывание TNF- $\alpha$  с рецепторами ведет либо к индукции апоптоза, либо к развитию воспаления, опосредованного активацией антиапоптотических сигнальных путей и повышением экспрессии провоспалительных цитокинов [334]. Такие полярные биологические эффекты TNF- $\alpha$  опосредуют его противоречивое значение в канцерогенезе. Также необходимо отметить, что многие опухолевые клетки сами начинают экспрессировать данный цитокин. Так, его экспрессия описана для рака яичников, молочной железы, эндометрия, желудка, поджелудочной железы, печени, предстательной железы, мочевого пузыря, колоректального рака и др. [335]. При оценке экспрессии данного белка необходимо учитывать тип клеток, которые его производят. Мы провели анализ экспрессии TNF- $\alpha$  в образцах НМРЛ и показали, что во всех исследованных случаях его экспрессию можно было обнаружить в опухолевых клетках. Помимо этого, его экспрессия обнаруживалась в строме всех исследованных опухолей. Мы провели оценку ассоциации экспрессии данного белка с клинико-морфологическими параметрами и оценили его прогностическую значимость. Ни для стромальной, ни для опухолевой экспрессии TNF- $\alpha$

ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками опухоли не выявлено. При оценке прогностической значимости оказалось, что экспрессия данного белка в опухолевых клетках не является прогностически значимой. Однако оценка экспрессии TNF- $\alpha$  в стромальных клетках свидетельствует о том, что он может быть маркером благоприятного прогноза при НМРЛ. Литературных данных, посвященной данной проблеме, опубликовано крайне мало, несмотря на то что поиск прогностически значимых молекул для НМРЛ остается актуальной научной задачей [152].

Так как одной из клеточных популяций, продуцирующих TNF- $\alpha$ , являются В-клетки, проведена оценка прогностической значимости их количества в опухолевой строме. Показано, что для экспрессии CD20 в строме опухолей НМРЛ наблюдалась ассоциация с локализацией опухоли, ее размером, стадией заболевания и наличием регионарных метастазов. А именно, на более ранних стадиях, при меньшем объеме опухоли и при отсутствии метастазов в лимфоузлах наблюдалось более высокое содержание CD20+ В-клеток в опухолевой строме, что свидетельствует в пользу того, что содержание В-клеток ассоциировано с более благоприятными клиническими характеристиками. Однако при оценке прогностической значимости оказалось, что содержание В-клеток в опухолевой строме не коррелирует с прогнозом НМРЛ.

Помимо непосредственно клеток микроокружения, в подавлении иммунного ответа в опухоли могут принимать участие и отдельные белки, экспрессия которых может осуществляться различными типами клеток. К таким молекулам опухолевой иммуносупрессии можно отнести IDO1. IDO1 (indoleamine-2,3-dioxygenase) является ферментом, основной функцией которого является деградация триптофана (Три) с образованием *N*-formylkynurenine, а далее целого ряда продуктов, оказывающих существенное влияние на функции иммунной системы. Активированный фермент IDO1 снижает уровни Trp в микроокружении опухоли, и это снижение оказывает внутриопухолевое иммуносупрессорное действие. Одним из основных активаторов экспрессии IDO1 в опухоли является IFN $\gamma$  [250]. Основным иммуносупрессорным механизмом влияния на опухоль для IDO1 является снижение инфильтрации опухоли цитотоксическими Т-клетками и повышение количества регуляторных Т-клеток [336].

Так как IDO1 является иммуносупрессорным компонентом стромы опухоли, можно предположить, что его высокая экспрессия может быть ассоциирована с плохим прогнозом. Частично для НМРЛ это подтверждается литературными данными [337], однако чаще экспрессия IDO1 при НМРЛ не ассоциирована с прогнозом [338]. Данное исследование показало благоприятную прогностическую значимость низкой экспрессии IDO1 в опухолевых клетках в плоскоклеточном раке легкого. Также необходимо отметить значимую прямую корреляцию количества IDO1 и FOXP3+ клеток в опухоли ( $r=0.271$ ,  $p=0.003$ ).

В данной работе помимо НМРЛ, проведено детальное исследование фенотипа опухолевой стромы плоскоклеточного рака пищевода. Легкое и пищевод принципиально отличаются по микробиологическому составу, как качественно, так и количественно. Именно этим обусловлен выбор данных нозологий.

Первой и основной популяцией изученных стромальных клеток опухолей пищевода являлись макрофаги, ассоциированные с опухолью. Показано, что из всех исследованных макрофагальных маркеров только для CD206+ клеток обнаружена ассоциация с дифференцировкой опухоли. Информация относительно прогностической значимости M2 макрофагов в опухолях данной нозологии достаточно противоречива. В данном исследовании показано, что CD163+ макрофаги являются фактором хорошего прогноза при плоскоклеточном раке пищевода (HR=0,4447, p=0,0456\*). Jian Ming Hu и коллеги показали прогностическую значимость стромальных CD163+ макрофагов при раке пищевода (большее количество макрофагов данного типа было являлось фактором плохого прогноза), однако при анализе CD163+ клеток, инфильтрирующих непосредственно опухолевые островки, разницы в выживаемости отмечено не было [339]. Это лишний раз свидетельствует о необходимости разработки общих стандартных методик оценки клеток опухолевого инфильтрата.

По аналогии с НМРЛ оказалось, что iNOS не подходит для изучения макрофагов в опухолях пищевода, потому что его экспрессия наблюдалась в небольшом проценте проанализированных случаев и исключительно в опухолевых клетках. Интересным оказался тот факт, что iNOS значимо коррелировал со стадией заболевания (высокий уровень его экспрессии наблюдался на поздних стадиях). Прогностической значимости, а именно, взаимосвязи уровня экспрессии iNOS с общей выживаемостью пациентов, не отмечено. В целом экспрессия iNOS при раке пищевода практически не изучена, что делает данное исследование особенно актуальным. Одно опубликованное исследование показывает отсутствие разницы в экспрессии iNOS между нормальной и опухолевой тканью пищевода [340]. Еще одно исследование показало отсутствие значимых корреляций между уровнем экспрессии iNOS и клиническими характеристиками опухолей данной локализаций [341].

Далее проведен анализ фенотипа Т-клеток стромы опухолей ППП. Из литературных данных известно, что высокое содержание TILs является благоприятным прогностическим фактором [342, 343]. Несмотря на это встречаются и противоположны результаты, а именно, высокое содержание цитотоксических лимфоцитов коррелирует с плохим прогнозом [322]. Проведенное исследование не обнаружило значимых корреляций между количеством CD3+ и CD8+ положительных клеток и клиническими характеристиками опухоли, а также не выявил их прогностической значимости.

Однако, возвращаясь к описанию иммуносупрессорных компонентов опухолевой стромы плоскоклеточного рака пищевода, хочется отметить, что большее количество FoxP3+ регуляторных Т-клеток является фактором хорошего прогноза при анализе общей выживаемости при опухолях данной локализации. Литературные данные относительно прогностической значимости FoxP3 достаточно противоречивы. А именно показано, что большее количество FoxP3+ клеток может служить как фактором плохого [344], так и хорошего прогноза.

Еще одним из иммуносупрессорных механизмов опухолевой стромы является взаимодействие PD-1/PD-L1. Сигнальный путь PD-1/PD-L1 играет важную роль в регуляции клеточного иммунитета посредством подавления пролиферации и стимуляции апоптоза активированных Т-клеток. Такой способ, а именно экспрессию PD-L1 на своей поверхности используют опухолевые клетки для «ускользания» опухоли от иммунологического надзора. Ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 при помощи специфичного к PD-1 или PD-L1 антитела должно способствовать активации Т-клеток и соответственно уничтожению опухолевых.

При анализе уровня экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках в данной работе никаких ассоциаций с клиническими характеристиками, а также прогнозом, ни для НМРЛ, ни для ПРП выявлено не было. Известно, что анализа экспрессии PD-L1 в ткани не всегда достаточно для эффективного отбора пациентов для иммунотерапии и достижения максимального ответа на проводимое лечение. Данное исследование показывает, что анализа PD-L1 также недостаточно для эффективного прогнозирования течения заболевания. Все эти данные, а также согласующимися с ними литературные источники свидетельствуют о том, что PD-L1 исчерпал себя в формате монодиагностики, поэтому новым направлением современных исследований все чаще становится комплексный анализ нескольких различных маркеров, включающих PD-L1.

По аналогии с НМРЛ, в данной работе PU.1 использован в качестве маркера макрофагов. Здесь еще раз необходимо отметить, что маркер PU.1 не является исключительно макрофагальным. Однако с другой стороны стоит подчеркнуть, что многие маркеры опухолевого микроокружения пересекаются (как между клетками микроокружения, так и с опухолевыми клетками), что не препятствует их использованию. PU.1 в достаточном количестве содержится помимо макрофагов, также в зрелых В-клетках. Во всех остальных клетках лимфоидного и миелоидного инфильтрата опухоли, PU.1 присутствует в низком количестве. Содержание В-клеток в опухолях значительно меньше по сравнению с различными типами макрофагов. Все вышесказанное и полученные в данной работе результаты позволяют с некоторыми ограничениями предложить использование PU.1 в качестве общего макрофагального маркера в опухолях пищевода. Дополнительно для подтверждения возможности использования PU.1 в качестве общего макрофагального маркера, проведены дополнительные валидационные

исследования на опухолях других нозологий, таких как почка, предстательная железа и толстая кишка. Проведенные исследования подтверждают возможность применения данного транскрипционного фактора в качестве общего маркера макрофагов.

Комменсальные бактерии играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза различных органов и тканей, а нарушения в их балансе могут влиять на восприимчивость организма к возникновению опухолей или прогрессии уже появившихся. Следующий этап данного исследования посвящен изучению состава микробиома опухолей легкого и пищевода в зависимости от фенотипа клеток их микроокружения и его прогностической значимости.

Теории бактериально-опосредованного канцерогенеза были выдвинуты с середины 20-го века, когда McCoy и Mason впервые предположили связь между *Enterococcus* и карциномой сигмовидной кишки [6]. Sears и Pardoll сформулировали гипотезу «альфа-жучка», в которой такие виды, как *Bacteroides fragilis*, играют центральную проонкогенную роль, вырабатывая энтеротоксины и способствуя тем самым возникновению КРР [7]. Впоследствии Tjalsma et al. в 2012 году предложили модель «водитель-пассажир», в которой бактерии-водители (например, *B. fragilis*) приводят к многоэтапному канцерогенезу колоректальной опухоли, включая воспаление, повышенную клеточную пролиферацию и (или) продукцию генотоксинов [8]. Расширением этого является «ключевая гипотеза» Hajishengallis et al., в которой ключевые патогены, даже при низкой численности, способствуют колонизации дополнительными патогенами [9]. За этим следует инверсия ответной реакции хозяина, что приводит к формированию дисбаланса комменсальной микробиоты и стимуляции воспалительного ответа [9].

В данном исследовании показано, что условно нормальная ткань легкого не отличается по таксономическому разнообразию на различных уровнях от опухолевой ткани, что согласуется с мировыми исследованиями [216]. Рак легких является гетерогенным заболеванием. Двумя наиболее распространенными типами немелкоклеточного рака легкого являются плоскоклеточный рак и аденокарцинома, которые характеризуются различными молекулярными механизмами возникновения и терапевтическими стратегиями [345]. Ввиду того, что плоскоклеточный рак легкого часто ассоциирован с неблагоприятным воздействием внешних факторов (например, курением), можно предположить у таких пациентов колонизацию легкого бактериями, содержащимися в табаке [346]. Однако опухоли легкого различных гистологических типов как по результатам данного исследования, так и по литературным данным не отличаются по своему таксономическому разнообразию [347, 348]. Интересно, что в данном исследовании аденокарциномы значительно характеризовались большим содержанием грамположительных бактерий, чем грамотрицательных. Немного интереснее обстоит дело с прогрессией заболевания. А именно, таксономический состав опухолей легкого ранних и поздних стадий значительно отличается по 11 родам бактерий при неизменных индексах альфа-разнообразия. Аналогичные

результаты были получены Gomes et al, которые также продемонстрировали отсутствие изменения альфа-разнообразия микробиома в процессе развития и прогрессии НМРЛ [347]. Другие исследователи показали изменения в бета-разнообразии микробиома опухолей легкого в зависимости от стадии заболевания [186], что свидетельствует о необходимости дальнейшего накопления информации в данной области исследований.

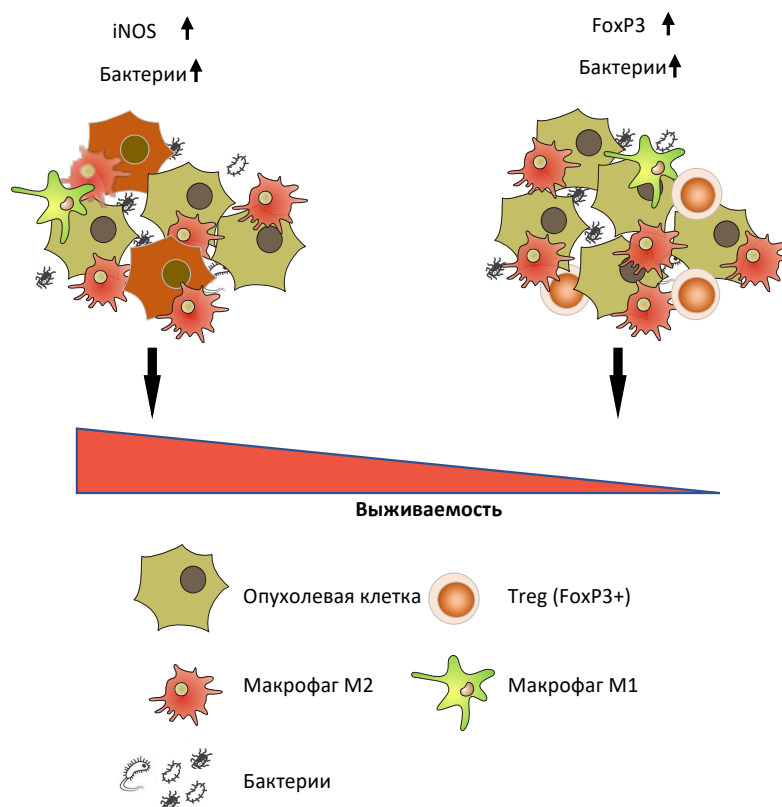
Также стоит отметить, что в группах опухолей, отличающихся экспрессией iNOS, наблюдается значимое отличие альфа-разнообразия бактериальных сообществ, а именно в группе, характеризующейся более высокой экспрессией iNOS, наблюдалось снижение данного показателя. Показано, что отличия в индексах Шеннона и Симпсона обусловлены лишь относительными количественными изменениями отдельных представителей микробиома легких, но не изменением таксономического разнообразия. Детальный анализ показал, что снижение индексов Шеннона и Симпсона в группе с высоким уровнем экспрессии iNOS сопровождалось увеличением относительной численности единственного рода *Propionibacterium*. Эти данные подтверждают тот факт, что дисбаланс комменсального микробиома и опухолиассоциированное воспаление тесно взаимосвязаны.

Далее в работе проведена количественная оценка бактериальной нагрузки в целом в исследуемых образцах для оценки ее корреляций с клиническими характеристиками. Из литературных данных известно, что повышенная бактериальная нагрузка может быть плохим прогностическим маркером идиопатического легочного фиброза [349] или способствовать формированию опухолей легкого *in vivo* [350]. С другой стороны, уже известно, что применение антибиотиков, предшествующее иммунотерапии ингибиторами контрольных точек, значительно снижает эффективность противоопухолевого лечения НМРЛ [351]. Данное исследование показало, что содержание бактерий в образцах с различными клиническими характеристиками не отличается, за исключением групп условно нормальной и опухолевой ткани. В опухолевой ткани наблюдается снижение общего количества микроорганизмов, что свидетельствует в пользу того, что развитие опухоли, безусловно, влияет на нормальную локальную микрофлору легкого.

Далее проведен анализ бактериальной нагрузки в группах опухолей с различным фенотипом воспалительного инфильтрата стромы. Показано, что повышенное содержание бактерий наблюдается в группах опухолей с высокой экспрессией iNOS в опухолевых клетках и высоким содержанием FoxP3+ стромальных Т-клеток. Таким образом мы можем предположить, что с одной стороны большое количество бактерий в опухоли способно запустить процессы активного воспаления (посредством повышения экспрессии iNOS с последующей продукцией NO). С другой стороны, мы наблюдаем повышенное число бактерий в опухолях с подавленным иммунитетом (посредством сильной инфильтрации FoxP3+ клеток). В связи с этим на

следующем этапе работы изучено, может ли фенотип опухолевой стромы в сочетании с общей бактериальной нагрузкой являться прогностическим маркером НМРЛ.

Впервые показано, что добавление оценки общей бактериальной нагрузки в опухоли кардинально меняет картину выживаемости. В случае повышенной экспрессии iNOS высокая бактериальная нагрузка достоверно является благоприятным прогностическим фактором, в то время как повышенная бактериальная нагрузка при большом количестве FoxP3 клеток является, наоборот, маркером плохого прогноза. Это согласуется с предложенной ранее концепцией, что в опухоли под влиянием не до конца установленных факторов (возможно некоторых “ключевых” патогенов) формируется дисбаланс комменсального микробиома и может происходить стимуляции локального воспалительного ответа организма (в случае сохраненного иммунитета). Именно поэтому повышенное содержание бактерий в опухоли в сочетании с воспалительными маркерами может являться благоприятным прогностическим фактором. Схематически полученные результаты представлены на рисунке 89.



**Рисунок 89** - Прогностическая роль комплексного анализа опухолевой стромы и микробиома

Исторически известно, что острое воспаление, вызванное определенными препаратами на основе бактерий, имело определенные успехи в терапии опухолевых заболеваний. Так “вакцина Коли”, представляющая собой препарат на основе бактерий *Streptococcus pyogenes* применяется для терапии лимфангиом и в качестве адьювант при химиотерапии злокачественных

образований. Помимо этого, для лечения поверхностного переходно-клеточного рака мочевого пузыря иногда используется вакцина БЦЖ, также являющаяся препаратом микробного происхождения [352]. На сегодняшний день исследования в данной области продолжаются и, возможно, для НМРЛ такие открытия еще предстоит сделать.

Рак пищевода считается достаточно распространенным среди злокачественных опухолевых заболеваний. Большинство больных умирают в течение года после постановки диагноза, поскольку часто он выявляется уже на поздних стадиях. Существует два основных подтипа рака пищевода - плоскоклеточная карцинома пищевода (ПРП) и аденокарцинома пищевода – каждый из которых имеет свои факторы риска и патологические особенности. Несмотря на то, что на плоскоклеточный рак пищевода приходится 90% случаев данной формы рака, большинство исследований микробиома в основном проводились на аденокарциномах. Микробиому плоскоклеточного рака пищевода посвящено крайне ограниченное число исследований. Микробиота, естественным образом населяющие тело человека, долгое время игнорировалась научным сообществом. Постулаты Коха [223], которые установили взаимоотношения между одним или несколькими микробами и болезнью, опровергли идею о том, что все микробное сообщество, в котором ни один отдельный член не был классифицирован как патоген, может способствовать патогенезу болезни. Поэтому гипотеза Lederberg's, предполагающая что исследования микробиоты человека станут "горячей" темой для исследований по всему миру, становится реальной [224]. Микробиом пищевода играет большую роль как в норме, так и при различных патологиях. Ранее считалось, что пищевод не имеет своего резидентного микробиома ввиду своего строения и функциональной нагрузки. Первое исследование, посвященное изучению резидентного микробиома нормального пищевода, описало 41 род из 6 основных типов: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, and *TM7*. Самым распространенным родом оказался *Streptococcus* [225].

В настоящее время получены данные о микробиоме здорового пищевода, демонстрирующие его близость микробиому полости рта [226]. Несколько исследований указывают на различия в микробиоме пищевода здоровых лиц и пациентов со злокачественными поражениями пищевода [229]. В частности, отмечено возрастание доли *Enterobacteriaceae*, *Akkermansia* [229], *Lactobacillus fermentum* [230] и *Fusobacterium nucleatum* [15] в микробиоме опухолей пищевода. Интересно отметить, что микробиом аденокарциномы пищевода изучен достаточно неплохо, в то время как исследований, посвященных микробиому плоскоклеточного рака пищевода, опубликовано крайне мало.

В данном исследовании проведен анализ состава микробиома опухолей плоскоклеточного рака пищевода в сравнении с нормальной тканью. Обнаружено, что преобладающими типами микроорганизмов, встречающихся как в опухолях, так и в образцах условно нормальной ткани,



являлись *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes* и *Bacteroidetes*, что согласуется с имеющимися исследованиями [353]. Также, как и Qian Wang с соавторами, в данной работе показано отсутствие альфа-разнообразия между группами опухолей и нормальных тканей пищевода [353]. Также отсутствие различий в альфа-разнообразии между аналогичными группами продемонстрировали и другие исследователи [354]. Далее, проведя анализ на уровне родов, в данной работе показано, что только бактерии рода *Staphylococcus* отличаются в группах опухолей и нормальной ткани. По результатам видового анализа, выявлено, что бактерии рода *Staphylococcus* в исследованных образцах представлены двумя видами: *Staphylococcus warneri* и *Staphylococcus pasteurii*. Преобладание *Staphylococcus warneri* в опухолях по сравнению с нормальной тканью описано для рака желудка [355]. Для рака пищевода отличий в содержании бактерий данных видов ранее описано не было.

Так как резидентные бактерии органа и опухоли, с одной стороны, могут влиять на сами опухолевые клетки (количеством производством определенных токсинов или посредством определенных онкогенных факторов [203, 356]), а также на иммунные клетки микроокружения [357], на следующем этапе работы проведена оценка взаимосвязи микробиологической и иммунологической составляющих опухолей пищевода. Выявлена значимая корреляция между уровнем бактериальной нагрузки и фенотипом опухолевой стромы. А именно, группа опухолей, характеризующаяся большим содержанием CD206 в строме и iNOS в опухолевых клетках, характеризуется большей бактериальной нагрузкой в целом. Важно отметить, что в случае НМРЛ также наблюдалась высокая бактериальная нагрузка в группе опухолей с высокой экспрессией iNOS. Интересным представляется вопрос, что же вызывает такие изменения? Первым возможным вариантом является то, что изменение состава опухолевого микробиома за счет доминирования определенных родов влечет за собой изменения состава опухолевого микроокружения. С другой стороны, можно предположить, что опухоли, изначально отличающиеся характерным индивидуальным фенотипом опухолевой стромы с преобладанием определенных типов клеток, приводит к качественному и количественному изменению опухолевого микробиома.

В данной работе показано, что в опухолях как НМРЛ, и так и ПРП, в целом наблюдается большее количество грамположительных бактерий. Далее показано, что в группе опухолей ПРП с большим содержанием CD206 макрофагов также наблюдается преобладание грамположительных бактерий над грамотрицательными. Различные опубликованные исследования показывают, что грамположительные организмы являются основной причиной инвазивных бактериальных заболеваний у пациентов с онкологическими заболеваниями. Иммуносупрессия, вызванная основным опухолевым процессом или сопутствующей терапией,

синергетически усиливается, делая онкологических пациентов особенно восприимчивыми к грамположительным инфекциям [358].

Проведенное исследование показало, что для плоскоклеточного рака пищевода можно охарактеризовать 2 группы опухолей, прогностически значимо отличающиеся друг от друга в зависимости от содержания грамположительных бактерий и фенотипа опухолевой стромы. Первый тип характеризуется высокой бактериальной нагрузкой, большим содержанием CD206 макрофагов и имеет неблагоприятный прогноз. В данных опухолях преобладают грамположительные бактерии, что, по-видимому, и обуславливает их “иммуносупрессорный” фенотип. Преобладание грамположительных бактерий происходит за счет снижения количества доминирующих грамотрицательных микроорганизмов в данной группе опухолей (например, род *Gemmatimonas*). Это также подтверждается тем, что опухоли с большим содержанием CD206+ клеток характеризуются большим содержанием FoxP3.

Второй тип характеризуется низкой грамположительной бактериальной нагрузкой и, аналогично первой группе, большим содержанием CD206 макрофагов. Данная комбинация маркеров прогностически благоприятна. Для данной группы опухолей характерна ассоциация содержания грамотрицательных бактерий и общего их числа в опухоли и количеством iNOS положительных опухолевых клеток. А именно, преобладание в данном типе опухолей грамотрицательных бактерий способствует повышению экспрессии iNOS и активному воспалительному ответу, что в конечном итоге может способствовать благоприятному прогнозу.

Также можно выделить еще одну независимую группу опухолей, характеризующуюся высокой бактериальной нагрузкой и высокой экспрессией iNOS. Возможно, это достигается за счет того, что в данном типе опухолей наблюдается также преобладание грамотрицательных бактерий над грамположительными. Высокое содержание iNOS в опухоли, как само по себе, так и в сочетании с различными бактериями, по аналогии с НМРЛ имеет тенденцию к благоприятному прогнозу при раке пищевода, но не является статистически значимым маркером данной патологии.

В целом представленные данные свидетельствуют, что для оценки прогностической значимости микроокружения опухоли анализ фенотипа клеток стромы порой бывает не достаточен. Именно поэтому все большую популярность набирают различные варианты комплексного анализа микроокружения опухоли. Так в литературе можно встретить достаточное количество исследований, посвященных прогностической значимости комплекса стромальных маркеров и подбору их более выгодных и адекватных комбинаций. В данном исследовании впервые показано, что состав микробиома опухоли, который на сегодняшний день может считаться полноценным компонентом опухолевой стромы [359], может являться прогностически значимым, особенно в совокупности с другими стромальными маркерами. Таким образом,

детальное изучение микроокружения опухоли и состава микробиома продвигает исследователей все ближе к настоящей персонализации в онкологической практике.

В результате проведенного исследования показана прогностическая и клиническая значимость всестороннего изучения опухолевой стромы, включая микробиологическую составляющую. Резидентные бактерии влияют на поведение опухоли с помощью четырех основных механизмов: непосредственное взаимодействие с опухолевыми клетками с последующей активацией сигнальных каскадов, опосредованных рецепторными тирозинкиназами и рецепторами, сопряженными с G-белками; стимуляция иммунной системы человека, путем связывания, например, с TLR4 и активация местного иммунного ответа; косвенное влияние на поведение опухолевых клеток за счет локального изменения pH и продукции ROS или путем конкуренции за основные метаболиты в опухоли. В данной работе внимание сосредоточено на взаимодействии микробиома и иммунных клеток опухолевого микроокружения.

В ответ на сигналы, поступающие из окружающей среды, макрофаги поляризуются и приобретают различные функциональные свойства. Макрофаги M1 (индуцированные воздействием IFN $\gamma$  и липополисахарида проявляют цитотоксические и противоопухолевые свойства. В свою очередь макрофаги M2 выполняют иммунорегуляторные функции, а также участвуют в подавлении иммунных реакций и ремоделировании тканей [360]. Имеются также данные о том, что комменсальные бактерии в дыхательных путях могут обеспечивать защиту от вирусной инфекции через макрофаги в легких [361]. Изначально считалось, что цитотоксические макрофаги проявляют противоопухолевую активность, однако все предполагаемые стратегии их использования в клинике на данный момент не увенчались успехом. В данной работе высказано предположение, что M1 макрофаги могут способствовать опухолевой прогрессии путем отбора более злокачественных опухолевых клеток, устойчивых к их цитотоксической активности. Для проверки данной гипотезы была разработана новая, ранее не описанная в литературе модель отбора опухолевых клеток под воздействием цитотоксической активности макрофагов. Для стандартизации результатов исследования в данной работе вместо первичных макрофагов была использована клеточная линия моноцитарного происхождения THP-1, которая широко применяется в исследованиях данного профиля. Более того, опубликовано большое количество работ, подтверждающих правомочность использования данной клеточной линии в качестве макрофагов с последующей их дифференцировкой в цитотоксический фенотип [362]. Разработанная в рамках данного исследования экспериментальная модель позволила получить сублинии опухолевых клеток различного происхождения, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов. Так в работе были использованы три линии немелкоклеточного рака легкого, две к линии рака предстательной железы и одна линия светлоклеточного

почечноклеточного рака. Полученные клеточные линии сохраняли свои вновь приобретенные свойства при длительной культивации, что позволило провести с ними большое количество экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*. Известно, что опухолевая прогрессия является сложным и многоступенчатым процессом, в ходе которого селективно отбираются клоны с новыми, более злокачественными свойствами, такими как повышенная скорость пролиферации, миграционная и инвазивная способности, которые в конечном счете могут привести к гибели организма-хозяина.

Проведенное исследование продемонстрировало изменение скорости пролиферации всех производных линий, устойчивых к цитотоксической активности вне зависимости от их происхождения. Причем эффект повышения скорости пролиферации также был универсальным и не зависел от комбинации молекул, использованных для стимуляции макрофагов в процессе отбора. Стоит отметить, что наиболее значимое изменение пролиферации наблюдалось при использовании липополисахарида, в связи с чем данный вариант клеток был использован далее для изучения других клеточных характеристик *in vitro* и экспериментов *in vivo*. Проведенный анализ показал увеличение способности к автономному росту и миграционной активности. Так как в основе миграционной и инвазивной способности клеток лежит нарушение их морфологии и локомоторного фенотипа далее проведен анализ экспрессии E-кадгерина в изучаемых клетках. Проведенный иммуногистохимический анализ показал, что клетки немелкоклеточного рака легкого, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, теряют экспрессию E-кадгерина. Потеря экспрессии E-кадгерина может являться следствием мутаций как гена самого белка, так и компонентов сигнальных путей, регулирующих его экспрессию. Потеря экспрессии E-кадгерина имеет два важных последствия. Во-первых, нарушаются межклеточные контакты и морфогенетические реакции клетки, а, во-вторых, происходит накопление  $\beta$ -катенина в ядре и повышение его транскрипционной активности, что может приводить к стимуляции пролиферации, которая также наблюдается в исследованных клеточных линиях. Эксперименты *in vivo* на бестимусных мышях также продемонстрировали усиление злокачественного фенотипа отобранных клеток. Так для многих линий опухолевых клеток различного происхождения наблюдалось значимое увеличение размеров конечных ксенографтов и скорости их роста. Гистологический анализ опухолей также выявил различия их строения и степени инфильтрации иммунными клетками, а именно, в ксенографтах, полученных из клеток, устойчивых к цитотоксической активности, наблюдается снижение инфильтрации стромы опухоли PU+ клетками, что может косвенно свидетельствовать о неэффективности использования иммунотерапии при лечении опухолей данного типа и подтверждает прогностическую значимость данного белка для аденокарцином легкого. Однако стоит отметить, что несмотря на усиление миграционных свойств опухолевых клеток *in vitro*, в животных моделях

распространения опухолевых клеток за пределы первичного очага, как в регионарные лимфоузлы, так и в отдаленные органы, не наблюдалось.

Так как проведенные исследования продемонстрировали стабильно усиление пролиферации клеток, устойчивых к цитотоксической активности, далее проведен анализ транскриптома исходных и производных линий для выявления потенциальных механизмов, вовлеченных в изменение данной характеристики. Проведенный анализ выявил активацию различных сигнальных путей, потенциально вовлеченных в опухолевую прогрессию, например интегрин-зависимый сигнальный путь и TGF-beta сигнальный путь.

Известно, что в процессе клеточной адгезии после взаимодействия интегринов со своими лигандами, в основном белками внеклеточного матрикса, к этому комплексу привлекаются различные сигнальные молекулы, в частности нерецепторная тирозинкиназа FAK, которая в результате последовательных фосфорилирований может играть существенную роль в активации Ras-зависимых сигнальных путей, что, в конечном итоге, приводит к активации ERK1/2 и усилению подвижности клеток [363]. Обратив внимание на усиление экспрессии интегринов, выдвинуто предположение, что возможными кандидатами на роль “активаторов” пролиферации могут служить MAP-киназы. Проведенный анализ показал, что приобретение клетками устойчивости к цитотоксической активности не приводит к активации ERK1/2 и JNK в клетках НМРЛ, однако для всех клеточных линий наблюдалось усиление активирующего фосфорилирования киназы p38. Для MAP-киназы p38 данные о вкладе в пролиферативную способность клеток достаточно противоречивы [364]. Каноническая активация данной киназы вызывается стрессом, таким как повреждение ДНК различными агентами, а также некоторыми провоспалительными цитокинами и приводит к последующей остановке клеточного деления. Действительно, сильная и продолжительная активация p38 чаще связана с апоптозом, старением и терминальной клеточной дифференцировкой, в то время как низкая активность p38 имеет противоположный эффект и способствует пролиферации клеток [365, 366]. С другой стороны, в литературе описаны механизмы активации пролиферации посредством p38 за счет активации c-Myc и последующей инициации митотических циклов с понижением потребности клетки во внешних митогенных сигналах [367]. Также стоит отметить, что при прогрессии опухолей p38 часто ассоциирована с инвазивностью и химиорезистентностью различных солидных новообразований, а также со снижением безрецидивной выживаемости пациентов [368, 369].

Сигнальные пути, активируемые цитокином TGF-β, регулирует большое количество биологических процессов, например, деление клеток, их миграцию и дифференцировку, причем его эффекты варьируют в зависимости от типа клеток-мишеней и их микроокружения. Одним из основных механизмов действия TGF-β является взаимодействие с белками Smad, приводящее к регуляции множества генов. С другой стороны, TGFβ может активировать функцию MAP-киназ,

в частности p38, через Smad-независимые механизмы. Также необходимо отметить, что по результатам транскриптомного секвенирования было выявлено повышение экспрессии остеопротегерина (OPG), также известного как представитель 11b суперсемейства рецепторов TNF (TNFRSF11B). Данный рецептор представляет собой растворимый белок, основная функция которого – ингибирование TRAIL -индуцированного апоптоза. Для различных солидных опухолей показана ассоциация содержания OPG с агрессивностью опухолей [370-373]. Показано, что секреция OPG опосредована активацией двух сигнальных каскадов, а именно p-38 и ERK1/2, которые, в свою очередь, активируются в ответ на влияние цитокина IL-1 $\beta$ , производимого макрофагами [374], что согласуется с полученными результатами.

Также стоит отметить, что в изучаемых клетках, обладающих устойчивостью к цитотоксической активности, наблюдалось снижение экспрессии фосфатазы DUSP1, что также может объяснять активацию p38 киназы. Таким образом, можно сделать вывод, что в исследуемых клетках наблюдается изменение нескольких ключевых сигнальных путей, каждый из которых может вносить свой вклад в изменение клеточных характеристик.

Рассматривая механизмы, задействованные в приобретение опухолевыми клетками, устойчивыми к цитотоксической активности макрофагов, новых свойств, стоит упомянуть, что в последнее время большое количество исследований направлено на изучение межклеточных взаимодействий посредством экзосом. Известно, что макрофаги производят достаточное количество данных везикул, и их состав значительно отличается в зависимости от их активационного фенотипа [375]. Например, экзосомы из макрофагов способствуют опухолевой прогрессии и лекарственной устойчивости посредством активации пути Akt-сигнального пути при остеосаркоме [375]. Экзосомы макрофагов в опухолевой прогрессии особенно интересны в контексте некодирующих РНК, так как в отличие от цитокинов, которые могут просто секретироваться, для некодирующих РНК экзосомы являются привлекательным инструментом для попадания в клетки. Показано, что экзосомальные miРНК влияют на опухолевую прогрессию и метастазирование, а также лекарственную устойчивость. Например, при раке яичников (РЯ), miR-221-3p, содержащаяся в экзосомах M2 макрофагов, способствует опухолевой прогрессии посредством ингибирования экспрессии ингибитора циклин-зависимой киназы 1B (CDKN1B) [376]. В другом исследовании макрофагальные экзосомальные miR-29a-3p и miR-21-5p M2 влияют на соотношение T регуляторных клеток (Treg) и T-хелперных клеток 17 (Th17), способствуя созданию локальной иммуносупрессии в опухолевом микроокружении, что приводит к опухолевой прогрессии [377]. Помимо miРНК, длинные некодирующие РНК (lncRNA) играют важную роль в возникновении и развитии опухолей [378, 379], влияя на процессы пролиферации, инвазии и апоптоза [380]. Проведенное исследование выявило 8 некодирующих РНК, которые могут принимать участие в различных клеточных процессах.

Так, длинные некодирующие РНК (lncRNA) IGFL2-AS1 и POT1-AS1 участвуют в развитии и метастазировании рака желудка [381-383]. Помимо этого, для IGFL2-AS1 показано, что она принимает непосредственное участие в формировании пролиферативного фенотипа клеток колоректального рака [384]. Для длинной некодирующей РНК (lncRNA) MBNL1-AS1 показано, что она играет важную роль в развитии рака мочевого пузыря [385]. Для длинной некодирующей РНК ZNF710-AS1 показано, что ее активность снижена в опухолях светлоклеточного почечно-клеточного рака (ccRCC), однако ее гиперэкспрессия приводит к усилению скорости пролиферации и ингибированию апоптоза [386]. В исследованиях Zhang и коллег показано, что экспрессия PSMB8-AS1 повышалась в тканях и клеточных линиях рака поджелудочной железы и являлось фактором неблагоприятного прогноза [387].

Также стоит обратить внимание, что экспрессия двух некодирующих РНК LINC01291 и LINC01508 снижалась в исследуемых образцах по сравнению с контролем. Повышенную экспрессию LINC01291 связывают с развитием меланомы и предлагают использовать в качестве диагностического маркера данного типа опухолей [388]. Экспрессия LINC01508 снижена в цисплатин-резистентных клетках рака яичников. Подавление LINC01508 коррелирует с размером опухоли, наличием остаточной опухоли и платинорезистентностью. Оверэкспрессия LINC01508 повышает чувствительность клеток РЯ к цисплатину *in vitro* и *in vivo*, но является маркером плохого прогноза. Повышенный уровень LINC01508 может подавлять устойчивость клеток к цисплатину посредством ингибирования Hippo-YAP сигнального пути [389].

Таким образом в результате проведения данного этапа работы продемонстрировано, что под воздействием цитотоксической активности макрофагов происходит отбор опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксичности. В результате данного отбора происходит отбор более злокачественных клеток, которые способны к более активной пролиферации. Также описаны некоторые молекулярные механизмы, которые могут обуславливать приобретение опухолевыми клетками данных свойств. Данное исследование открывает новое научное направление, посвященное проопухолевым свойствам макрофагов цитотоксического фенотипа, которые до недавнего времени рассматривались только в качестве супрессоров опухолевого роста.

На заключительном этапе работы рассмотрен еще один потенциальный механизм участия цитотоксических макрофагов в опухолевой прогрессии. Толерантность клеток врожденного иммунитета, прежде всего моноцитов/макрофагов чаще всего рассматривается в приложении к инфекционным заболеваниям, однако, в последнее время появляется все больше данных в пользу участия толерантности в патогенезе хронических воспалительных заболеваний, не связанных с инфекцией напрямую. Все больше данных подтверждает гипотезу о том, что толерантность является одним из важнейших механизмов разрешения воспаления и в свою очередь

сопровождается изменением функциональных характеристик ключевых клеток врожденного иммунитета - моноцитов/макрофагов, в том числе их фагоцитарной активности.

Для изучения развития толерантности макрофагов использовалась уникальная разработанная в лаборатории модель. Исходные моноцитарные клеточные линии дифференцировали при помощи стимуляции PMA, IFN $\gamma$  и LPS. Рабочие концентрации были выбраны на основании полученных результатов. Показано, что под воздействием низких концентраций провоспалительных цитокинов наблюдался эффект толерантности. Также был показан эффект среды, кондиционированной опухолевыми клетками на развитие толерантности макрофагов, а именно, кондиционированная среда, от клеток H1975, повышала способность макрофагов продуцировать MCP-1 в ответ на повторную стимуляцию LPS, однако дозозависимое снижение продукции MCP-1 в зависимости от концентрации LPS при первичной стимуляции сохранялось, т.е. сохранялся феномен толерантности макрофагов. Далее было принято решение изучить возможную роль противовоспалительных цитокинов в этом процессе. IL-4 — один из наиболее изученных иммуносупрессорных факторов, продуцируемых опухолевыми клетками. Предположив, что данный фактор может вносить вклад в формирование толерантности макрофагов в составе среды, кондиционированной опухолевыми клетками, проведен ряд экспериментов. По данным ИФА, добавление IL-4 в культуральную среду не влияло на уровень продукции MCP-1 и формирование толерантности, индуцированной LPS. Аналогичные результаты были получены при анализе концентраций TNF, производимых макрофагами в условиях индукции толерантности.

Подводя итоги необходимо сказать, что опухоль задействует огромное количество механизмов, способствующих ее прогрессии. Даже некоторые классические противоопухолевые механизмы, такие как цитотоксическая активность макрофагов, в итоге приводят к опухолевому росту и прогрессии.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование посвящено изучению взаимодействия микробиологического и иммунологического компонентов опухолевой стромы и их вкладу в опухолевую прогрессию. Проведен комплексный анализ фенотипа клеток иммунологической составляющей опухолевой стромы, а также видового разнообразия и количественных характеристик микробиома опухолей. Впервые получены фундаментальные данные об ассоциации видового состава и количественных характеристики микробиоты с составом и фенотипом опухолевой стромы. На первом этапе исследования описано два новых прогностических маркера немелкоклеточного рака легкого, а именно PU.1 и CHID1, а также подтверждена значимость ряда других. Впервые показано, что CHID1, традиционно считающийся маркером M2 макрофагов, экспрессируется опухолевыми клетками легкого, причем его экспрессия значимо зависит от гистологического типа опухоли. Также впервые показано, что экспрессия CHID1 в опухолевых клетках является фактором хорошего прогноза. Также необходимо отметить, что CHID1 является фактором благоприятного прогноза на ранних стадиях заболевания.

Еще одним новым прогностическим маркером для НМРЛ оказался транскрипционный фактор PU.1. Показано, что экспрессия данного белка имеет противоположное прогностическое значение для двух основных гистологических подтипов НМРЛ. Так, низкое количество PU.1+ клеток в опухоли является фактором плохого прогноза для аденокарцином, в то время как для плоскоклеточных опухолей легкого такое обстоятельство является фактором хорошего прогноза. Также показано, что высокая экспрессия iNOS и низкая экспрессии IDO1 являются хорошими прогностическими маркерами НМРЛ, что согласуется с литературными данными.

При помощи направленного секвенирования гена 16S прокариот определен видовой состав опухолевого микробиома и определены бактерии, количество которых увеличено по сравнению с нормальной прилежащей тканью. Выявлены бактерии, преобладающие в различных опухолях. Далее впервые проведен анализ общей бактериальной нагрузки опухолей совместно с фенотипом опухолевой стромы. Общая бактериальная нагрузка, как и уровень количества FOXP3 положительных клеток в опухоли, по данным исследования не являются прогностическими маркерами и не влияют на общую выживаемость пациентов. Однако высокая экспрессия iNOS в совокупности с повышенной бактериальной нагрузкой является маркером хорошего прогноза по сравнению с высокой бактериальной нагрузкой и низкой экспрессией iNOS. Также впервые показано, что высокая бактериальная нагрузка опухоли с иммуносупрессией (большим количеством FOXP3+ клеток) является маркером плохого прогноза при НМРЛ по сравнению с группой с высоким содержанием бактерий и низким содержанием FOXP3. Таким образом впервые показано, что общая бактериальная нагрузка опухоли может иметь противоположное

прогностические значение в зависимости от состояния местного противоопухолевого иммунитета.

Известно, что для опухолей кишечника и желудка прогностическая значимость стромальных маркеров опухолей диаметрально отличается от других нозологий. Традиционно считающиеся маркерами плохого прогноза MAO и Tregs в опухолях некоторых отделов ЖКТ являются благоприятными прогностическими факторами. В данном исследовании впервые показано, что в опухолях плоскоклеточного рака пищевода, наряду с желудком и кишечником, CD163 и FoxP3 являются маркерами хорошего прогноза. Также в результате исследования разработаны новые подходы к оценке прогноза плоскоклеточного рака пищевода. Впервые показано, что резидентный микробиом опухолей данной локализации при анализе совместно с фенотипом клеток опухолевой стромы может служить достоверным прогностическим фактором. Интересно отметить, что по результатам анализа прогностической значимости общей бактериальной нагрузки совместно с фенотипом стромальных клеток опухоли, были получены результаты, аналогичные для НМРЛ, что свидетельствует о общих принципах взаимодействия различных компонентов опухолевой стромы.

Таким образом впервые в мире проведен комплексный анализ механизма взаимодействия микробиома и иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы и оценена его клиническая значимость. Данная работа открывает новое направление исследований, а полученные результаты позволят выявить новые молекулярные маркеры опухолевой стромы, которые будут использоваться в диагностике, для определения прогноза заболевания и в качестве мишеней для терапии опухолей.

## ВЫВОДЫ

1. Транскрипционный фактор PU.1 может быть предложен в качестве нового иммуногистохимического маркера макрофагов в опухолях различных нозологий. Ядерная локализация данного белка позволяет проводить одновременное рутинное иммуногистохимическое окрашивание с мембранными или цитоплазматическими белками макрофагов.

2. Впервые показана прогностическая значимость количества PU.1 положительных стромальных клеток для немелкоклеточного рака легкого.

3. Впервые показано, что экспрессия хитиназоподобного белка CHID1 опухолевыми клетками немелкоклеточного рака легкого коррелирует с гистологическим типом опухоли и является фактором благоприятного прогноза.

4. Анализ качественного и количественного состава резидентного микробиома в нормальных и опухолевых тканях выявил значимые отличия. Впервые показано, что общее содержание бактерий в опухолях легкого и пищевода ниже, чем в нормальной ткани.

5. Впервые проведенный комплексный анализ общей бактериальной нагрузки опухолей и фенотипа опухолевой стромы на примере немелкоклеточного рака легкого и плоскоклеточного рака пищевода показал, что общая бактериальная нагрузка опухоли может иметь противоположное прогностическое значение в зависимости от состояния местного противоопухолевого иммунитета.

6. Впервые показано, что цитотоксические макрофаги способствуют отбору более злокачественных клонов опухолевых клеток, характеризующихся повышенной пролиферативной активностью.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

CD – кластер дифференцировки  
CCL – CC-подобный хемокин  
DUSP1 – белковая фосфатаза 1 двойной специфичности  
EGFR – эпидермальный фактор роста  
ERK1/2 - киназа регулируемая внеклеточными факторами 1/2  
GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа  
GFP – зеленый флуоресцентный белок  
HER2 - рецептор эпидермального фактора роста, тип 2  
IDO1 - индолеамин-пиррол-2,3-диоксигеназа  
IFN – интерферон  
IGF – инсулин-подобный фактор роста  
IL – интерлейкин  
iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота  
JNK - c-Jun киназа  
LPS – липополисахарид  
MAPK - киназа, активируемая митогенами  
MDP – мурамилдипептид  
MCP – фактор хемотаксиса моноцитов  
MHC – главный комплекс гистосовместимости  
MIF – фактор ингибирования макрофагов  
MMP – матриксные металлопротеиназы  
p38 - 38 кДа стресс-активируемая киназа  
PF-4 - тромбоцитарный фактор-4  
NF- $\kappa$ B – ядерный фактор каппа В  
NGS – секвенирование нового поколения  
NK-клетки – клетки-натуральные киллеры  
PAMP – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн  
PBS – фосфорно-солевой буфер  
PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели  
PD-L1 – лиганд программируемой клеточной гибели  
PDGF - фактор роста тромбоцитов  
PMA - форбол-12-миристат-13-ацетат  
ROS – активные формы кислорода

TCR – T-клеточный рецептор  
TGF $\beta$  - трансформирующий ростовой фактор  $\beta$   
Th – Т-хелперы  
TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$   
Treg – Т-супрессоры  
VEGF – фактор роста сосудов  
АК - аденокарцинома  
АЗЦА - антителозависимая цитотоксическая активность  
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения  
ДИ – доверительный интервал  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
днкРНК – длинная некодирующая РНК  
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт  
ЗНО – злокачественные новообразования  
ИГХ - иммуногистохимия  
МАИР – международное агентство по изучению рака  
МАО – макрофаги, ассоциированные с опухолью  
миРНК - микроРНК  
МРЛ – мелкоклеточный рак легкого  
НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого  
ОР – отношение рисков  
ПРП – плоскоклеточный рак пищевода  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РЛ – рак легкого  
РМЖ – рак молочной железы  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
рРНК – рибосомальная РНК  
РП – рак пищевода  
ПКР – почечно-клеточный рак  
ПКРЛ – плоскоклеточный рак легкого  
ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Li, H. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer / H. Li, X. Fan, J. Houghton // *Journal of cellular biochemistry*. - 2007. - Vol. 101, N 4. - P. 805-15.
2. Solinas, G. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation / G. Solinas, G. Germano, A. Mantovani, P. Allavena // *Journal of leukocyte biology*. - 2009. - Vol. 86, N 5. - P. 1065-73.
3. Mei, J. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: A systemic review and meta-analysis / J. Mei, Z. Xiao, C. Guo, Q. Pu, L. Ma, C. Liu, F. Lin, H. Liao, Z. You, L. Liu // *Oncotarget*. - 2016. - Vol. 7, N 23. - P. 34217-28.
4. Zhang, B. M2-polarized macrophages contribute to the decreased sensitivity of EGFR-TKIs treatment in patients with advanced lung adenocarcinoma / B. Zhang, Y. Zhang, J. Zhao, Z. Wang, T. Wu, W. Ou, J. Wang, B. Yang, Y. Zhao, Z. Rao, J. Gao // *Medical oncology*. - 2014. - Vol. 31, N 8. - P. 127.
5. He, Y. Gut-lung axis: The microbial contributions and clinical implications / Y. He, Q. Wen, F. Yao, D. Xu, Y. Huang, J. Wang // *Crit Rev Microbiol*. - 2017. - Vol. 43, N 1. - P. 81-95.
6. Mc Coy, W.C. Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case / W.C. Mc Coy, J.M. Mason, 3rd // *J Med Assoc State Ala*. - 1951. - Vol. 21, N 6. - P. 162-6.
7. Sears, C.L. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer / C.L. Sears, D.M. Pardoll // *The Journal of infectious diseases*. - 2011. - Vol. 203, N 3. - P. 306-11.
8. Tjalsma, H. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects / H. Tjalsma, A. Boleij, J.R. Marchesi, B.E. Dutilh // *Nat Rev Microbiol*. - 2012. - Vol. 10, N 8. - P. 575-82.
9. Hajishengallis, G. The keystone-pathogen hypothesis / G. Hajishengallis, R.P. Darveau, M.A. Curtis // *Nat Rev Microbiol*. - 2012. - Vol. 10, N 10. - P. 717-25.
10. Pietras, K. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma / K. Pietras, A. Ostman // *Experimental cell research*. - 2010. - Vol. 316, N 8. - P. 1324-31.
11. Ying, X. Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages / X. Ying, Q. Wu, X. Wu, Q. Zhu, X. Wang, L. Jiang, X. Chen, X. Wang // *Oncotarget*. - 2016. - Vol. 7, N 28. - P. 43076-87.
12. Lee, S.H. Characterization of microbiome in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer comparing with benign mass like lesions / S.H. Lee, J.Y. Sung, D. Yong, J. Chun, S.Y. Kim, J.H. Song, K.S. Chung, E.Y. Kim, J.Y. Jung, Y.A. Kang, Y.S. Kim, S.K. Kim, J. Chang, M.S. Park // *Lung Cancer*. - 2016. - Vol. 102, N. - P. 89-95.

13. Macfarlane, S. Microbial colonization of the upper gastrointestinal tract in patients with Barrett's esophagus / S. Macfarlane, E. Furrie, G.T. Macfarlane, J.F. Dillon // *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. - 2007. - Vol. 45, N 1. - P. 29-38.
14. Rubenstein, J.H. Association between *Helicobacter pylori* and Barrett's esophagus, erosive esophagitis, and gastroesophageal reflux symptoms / J.H. Rubenstein, J.M. Inadomi, J. Scheiman, P. Schoenfeld, H. Appelman, M. Zhang, V. Metko, J.Y. Kao // *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. - 2014. - Vol. 12, N 2. - P. 239-45.
15. Yamamura, K. Human Microbiome *Fusobacterium Nucleatum* in Esophageal Cancer Tissue Is Associated with Prognosis / K. Yamamura, Y. Baba, S. Nakagawa, K. Mima, K. Miyake, K. Nakamura, H. Sawayama, K. Kinoshita, T. Ishimoto, M. Iwatsuki, Y. Sakamoto, Y. Yamashita, N. Yoshida, M. Watanabe, H. Baba // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2016. - Vol. 22, N 22. - P. 5574-81.
16. Mima, R. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis / K. Mima, R. Nishihara, Z.R. Qian, Y. Cao, Y. Sukawa, J.A. Nowak, J. Yang, R. Dou, Y. Masugi, M. Song, A.D. Kostic, M. Giannakis, S. Bullman, D.A. Milner, H. Baba, E.L. Giovannucci, L.A. Garraway, G.J. Freeman, G. Dranoff, W.S. Garrett, C. Huttenhower, M. Meyerson, J.A. Meyerhardt, A.T. Chan, C.S. Fuchs, S. Ogino // *Gut*. - 2016. - Vol. 65, N 12. - P. 1973-80.
17. Yang, Y. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor-kappaB, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21 / Y. Yang, W. Weng, J. Peng, L. Hong, L. Yang, Y. Toiyama, R. Gao, M. Liu, M. Yin, C. Pan, H. Li, B. Guo, Q. Zhu, Q. Wei, M.P. Moyer, P. Wang, S. Cai, A. Goel, H. Qin, Y. Ma // *Gastroenterology*. - 2017. - Vol. 152, N 4. - P. 851-66 e24.
18. Sun, C.H. The role of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer: from carcinogenesis to clinical management / C.H. Sun, B.B. Li, B. Wang, J. Zhao, X.Y. Zhang, T.T. Li, W.B. Li, D. Tang, M.J. Qiu, X.C. Wang, C.M. Zhu, Z.R. Qian // *Chronic Dis Transl Med*. - 2019. - Vol. 5, N 3. - P. 178-87.
19. Bourigault, M.L. Tumor necrosis factor neutralization combined with chemotherapy enhances *Mycobacterium tuberculosis* clearance and reduces lung pathology / M.L. Bourigault, R. Vacher, S. Rose, M.L. Olleros, J.P. Janssens, V.F. Quesniaux, I. Garcia // *Am J Clin Exp Immunol*. - 2013. - Vol. 2, N 1. - P. 124-34.
20. Laroumagne, S. [Incidence and characteristics of bronchial colonisation in patient with lung cancer: a retrospective study of 388 cases] / S. Laroumagne, A. Salinas-Pineda, C. Hermant, M.

Morris, P.A. Gourraud, C. Do, C. Segonds, A. Didier, J. Mazieres // *Rev Mal Respir.* - 2011. - Vol. 28, N 3. - P. 328-35.

21. Hosgood, H.D. The potential role of lung microbiota in lung cancer attributed to household coal burning exposures / H.D. Hosgood, 3rd, A.R. Sapkota, N. Rothman, T. Rohan, W. Hu, J. Xu, R. Vermeulen, X. He, J.R. White, G. Wu, F. Wei, E.F. Mongodin, Q. Lan // *Environ Mol Mutagen.* - 2014. - Vol. 55, N 8. - P. 643-51.

22. Chang, S.H. T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer / S.H. Chang, S.G. Mirabolfathinejad, H. Katta, A.M. Cumpian, L. Gong, M.S. Caetano, S.J. Moghaddam, C. Dong // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* - 2014. - Vol. 111, N 15. - P. 5664-9.

23. Mao, Q. Interplay between the lung microbiome and lung cancer / Q. Mao, F. Jiang, R. Yin, J. Wang, W. Xia, G. Dong, W. Ma, Y. Yang, L. Xu, J. Hu // *Cancer letters.* - 2018. - Vol. 415, N. - P. 40-8.

24. Urbaniak, C. The Microbiota of Breast Tissue and Its Association with Breast Cancer / C. Urbaniak, G.B. Gloor, M. Brackstone, L. Scott, M. Tangney, G. Reid // *Applied and environmental microbiology.* - 2016. - Vol. 82, N 16. - P. 5039-48.

25. Barta, J.A. Global Epidemiology of Lung Cancer / J.A. Barta, C.A. Powell, J.P. Wisnivesky // *Ann Glob Health.* - 2019. - Vol. 85, N 1. - P.

26. Трахтенберг, А.Х. Особенности диагностики и лечения рака легкого / А.Х. Трахтенберг, К.И. Колбанов, С. С.А. // *Пульмонология.* - 2008. - Vol. 4, N. - P. 5-17.

27. da Cunha Santos, G. EGFR mutations and lung cancer / G. da Cunha Santos, F.A. Shepherd, M.S. Tsao // *Annual review of pathology.* - 2011. - Vol. 6, N. - P. 49-69.

28. Corrales, L. Immunotherapy in Lung Cancer: A New Age in Cancer Treatment / L. Corrales, K. Scilla, C. Caglevic, K. Miller, J. Oliveira, C. Rolfo // *Advances in experimental medicine and biology.* - 2018. - Vol. 995, N. - P. 65-95.

29. Lurienne, L. NSCLC Immunotherapy Efficacy and Antibiotic Use: A Systematic Review and Meta-Analysis / L. Lurienne, J. Cervesi, L. Duhalde, J. de Gunzburg, A. Andreumont, G. Zalcmann, R. Buffet, P.A. Bandinelli // *J Thorac Oncol.* - 2020. - Vol. 15, N 7. - P. 1147-59.

30. Bray, F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal // *CA: a cancer journal for clinicians.* - 2018. - Vol. 68, N 6. - P. 394-424.

31. Аксель, Е.М. Статистика злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта / Е.М. Аксель // *Сибирский онкологический журнал.* - 2017. - Vol. 16, N 3. - P. 5-11.



32. Glenn, T.F. Esophageal cancer. Facts, figures, and screening / T.F. Glenn // *Gastroenterol Nurs.* - 2001. - Vol. 24, N 6. - P. 271-3; quiz 4-5.
33. Tang, X. A Novel Nomogram and Risk Classification System Predicting the Cancer-Specific Survival of Patients with Initially Diagnosed Metastatic Esophageal Cancer: A SEER-Based Study / X. Tang, X. Zhou, Y. Li, X. Tian, Y. Wang, M. Huang, L. Ren, L. Zhou, Z. Ding, J. Zhu, Y. Xu, F. Peng, J. Wang, Y. Lu, Y. Gong // *Annals of surgical oncology.* - 2019. - Vol. 26, N 2. - P. 321-8.
34. Coussens, L.M. Inflammation and cancer / L.M. Coussens, Z. Werb // *Nature.* - 2002. - Vol. 420, N 6917. - P. 860-7.
35. Brigati, C. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? / C. Brigati, D.M. Noonan, A. Albini, R. Benelli // *ClinExpMetastasis.* - 2002. - Vol. 19, N 3. - P. 247-58.
36. Feiken, E. Neutrophils express tumor necrosis factor-alpha during mouse skin wound healing / E. Feiken, J. Romer, J. Eriksen, L.R. Lund // *JInvest Dermatol.* - 1995. - Vol. 105, N 1. - P. 120-3.
37. Hubner, G. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice / G. Hubner, M. Brauchle, H. Smola, M. Madlener, R. Fassler, S. Werner // *Cytokine.* - 1996. - Vol. 8, N 7. - P. 548-56.
38. Chedid, M. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1 / M. Chedid, J.S. Rubin, K.G. Csaky, S.A. Aaronson // *JBiolChem.* - 1994. - Vol. 269, N 14. - P. 10753-7.
39. Osusky, R. Retinal pigment epithelium cells promote the maturation of monocytes to macrophages in vitro / R. Osusky, P. Malik, S.J. Ryan // *Ophthalmic Res.* - 1997. - Vol. 29, N 1. - P. 31-6.
40. Fritsch, C. Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine / C. Fritsch, P. Simon-Assmann, M. Kedinger, G.S. Evans // *Gastroenterology.* - 1997. - Vol. 112, N 3. - P. 826-38.
41. DiPietro, L.A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells / L.A. DiPietro // *Shock.* - 1995. - Vol. 4, N 4. - P. 233-40.
42. Ma, X. Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF / X. Ma, J. Sun, E. Papasavvas, H. Riemann, S. Robertson, J. Marshall, R.T. Bailer, A. Moore, R.P. Donnelly, G. Trinchieri, L.J. Montaner // *JImmunol.* - 2000. - Vol. 164, N 4. - P. 1722-9.
43. Kuper, H. Infections as a major preventable cause of human cancer / H. Kuper, H.O. Adami, D. Trichopoulos // *JInternMed.* - 2000. - Vol. 248, N 3. - P. 171-83.
44. Blaser, M.J. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach / M.J. Blaser, G.I. Perez-Perez, H.

Kleanthous, T.L. Cover, R.M. Peek, P.H. Chyou, G.N. Stemmermann, A. Nomura // *Cancer Res.* - 1995. - Vol. 55, N 10. - P. 2111-5.

45. Scholl, S.M. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis / S.M. Scholl, C. Pallud, F. Beuvon, K. Hacene, E.R. Stanley, L. Rohrschneider, R. Tang, P. Pouillart, R. Lidereau // *JNatlCancer Inst.* - 1994. - Vol. 86, N 2. - P. 120-6.

46. Shacter, E. Chronic inflammation and cancer / E. Shacter, S.A. Weitzman // *Oncology (WillistonPark).* - 2002. - Vol. 16, N 2. - P. 217-26, 29.

47. Maeda, H. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer / H. Maeda, T. Akaike // *Biochemistry (Mosc).* - 1998. - Vol. 63, N 7. - P. 854-65.

48. Yamanishi, Y. Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium / Y. Yamanishi, D.L. Boyle, S. Rosengren, D.R. Green, N.J. Zvaifler, G.S. Firestein // *ProcNatlAcadSciUSA.* - 2002. - Vol. 99, N 15. - P. 10025-30.

49. Rubin, D.C. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer / D.C. Rubin, A. Shaker, M.S. Levin // *Front Immunol.* - 2012. - Vol. 3, N. - P. 107.

50. Axley, P. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: A Narrative Review / P. Axley, Z. Ahmed, S. Ravi, A.K. Singal // *J Clin Transl Hepatol.* - 2018. - Vol. 6, N 1. - P. 79-84.

51. Ernst, P.B. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer / P.B. Ernst, B.D. Gold // *AnnuRevMicrobiol.* - 2000. - Vol. 54, N. - P. 615-40.

52. 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 // *JExpMed.* - 1999. - Vol. 190, N 10. - P. 1375-82.

53. Ehrlich, P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung / P. Ehrlich // *Ned Tijdschr Geneesk.* - 1909. - Vol. 53, N. - P. 273-90.

54. Ribatti, D. Peter Brian Medawar and the discovery of acquired immunological tolerance / D. Ribatti // *Immunology letters.* - 2015. - Vol. 167, N 2. - P. 63-6.

55. Dighe, A.S. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors / A.S. Dighe, E. Richards, L.J. Old, R.D. Schreiber // *Immunity.* - 1994. - Vol. 1, N 6. - P. 447-56.

56. Whitelaw, D.M. The intravascular lifespan of monocytes / D.M. Whitelaw // *Blood.* - 1966. - Vol. 28, N 3. - P. 455-64.

57. Geissmann, F. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells / F. Geissmann, M.G. Manz, S. Jung, M.H. Sieweke, M. Merad, K. Ley // *Science*. - 2010. - Vol. 327, N 5966. - P. 656-61.
58. Zhang, Y. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation / Y. Zhang, M.J. Morgan, K. Chen, S. Choksi, Z.G. Liu // *Blood*. - 2012. - Vol. 119, N 12. - P. 2895-905.
59. Stout, R.D. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments / R.D. Stout, J. Suttles // *JLeukocBiol*. - 2004. - Vol. 76, N 3. - P. 509-13.
60. Gratchev, A. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals / A. Gratchev, J. Kzhyshkowska, K. Kothe, I. Muller-Molinet, S. Kannookadan, J. Utikal, S. Goerdts // *Immunobiology*. - 2006. - Vol. 211, N 6-8. - P. 473-86.
61. Locati, M. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity / M. Locati, A. Mantovani, A. Sica // *Advances in immunology*. - 2013. - Vol. 120, N. - P. 163-84.
62. Gratchev, A. Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing / A. Gratchev, K. Schledzewski, P. Guillot, S. Goerdts // *Skin pharmacology and applied skin physiology*. - 2001. - Vol. 14, N 5. - P. 272-9.
63. Goerdts, S. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells / S. Goerdts, C.E. Orfanos // *Immunity*. - 1999. - Vol. 10, N 2. - P. 137-42.
64. Gordon, S. Molecular immunobiology of macrophages: recent progress / S. Gordon, S. Clarke, D. Greaves, A. Doyle // *CurrOpinImmunol*. - 1995. - Vol. 7, N 1. - P. 24-33.
65. Gratchev, A. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3 / A. Gratchev, P. Guillot, N. Hakiy, O. Politz, C.E. Orfanos, K. Schledzewski, S. Goerdts // *Scandinavian journal of immunology*. - 2001. - Vol. 53, N 4. - P. 386-92.
66. Gratchev, A. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages / A. Gratchev, J. Kzhyshkowska, J. Utikal, S. Goerdts // *Scandinavian journal of immunology*. - 2005. - Vol. 61, N 1. - P. 10-7.
67. Alternative activation of macrophages / S. Gordon // *NatRevImmunol*. - 2003. - Vol. 3, N 1. - P. 23-35.
68. Gratchev, A. Activation of a TGF-beta-specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-mediated surface expression of TGF-beta receptor II / A. Gratchev, J. Kzhyshkowska, S. Kannookadan, M. Ochsenreiter, A. Popova, X. Yu, S. Mamidi, E. Stonehouse-Usselman, I. Muller-Molinet, L. Gooi, S. Goerdts // *Journal of immunology*. - 2008. - Vol. 180, N 10. - P. 6553-65.

69. Park, S.Y. Stabilin-1 mediates phosphatidylserine-dependent clearance of cell corpses in alternatively activated macrophages / S.Y. Park, M.Y. Jung, S.J. Lee, K.B. Kang, A. Gratchev, V. Riabov, J. Kzhyshkowska, I.S. Kim // *Journal of cell science*. - 2009. - Vol. 122, N Pt 18. - P. 3365-73.
70. Anderson, C.F. Modulating macrophage function with IgG immune complexes / C.F. Anderson, J.S. Gerber, D.M. Mosser // *JEndotoxinRes*. - 2002. - Vol. 8, N 6. - P. 477-81.
71. Herrero, C. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN-gamma / C. Herrero, X. Hu, W.P. Li, S. Samuels, M.N. Sharif, S. Kotenko, L.B. Ivashkiv // *JImmunol*. - 2003. - Vol. 171, N 10. - P. 5034-41.
72. Kim, J. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages / J. Kim, P. Hematti // *Experimental hematology*. - 2009. - Vol. 37, N 12. - P. 1445-53.
73. Chevrier, S. An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma / S. Chevrier, J.H. Levine, V.R.T. Zanotelli, K. Silina, D. Schulz, M. Bacac, C.H. Ries, L. Ailles, M.A.S. Jewett, H. Moch, M. van den Broek, C. Beisel, M.B. Stadler, C. Gedye, B. Reis, D. Pe'er, B. Bodenmiller // *Cell*. - 2017. - Vol. 169, N 4. - P. 736-49 e18.
74. Song, L. Deletion of the murine scavenger receptor CD68 / L. Song, C. Lee, C. Schindler // *Journal of lipid research*. - 2011. - Vol. 52, N 8. - P. 1542-50.
75. Jiang, Z. Structure, organization, and chromosomal mapping of the gene encoding macrosialin, a macrophage-restricted protein / Z. Jiang, D.M. Shih, Y.R. Xia, A.J. Lusis, F.C. de Beer, W.J. de Villiers, D.R. van der Westhuyzen, M.C. de Beer // *Genomics*. - 1998. - Vol. 50, N 2. - P. 199-205.
76. Ramprasad, M.P. The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68 / M.P. Ramprasad, W. Fischer, J.L. Witztum, G.R. Sambrano, O. Quehenberger, D. Steinberg // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 1995. - Vol. 92, N 21. - P. 9580-4.
77. Chistiakov, D.A. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker / D.A. Chistiakov, M.C. Killingsworth, V.A. Myasoedova, A.N. Orekhov, Y.V. Bobryshev // *Lab Invest*. - 2017. - Vol. 97, N 1. - P. 4-13.
78. Holness, C.L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins / C.L. Holness, D.L. Simmons // *Blood*. - 1993. - Vol. 81, N 6. - P. 1607-13.
79. Leek, R.D. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma / R.D. Leek, C.E. Lewis, R. Whitehouse, M. Greenall, J. Clarke, A.L. Harris // *Cancer Res*. - 1996. - Vol. 56, N 20. - P. 4625-9.

80. Leek, R.D. Tumor-associated macrophages in breast cancer / R.D. Leek, A.L. Harris // *JMammaryGlandBiolNeoplasia*. - 2002. - Vol. 7, N 2. - P. 177-89.
81. Saji, H. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma / H. Saji, M. Koike, T. Yamori, S. Saji, M. Seiki, K. Matsushima, M. Toi // *Cancer*. - 2001. - Vol. 92, N 5. - P. 1085-91.
82. Ueno, T. Significance of Macrophage Chemoattractant Protein-1 in Macrophage Recruitment, Angiogenesis, and Survival in Human Breast Cancer / T. Ueno, M. Toi, H. Saji, M. Muta, H. Bando, K. Kuroi, M. Koike, H. Inadera, K. Matsushima // *Clinical Cancer Research*. - 2000. - Vol. 6, N 8. - P. 3282-9.
83. Kacinski, B.M. CSF-1 and its receptor in ovarian, endometrial and breast cancer / B.M. Kacinski // *AnnMed*. - 1995. - Vol. 27, N 1. - P. 79-85.
84. Kacinski, B.M. CSF-1 and its receptor in breast carcinomas and neoplasms of the female reproductive tract / B.M. Kacinski // *MolReprodDev*. - 1997. - Vol. 46, N 1. - P. 71-4.
85. Lin, E.Y. The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression / E.Y. Lin, V. Gouon-Evans, A.V. Nguyen, J.W. Pollard // *JMammaryGlandBiolNeoplasia*. - 2002. - Vol. 7, N 2. - P. 147-62.
86. Smith, H.O. The role of colony-stimulating factor 1 and its receptor in the etiopathogenesis of endometrial adenocarcinoma / H.O. Smith, P.S. Anderson, D.Y. Kuo, G.L. Goldberg, C.L. DeVictoria, C.A. Boocock, J.G. Jones, C.D. Runowicz, E.R. Stanley, J.W. Pollard // *Clinical Cancer Research*. - 1995. - Vol. 1, N 3. - P. 313-25.
87. Fabrick, B.O. The macrophage scavenger receptor CD163 / B.O. Fabrick, C.D. Dijkstra, T.K. van den Berg // *Immunobiology*. - 2005. - Vol. 210, N 2-4. - P. 153-60.
88. Etzerodt, A. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects / A. Etzerodt, S.K. Moestrup // *Antioxid Redox Signal*. - 2013. - Vol. 18, N 17. - P. 2352-63.
89. Yang, L. CD163+ tumor-associated macrophage is a prognostic biomarker and is associated with therapeutic effect on malignant pleural effusion of lung cancer patients / L. Yang, F. Wang, L. Wang, L. Huang, J. Wang, B. Zhang, Y. Zhang // *Oncotarget*. - 2015. - Vol. 6, N 12. - P. 10592-603.
90. Gao, J. A new method for predicting survival in stage I non-small cell lung cancer patients: nomogram based on macrophage immunoscore, TNM stage and lymphocyte-to-monocyte ratio / J. Gao, Y. Ren, H. Guo, R. Mao, H. Xie, H. Su, Y. She, J. Deng, M. Yang, B. Han, Y. Zhang, J. Li, D. Xie, C. Chen // *Ann Transl Med*. - 2020. - Vol. 8, N 7. - P. 470.
91. Sumitomo, R. M2 tumor-associated macrophages promote tumor progression in non-small-cell lung cancer / R. Sumitomo, T. Hirai, M. Fujita, H. Murakami, Y. Otake, C.L. Huang // *Experimental and therapeutic medicine*. - 2019. - Vol. 18, N 6. - P. 4490-8.

92. Shen, J. IL-17 induces macrophages to M2-like phenotype via NF-kappaB / J. Shen, X. Sun, B. Pan, S. Cao, J. Cao, D. Che, F. Liu, S. Zhang, Y. Yu // *Cancer Manag Res.* - 2018. - Vol. 10, N. - P. 4217-28.
93. Jackute, J. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer / J. Jackute, M. Zemaitis, D. Pranys, B. Sitkauskiene, S. Miliauskas, S. Vaitkiene, R. Sakalauskas // *BMC immunology.* - 2018. - Vol. 19, N 1. - P. 3.
94. 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, N 3. - P. 1390-6.
95. Ohnishi, K. Suppression of TLR4-mediated inflammatory response by macrophage class A scavenger receptor (CD204) / K. Ohnishi, Y. Komohara, Y. Fujiwara, K. Takemura, X. Lei, T. Nakagawa, N. Sakashita, M. Takeya // *Biochemical and biophysical research communications.* - 2011. - Vol. 411, N 3. - P. 516-22.
96. Sun, Y. Tumor-Associated CD204-Positive Macrophage Is a Prognostic Marker in Clinical Stage I Lung Adenocarcinoma / Y. Sun, S. Xu // *Biomed Res Int.* - 2018. - Vol. 2018, N. - P. 8459193.
97. Qiu, X. Relationship between stromal cells and tumor spread through air spaces in lung adenocarcinoma / X. Qiu, D. Chen, Y. Liu, S. Duan, F. Zhang, Y. Zhang, F. Li, C. Chen, Y. Chen // *Thorac Cancer.* - 2019. - Vol. 10, N 2. - P. 256-67.
98. Rakaee, M. Prognostic Value of Macrophage Phenotypes in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer Assessed by Multiplex Immunohistochemistry / M. Rakaee, L.R. Busund, S. Jamaly, E.E. Paulsen, E. Richardsen, S. Andersen, S. Al-Saad, R.M. Bremnes, T. Donnem, T.K. Kilvaer // *Neoplasia.* - 2019. - Vol. 21, N 3. - P. 282-93.
99. Heinz, S. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities / S. Heinz, C. Benner, N. Spann, E. Bertolino, Y.C. Lin, P. Laslo, J.X. Cheng, C. Murre, H. Singh, C.K. Glass // *Molecular cell.* - 2010. - Vol. 38, N 4. - P. 576-89.
100. Pang, S.H.M. PU.1 Is Required for the Developmental Progression of Multipotent Progenitors to Common Lymphoid Progenitors / S.H.M. Pang, C.A. de Graaf, D.J. Hilton, N.D. Huntington, S. Carotta, L. Wu, S.L. Nutt // *Front Immunol.* - 2018. - Vol. 9, N. - P. 1264.
101. Xu, Y. Transcription factor PU.1 is involved in the progression of glioma / Y. Xu, S. Gu, Y. Bi, X. Qi, Y. Yan, M. Lou // *Oncology letters.* - 2018. - Vol. 15, N 3. - P. 3753-9.
102. Lin, J. High expression of PU.1 is associated with Her-2 and shorter survival in patients with breast cancer / J. Lin, W. Liu, T. Luan, L. Yuan, W. Jiang, H. Cai, W. Yuan, Y. Wang, Q. Zhang, L. Wang // *Oncology letters.* - 2017. - Vol. 14, N 6. - P. 8220-6.

103. Parra, E.R. Comparison of Different Antibody Clones for Immunohistochemistry Detection of Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) on Non-Small Cell Lung Carcinoma / E.R. Parra, P. Villalobos, B. Mino, J. Rodriguez-Canales // *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. - 2018. - Vol. 26, N 2. - P. 83-93.
104. Shi, X. PD-L1 expression in lung adenosquamous carcinomas compared with the more common variants of non-small cell lung cancer / X. Shi, S. Wu, J. Sun, Y. Liu, X. Zeng, Z. Liang // *Scientific reports*. - 2017. - Vol. 7, N. - P. 46209.
105. Bassanelli, M. Heterogeneity of PD-L1 Expression and Relationship with Biology of NSCLC / M. Bassanelli, S. Sioletic, M. Martini, S. Giacinti, A. Viterbo, A. Staddon, F. Liberati, A. Ceribelli // *Anticancer research*. - 2018. - Vol. 38, N 7. - P. 3789-96.
106. Okazaki, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine / T. Okazaki, A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, T. Honjo // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2001. - Vol. 98, N 24. - P. 13866-71.
107. Pawelczyk, K. Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological Factors and Diagnostic Markers / K. Pawelczyk, A. Piotrowska, U. Ciesielska, K. Jablonska, N. Gletzel-Plucinska, J. Grzegorzolka, M. Podhorska-Okolow, P. Dziegiel, K. Nowinska // *International journal of molecular sciences*. - 2019. - Vol. 20, N 4. - P.
108. Schmidt, L.H. PD-1 and PD-L1 Expression in NSCLC Indicate a Favorable Prognosis in Defined Subgroups / L.H. Schmidt, A. Kummel, D. Gorlich, M. Mohr, S. Brockling, J.H. Mikesch, I. Grunewald, A. Marra, A.M. Schultheis, E. Wardelmann, C. Muller-Tidow, T. Spieker, C. Schliemann, W.E. Berdel, R. Wiewrodt, W. Hartmann // *PloS one*. - 2015. - Vol. 10, N 8. - P. e0136023.
109. Kollmann, D. PD-L1 expression is an independent predictor of favorable outcome in patients with localized esophageal adenocarcinoma / D. Kollmann, D. Ignatova, J. Jedamzik, Y.T. Chang, G. Jomrich, A. Baierl, D. Kazakov, M. Michal, L.E. French, W. Hoetzenecker, T. Schatton, R. Asari, M. Preusser, M. Gnant, E. Guenova, S.F. Schoppmann // *Oncoimmunology*. - 2018. - Vol. 7, N 6. - P. e1435226.
110. Tang, Y. The association between PD-L1 and EGFR status and the prognostic value of PD-L1 in advanced non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs / Y. Tang, W. Fang, Y. Zhang, S. Hong, S. Kang, Y. Yan, N. Chen, J. Zhan, X. He, T. Qin, G. Li, W. Tang, P. Peng, L. Zhang // *Oncotarget*. - 2015. - Vol. 6, N 16. - P. 14209-19.
111. Kim, M.Y. Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: Comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers

/ M.Y. Kim, J. Koh, S. Kim, H. Go, Y.K. Jeon, D.H. Chung // *Lung Cancer*. - 2015. - Vol. 88, N 1. - P. 24-33.

112. Cooper, W.A. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma / W.A. Cooper, T. Tran, R.E. Vilain, J. Madore, C.I. Selinger, M. Kohonen-Corish, P. Yip, B. Yu, S.A. O'Toole, B.C. McCaughan, J.H. Yearley, L.G. Horvath, S. Kao, M. Boyer, R.A. Scolyer // *Lung Cancer*. - 2015. - Vol. 89, N 2. - P. 181-8.

113. Aguilar, E. J. Outcomes to first-line pembrolizumab in patients with non-small-cell lung cancer and very high PD-L1 expression / E.J. Aguilar, B. Ricciuti, J.F. Gainor, K.L. Kehl, S. Kravets, S. Dahlberg, M. Nishino, L.M. Sholl, A. Adeni, S. Subegdjo, S. Khosrowjerdi, R.M. Peterson, S. Digumarthy, C. Liu, J. Sauter, H. Rizvi, K.C. Arbour, B.W. Carter, J.V. Heymach, M. Altan, M.D. Hellmann, M.M. Awad // *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. - 2019. - Vol. 30, N 10. - P. 1653-9.

114. Grohmann, U. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO / U. Grohmann, F. Fallarino, P. Puccetti // *Trends Immunol*. - 2003. - Vol. 24, N 5. - P. 242-8.

115. King, N.J. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase / N.J. King, S.R. Thomas // *Int J Biochem Cell Biol*. - 2007. - Vol. 39, N 12. - P. 2167-72.

116. Takikawa, O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism / O. Takikawa // *Biochemical and biophysical research communications*. - 2005. - Vol. 338, N 1. - P. 12-9.

117. Chen, J.Y. Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2,3-dioxygenase promotes breast cancer progression / J.Y. Chen, C.F. Li, C.C. Kuo, K.K. Tsai, M.F. Hou, W.C. Hung // *Breast Cancer Res*. - 2014. - Vol. 16, N 4. - P. 410.

118. Heeren, A.M. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression Pattern in the Tumor Microenvironment Predicts Clinical Outcome in Early Stage Cervical Cancer / A.M. Heeren, I. van Dijk, D. Berry, M. Khelil, D. Ferns, J. Kole, R.J.P. Musters, V.L. Thijssen, C.H. Mom, G.G. Kenter, M.C.G. Bleeker, T.D. de Gruijl, E.S. Jordanova // *Front Immunol*. - 2018. - Vol. 9, N. - P. 1598.

119. Wainwright, D.A. IDO expression in brain tumors increases the recruitment of regulatory T cells and negatively impacts survival / D.A. Wainwright, I.V. Balyasnikova, A.L. Chang, A.U. Ahmed, K.S. Moon, B. Auffinger, A.L. Tobias, Y. Han, M.S. Lesniak // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2012. - Vol. 18, N 22. - P. 6110-21.

120. Chevolet, I. Characterization of the in vivo immune network of IDO, tryptophan metabolism, PD-L1, and CTLA-4 in circulating immune cells in melanoma / I. Chevolet, R. Speeckaert, M. Schreuer, B. Neyns, O. Krysko, C. Bachert, B. Hennart, D. Allorge, N. van Geel, M. Van Gele, L. Brochez // *Oncoimmunology*. - 2015. - Vol. 4, N 3. - P. e982382.



121. Ino, K. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival / K. Ino, E. Yamamoto, K. Shibata, H. Kajiyama, N. Yoshida, M. Terauchi, A. Nawa, T. Nagasaka, O. Takikawa, F. Kikkawa // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2008. - Vol. 14, N 8. - P. 2310-7.
122. Inaba, T. Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma / T. Inaba, K. Ino, H. Kajiyama, E. Yamamoto, K. Shibata, A. Nawa, T. Nagasaka, H. Akimoto, O. Takikawa, F. Kikkawa // *Gynecol Oncol*. - 2009. - Vol. 115, N 2. - P. 185-92.
123. 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, N 2. - P. 370-8.
124. Uyttenhove, C. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase / C. Uyttenhove, L. Pilotte, I. Theate, V. Stroobant, D. Colau, N. Parmentier, T. Boon, B.J. Van den Eynde // *Nature medicine*. - 2003. - Vol. 9, N 10. - P. 1269-74.
125. Zamanakou, M. Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase / M. Zamanakou, A.E. Germentis, V. Karanikas // *Immunology letters*. - 2007. - Vol. 111, N 2. - P. 69-75.
126. Wang, Y. The status of immunosuppression in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer correlates with the clinical characteristics and response to chemotherapy / Y. Wang, G.F. Hu, Z.H. Wang // *OncoTargets and therapy*. - 2017. - Vol. 10, N. - P. 3557-66.
127. Holmgaard, R.B. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4 / R.B. Holmgaard, D. Zamarin, D.H. Munn, J.D. Wolchok, J.P. Allison // *The Journal of experimental medicine*. - 2013. - Vol. 210, N 7. - P. 1389-402.
128. Botticelli, A. Can IDO activity predict primary resistance to anti-PD-1 treatment in NSCLC? / A. Botticelli, B. Cerbelli, L. Lionetto, I. Zizzari, M. Salati, A. Pisano, M. Federica, M. Simmaco, M. Nuti, P. Marchetti // *Journal of translational medicine*. - 2018. - Vol. 16, N 1. - P. 219.
129. Stuehr, D.J. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway / D.J. Stuehr // *The Journal of nutrition*. - 2004. - Vol. 134, N 10 Suppl. - P. 2748S-51S; discussion 65S-67S.
130. Hao, X.P. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is expressed similarly in multiple aberrant crypt foci and colorectal tumors from the same patients / X.P. Hao, T.G. Pretlow, J.S. Rao, T.P. Pretlow // *Cancer Res*. - 2001. - Vol. 61, N 2. - P. 419-22.
131. Nathan, C. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls / C. Nathan, Q.W. Xie // *Cell*. - 1994. - Vol. 78, N 6. - P. 915-8.

132. Gao, Y. Nitric oxide synthase inhibitors 1400W and L-NIO inhibit angiogenesis pathway of colorectal cancer / Y. Gao, S. Zhou, Y. Xu, S. Sheng, S.Y. Qian, X. Huo // *Nitric Oxide*. - 2019. - Vol. 83, N. - P. 33-9.
133. Fahey, J.M. Nitric oxide-mediated resistance to photodynamic therapy in a human breast tumor xenograft model: Improved outcome with NOS2 inhibitors / J.M. Fahey, A.W. Girotti // *Nitric Oxide*. - 2017. - Vol. 62, N. - P. 52-61.
134. Ekmekcioglu, S. Targeting iNOS to increase efficacy of immunotherapies / S. Ekmekcioglu, E.A. Grimm, J. Roszik // *Hum Vaccin Immunother*. - 2017. - Vol. 13, N 5. - P. 1105-8.
135. Lopez-Rivera, E. Inducible nitric oxide synthase drives mTOR pathway activation and proliferation of human melanoma by reversible nitrosylation of TSC2 / E. Lopez-Rivera, P. Jayaraman, F. Parikh, M.A. Davies, S. Ekmekcioglu, S. Izadmehr, D.R. Milton, J.E. Chipuk, E.A. Grimm, Y. Estrada, J. Aguirre-Ghiso, A.G. Sikora // *Cancer Res*. - 2014. - Vol. 74, N 4. - P. 1067-78.
136. Garrido, P. Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways / P. Garrido, A. Shalaby, E.M. Walsh, N. Keane, M. Webber, M.M. Keane, F.J. Sullivan, M.J. Kerin, G. Callagy, A.E. Ryan, S.A. Glynn // *Oncotarget*. - 2017. - Vol. 8, N 46. - P. 80568-88.
137. Chen, C.N. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer / C.N. Chen, F.J. Hsieh, Y.M. Cheng, K.J. Chang, P.H. Lee // *Journal of surgical oncology*. - 2006. - Vol. 94, N 3. - P. 226-33.
138. Raspollini, M.R. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome / M.R. Raspollini, G. Amunni, A. Villanucci, V. Boddi, G. Baroni, A. Taddei, G.L. Taddei // *Gynecol Oncol*. - 2004. - Vol. 92, N 3. - P. 806-12.
139. Ropponen, K.M. Expression of inducible nitric oxide synthase in colorectal cancer and its association with prognosis / K.M. Ropponen, J.K. Kellokoski, P.K. Lipponen, M.J. Eskelinen, L. Alanne, E.M. Alhava, V.M. Kosma // *Scandinavian journal of gastroenterology*. - 2000. - Vol. 35, N 11. - P. 1204-11.
140. Puhakka, A. High expression of nitric oxide synthases is a favorable prognostic sign in non-small cell lung carcinoma / A. Puhakka, V. Kinnula, U. Napankangas, M. Saily, P. Koistinen, P. Paakko, Y. Soini // *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. - 2003. - Vol. 111, N 12. - P. 1137-46.
141. Schmidt, H. Elevated serum level of YKL-40 is an independent prognostic factor for poor survival in patients with metastatic melanoma / H. Schmidt, J.S. Johansen, J. Gehl, P.F. Geertsens, K. Fode, M.H. von der // *Cancer*. - 2006. - Vol. 106, N 5. - P. 1130-9.
142. Biggar, R.J. Serum YKL-40 and interleukin 6 levels in Hodgkin lymphoma / R.J. Biggar, J.S. Johansen, K.E. Smedby, K. Rostgaard, E.T. Chang, H.O. Adami, B. Glimelius, D. Molin, S.

Hamilton-Dutoit, M. Melbye, H. Hjalgrim // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* - 2008. - Vol. 14, N 21. - P. 6974-8.

143. Roslind, A. YKL-40 protein expression is not a prognostic marker in patients with primary breast cancer / A. Roslind, A.S. Knoop, M.B. Jensen, J.S. Johansen, D.L. Nielsen, P.A. Price, E. Balslev // *Breast Cancer Res Treat.* - 2008. - Vol. 112, N 2. - P. 275-85.

144. Ku, B. M. CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates the invasion, growth and survival of glioma cells / B.M. Ku, Y.K. Lee, J. Ryu, J.Y. Jeong, J. Choi, K.M. Eun, H.Y. Shin, D.G. Kim, E.M. Hwang, J.C. Yoo, J.Y. Park, G.S. Roh, H.J. Kim, G.J. Cho, W.S. Choi, S.H. Paek, S.S. Kang // *International journal of cancer Journal international du cancer.* - 2011. - Vol. 128, N 6. - P. 1316-26.

145. Kawada, M. Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer / M. Kawada, H. Seno, K. Kanda, Y. Nakanishi, R. Akitake, H. Komekado, K. Kawada, Y. Sakai, E. Mizoguchi, T. Chiba // *Oncogene.* - 2012. - Vol. 31, N 26. - P. 3111-23.

146. Hu, B. Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family / B. Hu, K. Trinh, W.F. Figueira, P.A. Price // *JBiolChem.* - 1996. - Vol. 271, N 32. - P. 19415-20.

147. Steck, E. Enhanced expression of the human chitinase 3-like 2 gene (YKL-39) but not chitinase 3-like 1 gene (YKL-40) in osteoarthritic cartilage / E. Steck, S. Breit, S.J. Breusch, M. Axt, W. Richter // *BiochemBiophysResCommun.* - 2002. - Vol. 299, N 1. - P. 109-15.

148. Knorr, T. YKL-39 (chitinase 3-like protein 2), but not YKL-40 (chitinase 3-like protein 1), is up regulated in osteoarthritic chondrocytes / T. Knorr, F. Obermayr, E. Bartnik, A. Zien, T. Aigner // *AnnRheumDis.* - 2003. - Vol. 62, N 10. - P. 995-8.

149. Colton, C.A. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD / C.A. Colton, R.T. Mott, H. Sharpe, Q. Xu, W.E. Van Nostrand, M.P. Vitek // *JNeuroinflammation.* - 2006. - Vol. 3, N. - P. 27.

150. Miyatake, K. Human YKL39 (chitinase 3-like protein 2), an osteoarthritis-associated gene, enhances proliferation and type II collagen expression in ATDC5 cells / K. Miyatake, K. Tsuji, M. Yamaga, J. Yamada, Y. Matsukura, K. Abula, I. Sekiya, T. Muneta // *Biochemical and biophysical research communications.* - 2013. - Vol. 431, N 1. - P. 52-7.

151. Shang, G.S. IL-6 and TNF-alpha promote metastasis of lung cancer by inducing epithelial-mesenchymal transition / G.S. Shang, L. Liu, Y.W. Qin // *Oncology letters.* - 2017. - Vol. 13, N 6. - P. 4657-60.

152. Ohri, C.M. Tumour necrosis factor-alpha expression in tumour islets confers a survival advantage in non-small cell lung cancer / C.M. Ohri, A. Shikotra, R.H. Green, D.A. Waller, P. Bradding // *BMC cancer.* - 2010. - Vol. 10, N. - P. 323.

153. Antonia, S.J. Immunologic nonresponsiveness to tumors / S.J. Antonia, M. Extermann, R.A. Flavell // *Crit Rev Oncog.* - 1998. - Vol. 9, N 1. - P. 35-41.

154. He, C. The inhibitory role of b7-h4 in antitumor immunity: association with cancer progression and survival / C. He, H. Qiao, H. Jiang, X. Sun // *Clinical & developmental immunology.* - 2011. - Vol. 2011, N. - P. 695834.

155. Sharma, P. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy / P. Sharma, S. Hu-Lieskovan, J.A. Wargo, A. Ribas // *Cell.* - 2017. - Vol. 168, N 4. - P. 707-23.

156. Hurkmans, D.P. Tumor mutational load, CD8(+) T cells, expression of PD-L1 and HLA class I to guide immunotherapy decisions in NSCLC patients / D.P. Hurkmans, M.E. Kuipers, J. Smit, R. van Marion, R.H.J. Mathijssen, P.E. Postmus, P.S. Hiemstra, J. Aerts, J.H. von der Thusen, S.H. van der Burg // *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* - 2020. - Vol. 69, N 5. - P. 771-7.

157. Emens, L.A. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study / L.A. Emens, C. Cruz, J.P. Eder, F. Braiteh, C. Chung, S.M. Tolaney, I. Kuter, R. Nanda, P.A. Cassier, J.P. Delord, M.S. Gordon, E. ElGabry, C.W. Chang, I. Sarkar, W. Grossman, C. O'Hear, M. Fasso, L. Molinero, P. Schmid // *JAMA Oncol.* - 2019. - Vol. 5, N 1. - P. 74-82.

158. Coffey, P.J. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system / P.J. Coffey, B.M. Burgering // *Nature reviews Immunology.* - 2004. - Vol. 4, N 11. - P. 889-99.

159. Schubert, L.A. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation / L.A. Schubert, E. Jeffery, Y. Zhang, F. Ramsdell, S.F. Ziegler // *J Biol Chem.* - 2001. - Vol. 276, N 40. - P. 37672-9.

160. Fontenot, J.D. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells / J.D. Fontenot, M.A. Gavin, A.Y. Rudensky // *Nature immunology.* - 2003. - Vol. 4, N 4. - P. 330-6.

161. Hori, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 / S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi // *Science.* - 2003. - Vol. 299, N 5609. - P. 1057-61.

162. Sakaguchi, S. Regulatory T Cells and Human Disease / S. Sakaguchi, N. Mikami, J.B. Wing, A. Tanaka, K. Ichiyama, N. Ohkura // *Annu Rev Immunol.* - 2020. - Vol. 38, N. - P. 541-66.

163. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self / S. Sakaguchi // *Nat Immunol.* - 2005. - Vol. 6, N 4. - P. 345-52.

164. Scotta, C. FOXP3 induced by CD28/B7 interaction regulates CD25 and anergic phenotype in human CD4+CD25- T lymphocytes / C. Scotta, M. Soligo, C. Camperio, E. Piccolella // *Journal of immunology.* - 2008. - Vol. 181, N 2. - P. 1025-33.

165. Facciabene, A. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells / A. Facciabene, X. Peng, I.S. Hagemann, K. Balint, A. Barchetti, L.P. Wang, P.A. Gimotty, C.B. Gilks, P. Lal, L. Zhang, G. Coukos // *Nature*. - 2011. - Vol. 475, N 7355. - P. 226-30.
166. Tao, H. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells / H. Tao, Y. Mimura, K. Aoe, S. Kobayashi, H. Yamamoto, E. Matsuda, K. Okabe, T. Matsumoto, K. Sugi, H. Ueoka // *Lung Cancer*. - 2012. - Vol. 75, N 1. - P. 95-101.
167. Shimizu, K. Tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer / K. Shimizu, M. Nakata, Y. Hiram, T. Yukawa, A. Maeda, K. Tanemoto // *J Thorac Oncol*. - 2010. - Vol. 5, N 5. - P. 585-90.
168. Shang, B. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis / B. Shang, Y. Liu, S.J. Jiang, Y. Liu // *Scientific reports*. - 2015. - Vol. 5, N. - P. 15179.
169. Marsigliante, S. Computerised counting of tumour infiltrating lymphocytes in 90 breast cancer specimens / S. Marsigliante, L. Biscozzo, A. Marra, G. Nicolardi, G. Leo, G.B. Lobreglio, C. Storelli // *Cancer letters*. - 1999. - Vol. 139, N 1. - P. 33-41.
170. Petitprez, F. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma / F. Petitprez, A. de Reynies, E.Z. Keung, T.W. Chen, C.M. Sun, J. Calderaro, Y.M. Jeng, L.P. Hsiao, L. Lacroix, A. Bougouin, M. Moreira, G. Lacroix, I. Natario, J. Adam, C. Lucchesi, Y.H. Laizet, M. Toulmonde, M.A. Burgess, V. Bolejack, D. Reinke, K.M. Wani, W.L. Wang, A.J. Lazar, C.L. Roland, J.A. Wargo, A. Italiano, C. Sautes-Fridman, H.A. Tawbi, W.H. Fridman // *Nature*. - 2020. - Vol. 577, N 7791. - P. 556-60.
171. Mahmoud, S.M. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast / S.M. Mahmoud, A.H. Lee, E.C. Paish, R.D. Macmillan, I.O. Ellis, A.R. Green // *Breast Cancer Res Treat*. - 2012. - Vol. 132, N 2. - P. 545-53.
172. Edin, S. The Prognostic Importance of CD20(+) B lymphocytes in Colorectal Cancer and the Relation to Other Immune Cell subsets / S. Edin, T. Kaprio, J. Hagstrom, P. Larsson, H. Mustonen, C. Bockelman, K. Strigard, U. Gunnarsson, C. Haglund, R. Palmqvist // *Scientific reports*. - 2019. - Vol. 9, N 1. - P. 19997.
173. Germain, C. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer / C. Germain, S. Gnjjatic, F. Tamzalit, S. Knockaert, R. Remark, J. Goc, A. Lepelley, E. Becht, S. Katsahian, G. Bizouard, P. Validire, D. Damotte, M. Alifano, P. Magdeleinat, I. Cremer, J.L. Teillaud, W.H. Fridman, C. Sautes-Fridman, M.C. Dieu-Nosjean // *American journal of respiratory and critical care medicine*. - 2014. - Vol. 189, N 7. - P. 832-44.

174. Santoiemma, P.P. Systematic evaluation of multiple immune markers reveals prognostic factors in ovarian cancer / P.P. Santoiemma, C. Reyes, L.P. Wang, M.W. McLane, M.D. Feldman, J.L. Tanyi, D.J. Powell, Jr. // *Gynecol Oncol.* - 2016. - Vol. 143, N 1. - P. 120-7.
175. Garg, K. Tumor-associated B cells in cutaneous primary melanoma and improved clinical outcome / K. Garg, M. Maurer, J. Griss, M.C. Bruggen, I.H. Wolf, C. Wagner, N. Willi, K.D. Mertz, S.N. Wagner // *Human pathology.* - 2016. - Vol. 54, N. - P. 157-64.
176. Lertkiatmongkol, P. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) / P. Lertkiatmongkol, D. Liao, H. Mei, Y. Hu, P.J. Newman // *Curr Opin Hematol.* - 2016. - Vol. 23, N 3. - P. 253-9.
177. Qian, H. A comparison of CD105 and CD31 expression in tumor vessels of hepatocellular carcinoma by tissue microarray and flow cytometry / H. Qian, L. Yang, W. Zhao, H. Chen, S. He // *Experimental and therapeutic medicine.* - 2018. - Vol. 16, N 4. - P. 2881-8.
178. Bosmuller, H. Microvessel density and angiogenesis in primary hepatic malignancies: Differential expression of CD31 and VEGFR-2 in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma / H. Bosmuller, V. Pfefferle, Z. Bittar, V. Scheble, M. Horger, B. Sipos, F. Fend // *Pathology, research and practice.* - 2018. - Vol. 214, N 8. - P. 1136-41.
179. Virman, J. VEGFR3 and CD31 as prognostic factors in renal cell cancer / J. Virman, P. Bono, T. Luukkaala, K. Sunela, P. Kujala, P.L. Kellokumpu-Lehtinen // *Anticancer research.* - 2015. - Vol. 35, N 2. - P. 921-7.
180. Emmert, A.O. Prognostic Significance of CD31 Expression in Patients with Non-Small-Cell-Lung Cancer / A.O. Emmert, A.; Füzesi, L.; Waldmann-Beushausen, R.; Bohnenberger, H.; Schöndube, F.; Danner, B. // *Advances in Lung Cancer.* - 2016. - Vol. 5, N. - P. 21-9.
181. Mohamed, S.Y. Role of VEGF, CD105, and CD31 in the Prognosis of Colorectal Cancer Cases / S.Y. Mohamed, H.L. Mohammed, H.M. Ibrahim, E.M. Mohamed, M. Salah // *J Gastrointest Cancer.* - 2019. - Vol. 50, N 1. - P. 23-34.
182. Rask, L. Association of CD31 and p53 With Survival of Ovarian Cancer Patients / L. Rask, C.K. Hogdall, S.K. Kjaer, L. Christensen, A. Jensen, J. Blaakaer, I.J. Christensen, E.V.S. Hogdall // *Anticancer research.* - 2019. - Vol. 39, N 2. - P. 567-76.
183. Gulubova, M. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer / M. Gulubova, T. Vlaykova // *J Gastroenterol Hepatol.* - 2009. - Vol. 24, N 7. - P. 1265-75.
184. Saad, R.S. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer / R.S. Saad, Y.L. Liu, G. Nathan, J. Celebrezze, D. Medich, J.F. Silverman // *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* - 2004. - Vol. 17, N 2. - P. 197-203.

185. Cammarota, R. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker / R. Cammarota, V. Bertolini, G. Pennesi, E.O. Bucci, O. Gottardi, C. Garlanda, L. Laghi, M.C. Barberis, F. Sessa, D.M. Noonan, A. Albini // *Journal of translational medicine*. - 2010. - Vol. 8, N. - P. 112.
186. Yu, G. Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features / G. Yu, M.H. Gail, D. Consonni, M. Carugno, M. Humphrys, A.C. Pesatori, N.E. Caporaso, J.J. Goedert, J. Ravel, M.T. Landi // *Genome biology*. - 2016. - Vol. 17, N 1. - P. 163.
187. Dong, Q. Host-Microbiome Interaction in Lung Cancer / Q. Dong, E.S. Chen, C. Zhao, C. Jin // *Front Immunol*. - 2021. - Vol. 12, N. - P. 679829.
188. Zhao, L. Genomics: The tale of our other genome / L. Zhao // *Nature*. - 2010. - Vol. 465, N 7300. - P. 879-80.
189. Charlson, E.S. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract / E.S. Charlson, K. Bittinger, A.R. Haas, A.S. Fitzgerald, I. Frank, A. Yadav, F.D. Bushman, R.G. Collman // *American journal of respiratory and critical care medicine*. - 2011. - Vol. 184, N 8. - P. 957-63.
190. Segal, L.N. A brave new world: the lung microbiota in an era of change / L.N. Segal, M.J. Blaser // *Ann Am Thorac Soc*. - 2014. - Vol. 11 Suppl 1, N. - P. S21-7.
191. Dickson, R.P. Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis / R.P. Dickson, J.R. Erb-Downward, G.B. Huffnagle // *Lancet Respir Med*. - 2014. - Vol. 2, N 3. - P. 238-46.
192. Erb-Downward, J.R. Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD / J.R. Erb-Downward, D.L. Thompson, M.K. Han, C.M. Freeman, L. McCloskey, L.A. Schmidt, V.B. Young, G.B. Toews, J.L. Curtis, B. Sundaram, F.J. Martinez, G.B. Huffnagle // *PloS one*. - 2011. - Vol. 6, N 2. - P. e16384.
193. Hilty, M. Disordered microbial communities in asthmatic airways / M. Hilty, C. Burke, H. Pedro, P. Cardenas, A. Bush, C. Bossley, J. Davies, A. Ervine, L. Poulter, L. Pachter, M.F. Moffatt, W.O. Cookson // *PloS one*. - 2010. - Vol. 5, N 1. - P. e8578.
194. Beck, J.M. The microbiome of the lung / J.M. Beck, V.B. Young, G.B. Huffnagle // *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. - 2012. - Vol. 160, N 4. - P. 258-66.
195. Raviglione, M. Tuberculosis 2015: Burden, Challenges and Strategy for Control and Elimination / M. Raviglione, G. Sulis // *Infect Dis Rep*. - 2016. - Vol. 8, N 2. - P. 6570.
196. Fogel, N. Tuberculosis: a disease without boundaries / N. Fogel // *Tuberculosis (Edinb)*. - 2015. - Vol. 95, N 5. - P. 527-31.

197. Liang, H.Y. Facts and fiction of the relationship between preexisting tuberculosis and lung cancer risk: a systematic review / H.Y. Liang, X.L. Li, X.S. Yu, P. Guan, Z.H. Yin, Q.C. He, B.S. Zhou // *International journal of cancer Journal international du cancer*. - 2009. - Vol. 125, N 12. - P. 2936-44.
198. Sethi, S. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review / S. Sethi, T.F. Murphy // *Clin Microbiol Rev*. - 2001. - Vol. 14, N 2. - P. 336-63.
199. Gu, X.X. Quantitation and biological properties of released and cell-bound lipooligosaccharides from nontypeable *Haemophilus influenzae* / X.X. Gu, C.M. Tsai, M.A. Apicella, D.J. Lim // *Infection and immunity*. - 1995. - Vol. 63, N 10. - P. 4115-20.
200. Garcia-Nunez, M. Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease / M. Garcia-Nunez, L. Millares, X. Pomares, R. Ferrari, V. Perez-Brocal, M. Gallego, M. Espasa, A. Moya, E. Monso // *Journal of clinical microbiology*. - 2014. - Vol. 52, N 12. - P. 4217-23.
201. Sze, M.A. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease / M.A. Sze, P.A. Dimitriu, S. Hayashi, W.M. Elliott, J.E. McDonough, J.V. Gosselink, J. Cooper, D.D. Sin, W.W. Mohn, J.C. Hogg // *American journal of respiratory and critical care medicine*. - 2012. - Vol. 185, N 10. - P. 1073-80.
202. Chen, J. Microbiota dysbiosis in select human cancers: Evidence of association and causality / J. Chen, J.C. Domingue, C.L. Sears // *Seminars in immunology*. - 2017. - Vol. 32, N. - P. 25-34.
203. Rubinstein, M.R. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin / M.R. Rubinstein, X. Wang, W. Liu, Y. Hao, G. Cai, Y.W. Han // *Cell host & microbe*. - 2013. - Vol. 14, N 2. - P. 195-206.
204. Greathouse, K.L. Interaction between the microbiome and TP53 in human lung cancer / K.L. Greathouse, J.R. White, A.J. Vargas, V.V. Bliskovsky, J.A. Beck, N. von Muhlinen, E.C. Polley, E.D. Bowman, M.A. Khan, A.I. Robles, T. Cooks, B.M. Ryan, N. Padgett, A.H. Dzutsev, G. Trinchieri, M.A. Pineda, S. Bilke, P.S. Meltzer, A.N. Hokenstad, T.M. Stickrod, M.R. Walther-Antonio, J.P. Earl, J.C. Mell, J.E. Krol, S.V. Balashov, A.S. Bhat, G.D. Ehrlich, A. Valm, C. Deming, S. Conlan, J. Oh, J.A. Segre, C.C. Harris // *Genome biology*. - 2018. - Vol. 19, N 1. - P. 123.
205. Lin, F.C. The association between human papillomavirus infection and female lung cancer: A population-based cohort study / F.C. Lin, J.Y. Huang, S.C. Tsai, O.N. Nfor, M.C. Chou, M.F. Wu, C.T. Lee, C.F. Jan, Y.P. Liaw // *Medicine*. - 2016. - Vol. 95, N 23. - P. e3856.
206. Jiang, L.X. Simultaneous Detection of 13 Key Bacterial Respiratory Pathogens by Combination of Multiplex PCR and Capillary Electrophoresis / L.X. Jiang, H.Y. Ren, H.J. Zhou, S.H. Zhao, B.Y. Hou, J.P. Yan, T. Qin, Y. Chen // *Biomed Environ Sci*. - 2017. - Vol. 30, N 8. - P. 549-61.



207. Huang, J. Q. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer / J.Q. Huang, G.F. Zheng, K. Sumanac, E.J. Irvine, R.H. Hunt // *Gastroenterology*. - 2003. - Vol. 125, N 6. - P. 1636-44.
208. Wang, C. Pathogenic Microorganisms and Pancreatic Cancer / C. Wang, J. Li // *Gastrointest Tumors*. - 2015. - Vol. 2, N 1. - P. 41-7.
209. Fan, X. Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: a population-based nested case-control study / X. Fan, A.V. Alekseyenko, J. Wu, B.A. Peters, E.J. Jacobs, S.M. Gapstur, M.P. Purdue, C.C. Abnet, R. Stolzenberg-Solomon, G. Miller, J. Ravel, R.B. Hayes, J. Ahn // *Gut*. - 2018. - Vol. 67, N 1. - P. 120-7.
210. Russo, E. The interplay between the microbiome and the adaptive immune response in cancer development / E. Russo, A. Taddei, M.N. Ringressi, F. Ricci, A. Amedei // *Therap Adv Gastroenterol*. - 2016. - Vol. 9, N 4. - P. 594-605.
211. Sears, C.L. The who, where and how of fusobacteria and colon cancer / C.L. Sears // *Elife*. - 2018. - Vol. 7, N. - P.
212. Cameron, S.J.S. A pilot study using metagenomic sequencing of the sputum microbiome suggests potential bacterial biomarkers for lung cancer / S.J.S. Cameron, K.E. Lewis, S.A. Huws, M.J. Hegarty, P.D. Lewis, J.A. Pachebat, L.A.J. Mur // *PloS one*. - 2017. - Vol. 12, N 5. - P. e0177062.
213. Zhang, L. Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer / L. Zhang, H. Xiao, H. Zhou, S. Santiago, J.M. Lee, E.B. Garon, J. Yang, O. Brinkmann, X. Yan, D. Akin, D. Chia, D. Elashoff, N.H. Park, D.T.W. Wong // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. - 2012. - Vol. 69, N 19. - P. 3341-50.
214. Balkwill, F. Inflammation and cancer: back to Virchow? / F. Balkwill, A. Mantovani // *Lancet*. - 2001. - Vol. 357, N 9255. - P. 539-45.
215. Wong, J.L. Bacterial Pneumonia in Patients with Cancer: Novel Risk Factors and Management / J.L. Wong, S.E. Evans // *Clin Chest Med*. - 2017. - Vol. 38, N 2. - P. 263-77.
216. Liu, H.X. Difference of lower airway microbiome in bilateral protected specimen brush between lung cancer patients with unilateral lobar masses and control subjects / H.X. Liu, L.L. Tao, J. Zhang, Y.G. Zhu, Y. Zheng, D. Liu, M. Zhou, H. Ke, M.M. Shi, J.M. Qu // *International journal of cancer Journal international du cancer*. - 2018. - Vol. 142, N 4. - P. 769-78.
217. Morgan, X.C. Chapter 12: Human microbiome analysis / X.C. Morgan, C. Huttenhower // *PLoS computational biology*. - 2012. - Vol. 8, N 12. - P. e1002808.
218. Yan, X. Discovery and validation of potential bacterial biomarkers for lung cancer / X. Yan, M. Yang, J. Liu, R. Gao, J. Hu, J. Li, L. Zhang, Y. Shi, H. Guo, J. Cheng, M. Razi, S. Pang, X. Yu, S. Hu // *American journal of cancer research*. - 2015. - Vol. 5, N 10. - P. 3111-22.

219. Liu, Y. Lung tissue microbial profile in lung cancer is distinct from emphysema / Y. Liu, J.L. O'Brien, N.J. Ajami, M.E. Scheurer, E.S. Amirian, G. Armstrong, S. Tsavachidis, A.P. Thrift, L. Jiao, M.C. Wong, D.P. Smith, M.R. Spitz, M.L. Bondy, J.F. Petrosino, F. Kheradmand // *American journal of cancer research*. - 2018. - Vol. 8, N 9. - P. 1775-87.
220. Kaderbhai, C. Antibiotic Use Does Not Appear to Influence Response to Nivolumab / C. Kaderbhai, C. Richard, J.D. Fumet, A. Aarnink, P. Foucher, B. Coudert, L. Favier, A. Lagrange, E. Limagne, R. Boidot, F. Ghiringhelli // *Anticancer research*. - 2017. - Vol. 37, N 6. - P. 3195-200.
221. Routy, B. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors / B. Routy, E. Le Chatelier, L. Derosa, C.P.M. Duong, M.T. Alou, R. Daillere, A. Fluckiger, M. Messaoudene, C. Rauber, M.P. Roberti, M. Fidelle, C. Flament, V. Poirier-Colame, P. Opolon, C. Klein, K. Iribarren, L. Mondragon, N. Jacquelot, B. Qu, G. Ferrere, C. Clemenson, L. Mezquita, J.R. Masip, C. Naltet, S. Brosseau, C. Kaderbhai, C. Richard, H. Rizvi, F. Levenez, N. Galleron, B. Quinquis, N. Pons, B. Ryffel, V. Minard-Colin, P. Gonin, J.C. Soria, E. Deutsch, Y. Loriot, F. Ghiringhelli, G. Zalcman, F. Goldwasser, B. Escudier, M.D. Hellmann, A. Eggermont, D. Raoult, L. Albiges, G. Kroemer, L. Zitvogel // *Science*. - 2018. - Vol. 359, N 6371. - P. 91-7.
222. Gui, Q.F. Well-balanced commensal microbiota contributes to anti-cancer response in a lung cancer mouse model / Q.F. Gui, H.F. Lu, C.X. Zhang, Z.R. Xu, Y.H. Yang // *Genet Mol Res*. - 2015. - Vol. 14, N 2. - P. 5642-51.
223. Koch, R. The first conference to discuss the question of cholera on July 26, 1884 in Berlin / R. Koch // . - 1884. - Vol., N. - P. 1e41.
224. Lederberg, J. Infectious history / J. Lederberg // *Science*. - 2000. - Vol. 288, N 5464. - P. 287-93.
225. Pei, Z. Bacterial biota in the human distal esophagus / Z. Pei, E.J. Bini, L. Yang, M. Zhou, F. Francois, M.J. Blaser // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2004. - Vol. 101, N 12. - P. 4250-5.
226. Benitez, A.J. Inflammation-associated microbiota in pediatric eosinophilic esophagitis / A.J. Benitez, C. Hoffmann, A.B. Muir, K.K. Dods, J.M. Spergel, F.D. Bushman, M.L. Wang // *Microbiome*. - 2015. - Vol. 3, N. - P. 23.
227. Fillon, S.A. Novel device to sample the esophageal microbiome--the esophageal string test / S.A. Fillon, J.K. Harris, B.D. Wagner, C.J. Kelly, M.J. Stevens, W. Moore, R. Fang, S. Schroeder, J.C. Masterson, C.E. Robertson, N.R. Pace, S.J. Ackerman, G.T. Furuta // *PloS one*. - 2012. - Vol. 7, N 9. - P. e42938.
228. Harris, J.K. Esophageal microbiome in eosinophilic esophagitis / J.K. Harris, R. Fang, B.D. Wagner, H.N. Choe, C.J. Kelly, S. Schroeder, W. Moore, M.J. Stevens, A. Yeckes, K. Amsden, A.F. Kagalwalla, A. Zalewski, I. Hirano, N. Gonsalves, L.N. Henry, J.C. Masterson, C.E. Robertson,

D.Y. Leung, N.R. Pace, S.J. Ackerman, G.T. Furuta, S.A. Fillon // *PloS one*. - 2015. - Vol. 10, N 5. - P. e0128346.

229. Snider, E.J. Alterations to the Esophageal Microbiome Associated with Progression from Barrett's Esophagus to Esophageal Adenocarcinoma / E.J. Snider, G. Compres, D.E. Freedberg, H. Khiabani, Y.R. Nobel, S. Stump, A.C. Uhlemann, C.J. Lightdale, J.A. Abrams // *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. - 2019. - Vol. 28, N 10. - P. 1687-93.

230. Elliott, D.R.F. A non-endoscopic device to sample the oesophageal microbiota: a case-control study / D.R.F. Elliott, A.W. Walker, M. O'Donovan, J. Parkhill, R.C. Fitzgerald // *Lancet Gastroenterol Hepatol*. - 2017. - Vol. 2, N 1. - P. 32-42.

231. Li, D. Characterization of the Esophageal Microbiota and Prediction of the Metabolic Pathways Involved in Esophageal Cancer / D. Li, R. He, G. Hou, W. Ming, T. Fan, L. Chen, L. Zhang, W. Jiang, W. Wang, Z. Lu, H. Feng, Q. Geng // *Front Cell Infect Microbiol*. - 2020. - Vol. 10, N. - P. 268.

232. Lin, E.W. The tumor microenvironment in esophageal cancer / E.W. Lin, T.A. Karakasheva, P.D. Hicks, A.J. Bass, A.K. Rustgi // *Oncogene*. - 2016. - Vol. 35, N 41. - P. 5337-49.

233. Mantovani, A. Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines / A. Mantovani // *Lab Invest*. - 1994. - Vol. 71, N 1. - P. 5-16.

234. Mantovani, A. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions / A. Mantovani, M. Locati // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. - 2013. - Vol. 33, N 7. - P. 1478-83.

235. Lingen, M.W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing / M.W. Lingen // *ArchPatholLab Med*. - 2001. - Vol. 125, N 1. - P. 67-71.

236. Nathan, C. Points of control in inflammation / C. Nathan // *Nature*. - 2002. - Vol. 420, N 6917. - P. 846-52.

237. Bingle, L. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies / L. Bingle, N.J. Brown, C.E. Lewis // *JPathol*. - 2002. - Vol. 196, N 3. - P. 254-65.

238. Elgert, K.D. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection / K.D. Elgert, D.G. Alleva, D.W. Mullins // *J LeukocBiol*. - 1998. - Vol. 64, N 3. - P. 275-90.

239. Ohm, J.E. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency / J.E. Ohm, D.P. Carbone // *ImmunolRes*. - 2001. - Vol. 23, N 2-3. - P. 263-72.

240. Gorelik, L. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells / L. Gorelik, R.A. Flavell // *NatMed.* - 2001. - Vol. 7, N 10. - P. 1118-22.
241. Chong, H. Immunocytochemical localization of latent transforming growth factor-beta1 activation by stimulated macrophages / H. Chong, Y. Vodovotz, G.W. Cox, M.H. Barcellos-Hoff // *JCell Physiol.* - 1999. - Vol. 178, N 3. - P. 275-83.
242. Nurgazieva, D. TGF-beta1, but not bone morphogenetic proteins, activates Smad1/5 pathway in primary human macrophages and induces expression of proatherogenic genes / D. Nurgazieva, A. Mickley, K. Moganti, W. Ming, I. Ovsyi, A. Popova, Sachindra, K. Awad, N. Wang, K. Bieback, S. Goerdts, J. Kzhyshkowska, A. Gratchev // *Journal of immunology.* - 2015. - Vol. 194, N 2. - P. 709-18.
243. Riabov, V. Anti-tumor effect of the alphavirus-based virus-like particle vector expressing prostate-specific antigen in a HLA-DR transgenic mouse model of prostate cancer / V. Riabov, I. Tretyakova, R.B. Alexander, P. Pushko, E.N. Klyushnenkova // *Vaccine.* - 2015. - Vol. 33, N 41. - P. 5386-95.
244. Weiskopf, K. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer / K. Weiskopf, I.L. Weissman // *MAbs.* - 2015. - Vol. 7, N 2. - P. 303-10.
245. Zhang, J. Regulation of epithelial-mesenchymal transition by tumor-associated macrophages in cancer / J. Zhang, H. Yao, G. Song, X. Liao, Y. Xian, W. Li // *American journal of translational research.* - 2015. - Vol. 7, N 10. - P. 1699-711.
246. Wherry, E.J. T cell exhaustion / E.J. Wherry // *Nature immunology.* - 2011. - Vol. 12, N 6. - P. 492-9.
247. Filipazzi, P. Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients / P. Filipazzi, V. Huber, L. Rivoltini // *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* - 2012. - Vol. 61, N 2. - P. 255-63.
248. Wang, R. Metabolic reprogramming and metabolic dependency in T cells / R. Wang, D.R. Green // *Immunological reviews.* - 2012. - Vol. 249, N 1. - P. 14-26.
249. Smith, C. IDO is a nodal pathogenic driver of lung cancer and metastasis development / C. Smith, M.Y. Chang, K.H. Parker, D.W. Beury, J.B. DuHadaway, H.E. Flick, J. Boulden, E. Sutanto-Ward, A.P. Soler, L.D. Laury-Kleintop, L. Mandik-Nayak, R. Metz, S. Ostrand-Rosenberg, G.C. Prendergast, A.J. Muller // *Cancer discovery.* - 2012. - Vol. 2, N 8. - P. 722-35.
250. Munn, D.H. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance / D.H. Munn, A.L. Mellor // *Trends Immunol.* - 2016. - Vol. 37, N 3. - P. 193-207.
251. Fox, J.G. Inflammation, atrophy, and gastric cancer / J.G. Fox, T.C. Wang // *The Journal of clinical investigation.* - 2007. - Vol. 117, N 1. - P. 60-9.

252. Ye, W. Helicobacter pylori infection and gastric atrophy: risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia / W. Ye, M. Held, J. Lagergren, L. Engstrand, W.J. Blot, J.K. McLaughlin, O. Nyren // Journal of the National Cancer Institute. - 2004. - Vol. 96, N 5. - P. 388-96.

253. Yu, T. Fusobacterium nucleatum Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy / T. Yu, F. Guo, Y. Yu, T. Sun, D. Ma, J. Han, Y. Qian, I. Kryczek, D. Sun, N. Nagarsheth, Y. Chen, H. Chen, J. Hong, W. Zou, J.Y. Fang // Cell. - 2017. - Vol. 170, N 3. - P. 548-63 e16.

254. Gocyk, W. Helicobacter pylori, gastrin and cyclooxygenase-2 in lung cancer / W. Gocyk, T. Niklinski, H. Olechnowicz, A. Duda, W. Bielanski, P.C. Konturek, S.J. Konturek // Med Sci Monit. - 2000. - Vol. 6, N 6. - P. 1085-92.

255. Kanbay, M. Helicobacter pylori infection as a possible risk factor for respiratory system disease: a review of the literature / M. Kanbay, A. Kanbay, S. Boyacioglu // Respiratory medicine. - 2007. - Vol. 101, N 2. - P. 203-9.

256. Cheng, M. Microbiota modulate tumoral immune surveillance in lung through a gammadeltaT17 immune cell-dependent mechanism / M. Cheng, L. Qian, G. Shen, G. Bian, T. Xu, W. Xu, G. Shen, S. Hu // Cancer Res. - 2014. - Vol. 74, N 15. - P. 4030-41.

257. Jungnickel, C. IL-17C mediates the recruitment of tumor-associated neutrophils and lung tumor growth / C. Jungnickel, L.H. Schmidt, L. Bittigkoffer, L. Wolf, A. Wolf, F. Ritzmann, A. Kamyschnikow, C. Herr, M.D. Menger, T. Spieker, R. Wiewrodt, R. Bals, C. Beisswenger // Oncogene. - 2017. - Vol. 36, N 29. - P. 4182-90.

258. Travaglione, S. The Rho-activating CNF1 toxin from pathogenic E. coli: a risk factor for human cancer development? / S. Travaglione, A. Fabbri, C. Fiorentini // Infect Agent Cancer. - 2008. - Vol. 3, N. - P. 4.

259. Nestic, D. Assembly and function of a bacterial genotoxin / D. Nestic, Y. Hsu, C.E. Stebbins // Nature. - 2004. - Vol. 429, N 6990. - P. 429-33.

260. Yaghoobi, H. Apoptotic Effects of the B Subunit of Bacterial Cytolethal Distending Toxin on the A549 Lung Cancer Cell Line / H. Yaghoobi, M. Bandehpour, B. Kazemi // Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. - 2016. - Vol. 17, N S3. - P. 299-304.

261. Apopa, P.L. PARP1 Is Up-Regulated in Non-small Cell Lung Cancer Tissues in the Presence of the Cyanobacterial Toxin Microcystin / P.L. Apopa, L. Alley, R.B. Penney, K. Arnaoutakis, M.A. Steliga, S. Jeffus, E. Bircan, B. Gopalan, J. Jin, P. Patumcharoenpol, P. Jenjaroenpun, T. Wongsurawat, N. Shah, G. Boysen, D. Ussery, I. Nookaew, P. Fagan, G. Bebek, M.S. Orloff // Front Microbiol. - 2018. - Vol. 9, N. - P. 1757.

262. Chow, S.C. Gram negative bacteria increase non-small cell lung cancer metastasis via Toll-like receptor 4 activation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation / S.C. Chow, S.D. Gowing, J.J. Cools-Lartigue, C.B. Chen, J. Berube, H.W. Yoon, C.H. Chan, M.C. Rousseau, F. Bourdeau, B. Giannias, L. Roussel, S.T. Qureshi, S. Rousseau, L.E. Ferri // *International journal of cancer Journal international du cancer*. - 2015. - Vol. 136, N 6. - P. 1341-50.
263. Lee, E.Y. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* / E.Y. Lee, J.Y. Bang, G.W. Park, D.S. Choi, J.S. Kang, H.J. Kim, K.S. Park, J.O. Lee, Y.K. Kim, K.H. Kwon, K.P. Kim, Y.S. Gho // *Proteomics*. - 2007. - Vol. 7, N 17. - P. 3143-53.
264. Kim, J.H. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles / J.H. Kim, J. Lee, J. Park, Y.S. Gho // *Semin Cell Dev Biol*. - 2015. - Vol. 40, N. - P. 97-104.
265. Choi, Y. Extracellular Vesicles, a Key Mediator to Link Environmental Microbiota to Airway Immunity / Y. Choi, H. Park, H.S. Park, Y.K. Kim // *Allergy Asthma Immunol Res*. - 2017. - Vol. 9, N 2. - P. 101-6.
266. Brune, B. Redox control of inflammation in macrophages / B. Brune, N. Dehne, N. Grossmann, M. Jung, D. Namgaladze, T. Schmid, A. von Knethen, A. Weigert // *Antioxid Redox Signal*. - 2013. - Vol. 19, N 6. - P. 595-637.
267. Hibbs, J.B. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite / J.B. Hibbs, Jr., R.R. Taintor, Z. Vavrin // *Science*. - 1987. - Vol. 235, N 4787. - P. 473-6.
268. Lambeth, J.D. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression / J.D. Lambeth, T. Kawahara, B. Diebold // *Free Radic Biol Med*. - 2007. - Vol. 43, N 3. - P. 319-31.
269. Leto, T.L. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases / T.L. Leto, S. Morand, D. Hurt, T. Ueyama // *Antioxid Redox Signal*. - 2009. - Vol. 11, N 10. - P. 2607-19.
270. Li, B. NOX4 expression in human microglia leads to constitutive generation of reactive oxygen species and to constitutive IL-6 expression / B. Li, K. Bedard, S. Sorce, B. Hinz, M. Dubois-Dauphin, K.H. Krause // *J Innate Immun*. - 2009. - Vol. 1, N 6. - P. 570-81.
271. Josephs, D.H. An immunologically relevant rodent model demonstrates safety of therapy using a tumour-specific IgE / D.H. Josephs, M. Nakamura, H.J. Bax, T.S. Dodev, G. Muirhead, L. Saul, P. Karagiannis, K.M. Ilieva, S. Crescioli, P. Gazinska, N. Woodman, C. Lombardelli, S. Kareemaghay, C. Selkirk, H. Lentfer, C. Barton, S. Canevari, M. Figini, N. Downes, D. Dombrowicz, C.J. Corrigan, F.O. Nestle, P.S. Jones, H.J. Gould, P.J. Blower, S. Tsoka, J.F. Spicer, S.N. Karagiannis // *Allergy*. - 2018. - Vol. 73, N 12. - P. 2328-41.
272. Gao, J. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces the expression of proinflammatory cytokines in macrophages and re-educates tumor-associated macrophages to an

antitumor phenotype / J. Gao, D. Wang, D. Liu, M. Liu, Y. Ge, M. Jiang, Y. Liu, D. Zheng // *Molecular biology of the cell*. - 2015. - Vol. 26, N 18. - P. 3178-89.

273. Taganov, K.D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses / K.D. Taganov, M.P. Boldin, K.J. Chang, D. Baltimore // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2006. - Vol. 103, N 33. - P. 12481-6.

274. Wang, D. TRAIL-induced miR-146a expression suppresses CXCR4-mediated human breast cancer migration / D. Wang, D. Liu, J. Gao, M. Liu, S. Liu, M. Jiang, Y. Liu, D. Zheng // *FEBS J*. - 2013. - Vol. 280, N 14. - P. 3340-53.

275. Zhou, Z. Macrophages help NK cells to attack tumor cells by stimulatory NKG2D ligand but protect themselves from NK killing by inhibitory ligand Qa-1 / Z. Zhou, C. Zhang, J. Zhang, Z. Tian // *PloS one*. - 2012. - Vol. 7, N 5. - P. e36928.

276. 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, N 4. - P. 414-20.

277. Canli, O. Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Induce Epithelial Mutagenesis / O. Canli, A.M. Nicolas, J. Gupta, F. Finkelmeier, O. Goncharova, M. Pesic, T. Neumann, D. Horst, M. Lower, U. Sahin, F.R. Greten // *Cancer Cell*. - 2017. - Vol. 32, N 6. - P. 869-83 e5.

278. Landsberg, J. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation / J. Landsberg, J. Kohlmeyer, M. Renn, T. Bald, M. Rogava, M. Cron, M. Fatho, V. Lennerz, T. Wolfel, M. Holzel, T. Tuting // *Nature*. - 2012. - Vol. 490, N 7420. - P. 412-6.

279. 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, N. - P.

280. Ifrim, D.C. Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors / D.C. Ifrim, J. Quintin, L.A. Joosten, C. Jacobs, T. Jansen, L. Jacobs, N.A. Gow, D.L. Williams, J.W. van der Meer, M.G. Netea // *Clinical and vaccine immunology : CVI*. - 2014. - Vol. 21, N 4. - P. 534-45.

281. Dobrovolskaia, M.A. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components / M.A. Dobrovolskaia, A.E. Medvedev, K.E. Thomas, N. Cuesta, V. Toshchakov, T. Ren, M.J. Cody, S.M. Michalek, N.R. Rice, S.N. Vogel // *Journal of immunology*. - 2003. - Vol. 170, N 1. - P. 508-19.

282. Dobrovolskaia, M.A. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS / M.A. Dobrovolskaia, S.N. Vogel // *Microbes Infect*. - 2002. - Vol. 4, N 9. - P. 903-14.

283. Medvedev, A.E. Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease / A.E. Medvedev, I. Sabroe, J.D. Hasday, S.N. Vogel // *J Endotoxin Res.* - 2006. - Vol. 12, N 3. - P. 133-50.
284. Biswas, S.K. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance / S.K. Biswas, E. Lopez-Collazo // *Trends Immunol.* - 2009. - Vol. 30, N 10. - P. 475-87.
285. Sly, L.M. LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance / L.M. Sly, M.J. Rauh, J. Kalesnikoff, C.H. Song, G. Krystal // *Immunity.* - 2004. - Vol. 21, N 2. - P. 227-39.
286. Piao, W. Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling / W. Piao, C. Song, H. Chen, M.A. Diaz, L.M. Wahl, K.A. Fitzgerald, L. Li, A.E. Medvedev // *Journal of leukocyte biology.* - 2009. - Vol. 86, N 4. - P. 863-75.
287. Kobayashi, K. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling / K. Kobayashi, L.D. Hernandez, J.E. Galan, C.A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, R.A. Flavell // *Cell.* - 2002. - Vol. 110, N 2. - P. 191-202.
288. Nimah, M. Contribution of MKP-1 regulation of p38 to endotoxin tolerance / M. Nimah, B. Zhao, A.G. Denenberg, O. Bueno, J. Molkenin, H.R. Wong, T.P. Shanley // *Shock.* - 2005. - Vol. 23, N 1. - P. 80-7.
289. Foster, S.L. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications / S.L. Foster, D.C. Hargreaves, R. Medzhitov // *Nature.* - 2007. - Vol. 447, N 7147. - P. 972-8.
290. Zwergal, A. C/EBP beta blocks p65 phosphorylation and thereby NF-kappa B-mediated transcription in TNF-tolerant cells / A. Zwergal, M. Quirling, B. Saugel, K.C. Huth, C. Sydlik, V. Poli, D. Neumeier, H.W. Ziegler-Heitbrock, K. Brand // *Journal of immunology.* - 2006. - Vol. 177, N 1. - P. 665-72.
291. Park, S.H. Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages / S.H. Park, K.H. Park-Min, J. Chen, X. Hu, L.B. Ivashkiv // *Nature immunology.* - 2011. - Vol. 12, N 7. - P. 607-15.
292. Chen, J. IFN-gamma abrogates endotoxin tolerance by facilitating Toll-like receptor-induced chromatin remodeling / J. Chen, L.B. Ivashkiv // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* - 2010. - Vol. 107, N 45. - P. 19438-43.
293. Shi, L. Endotoxin tolerance in monocytes can be mitigated by alpha2-interferon / L. Shi, L. Song, K. Maurer, J. Sharp, Z. Zhang, K.E. Sullivan // *Journal of leukocyte biology.* - 2015. - Vol. 98, N 4. - P. 651-9.



294. Shoji, S. The current status of tailor-made medicine with molecular biomarkers for patients with clear cell renal cell carcinoma / S. Shoji, M. Nakano, H. Sato, X.Y. Tang, Y.R. Osamura, T. Terachi, T. Uchida, K. Takeya // *Clin Exp Metastasis*. - 2014. - Vol. 31, N 1. - P. 111-34.

295. Dizon, D.S. *Clinical Cancer Advances 2016: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology* / D.S. Dizon, L. Krilov, E. Cohen, T. Gangadhar, P.A. Ganz, T.A. Hensing, S. Hunger, S.S. Krishnamurthi, A.B. Lassman, M.J. Markham, E. Mayer, M. Neuss, S.K. Pal, L.C. Richardson, R. Schilsky, G.K. Schwartz, D.R. Spriggs, M.A. Villalona-Calero, G. Villani, G. Masters // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. - 2016. - Vol. 34, N 9. - P. 987-1011.

296. Barata, P.C. Treatment of renal cell carcinoma: Current status and future directions / P.C. Barata, B.I. Rini // *CA: a cancer journal for clinicians*. - 2017. - Vol. 67, N 6. - P. 507-24.

297. Liu, K.G. Immunotherapy: incorporation in the evolving paradigm of renal cancer management and future prospects / K.G. Liu, S. Gupta, S. Goel // *Oncotarget*. - 2017. - Vol. 8, N 10. - P. 17313-27.

298. Le, D.T. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency / D.T. Le, J.N. Uram, H. Wang, B.R. Bartlett, H. Kemberling, A.D. Eyring, A.D. Skora, B.S. Luber, N.S. Azad, D. Laheru, B. Biedrzycki, R.C. Donehower, A. Zaheer, G.A. Fisher, T.S. Crocenzi, J.J. Lee, S.M. Duffy, R.M. Goldberg, A. de la Chapelle, M. Koshiji, F. Bhajee, T. Huebner, R.H. Hruban, L.D. Wood, N. Cuka, D.M. Pardoll, N. Papadopoulos, K.W. Kinzler, S. Zhou, T.C. Cornish, J.M. Taube, R.A. Anders, J.R. Eshleman, B. Vogelstein, L.A. Diaz, Jr. // *The New England journal of medicine*. - 2015. - Vol. 372, N 26. - P. 2509-20.

299. Iida, N. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment / N. Iida, A. Dzutsev, C.A. Stewart, L. Smith, N. Bouladoux, R.A. Weingarten, D.A. Molina, R. Salcedo, T. Back, S. Cramer, R.M. Dai, H. Kiu, M. Cardone, S. Naik, A.K. Patri, E. Wang, F.M. Marincola, K.M. Frank, Y. Belkaid, G. Trinchieri, R.S. Goldszmid // *Science*. - 2013. - Vol. 342, N 6161. - P. 967-70.

300. Geller, L.T. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine / L.T. Geller, M. Barzily-Rokni, T. Danino, O.H. Jonas, N. Shental, D. Nejman, N. Gavert, Y. Zwang, Z.A. Cooper, K. Shee, C.A. Thaiss, A. Reuben, J. Livny, R. Avraham, D.T. Frederick, M. Ligorio, K. Chatman, S.E. Johnston, C.M. Mosher, A. Brandis, G. Fuks, C. Gurbatri, V. Gopalakrishnan, M. Kim, M.W. Hurd, M. Katz, J. Fleming, A. Maitra, D.A. Smith, M. Skalak, J. Bu, M. Michaud, S.A. Trauger, I. Barshack, T. Golan, J. Sandbank, K.T. Flaherty, A. Mandinova, W.S. Garrett, S.P. Thayer, C.R. Ferrone, C. Huttenhower, S.N. Bhatia, D. Gevers, J.A. Wargo, T.R. Golub, R. Straussman // *Science*. - 2017. - Vol. 357, N 6356. - P. 1156-60.

301. Conway Morris, A. 16S pan-bacterial PCR can accurately identify patients with ventilator-associated pneumonia / A. Conway Morris, N. Gadsby, J.P. McKenna, T.P. Hellyer, P. Dark, S. Singh, T.S. Walsh, D.F. McAuley, K. Templeton, A.J. Simpson, R. McMullan // *Thorax*. - 2017. - Vol. 72, N 11. - P. 1046-8.
302. Gosiewski, T. A novel, nested, multiplex, real-time PCR for detection of bacteria and fungi in blood / T. Gosiewski, D. Jurkiewicz-Badacz, A. Sroka, M. Brzychczy-Wloch, M. Bulanda // *BMC Microbiol*. - 2014. - Vol. 14, N. - P. 144.
303. Gelderblom, H. Brostallicin versus doxorubicin as first-line chemotherapy in patients with advanced or metastatic soft tissue sarcoma: an European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group randomised phase II and pharmacogenetic study / H. Gelderblom, J.Y. Blay, B.M. Seddon, M. Leahy, I. Ray-Coquard, S. Sleijfer, J.M. Kerst, P. Rutkowski, S. Bauer, M. Ouali, S. Marreaud, R.J. van der Straaten, H.J. Guchelaar, S.D. Weitman, P.C. Hogendoorn, P. Hohenberger // *Eur J Cancer*. - 2014. - Vol. 50, N 2. - P. 388-96.
304. Klindworth, A. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies / A. Klindworth, E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn, F.O. Glockner // *Nucleic acids research*. - 2013. - Vol. 41, N 1. - P. e1.
305. Zhang, J. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR / J. Zhang, K. Kobert, T. Flouri, A. Stamatakis // *Bioinformatics*. - 2014. - Vol. 30, N 5. - P. 614-20.
306. Bolger, A.M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics*. - 2014. - Vol. 30, N 15. - P. 2114-20.
307. Edgar, R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads / R.C. Edgar // *Nat Methods*. - 2013. - Vol. 10, N 10. - P. 996-8.
308. Edgar, E.C. UCHIME2: improved chimera prediction for amplicon sequencing / R.C. Edgar // - 2016. - Vol., N. - P.
309. Wang, Q. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy / Q. Wang, G.M. Garrity, J.M. Tiedje, J.R. Cole // *Applied and environmental microbiology*. - 2007. - Vol. 73, N 16. - P. 5261-7.
310. Dhariwal, A. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data / A. Dhariwal, J. Chong, S. Habib, I.L. King, L.B. Agellon, J. Xia // *Nucleic acids research*. - 2017. - Vol. 45, N W1. - P. W180-W8.
311. Kopylova, E. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data / E. Kopylova, L. Noe, H. Touzet // *Bioinformatics*. - 2012. - Vol. 28, N 24. - P. 3211-7.

312. Kim, D. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements / D. Kim, B. Langmead, S.L. Salzberg // *Nat Methods*. - 2015. - Vol. 12, N 4. - P. 357-60.
313. 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, S. Genome Project Data Processing // *Bioinformatics*. - 2009. - Vol. 25, N 16. - P. 2078-9.
314. Liao, Y. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads / Y. Liao, G.K. Smyth, W. Shi // *Nucleic acids research*. - 2019. - Vol. 47, N 8. - P. e47.
315. 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, N 12. - P. 550.
316. Maniecki, M.B. Tumor-promoting macrophages induce the expression of the macrophage-specific receptor CD163 in malignant cells / M.B. Maniecki, A. Etzerodt, B.P. Ulhoi, T. Steiniche, M. Borre, L. Dyrskjot, T.F. Orntoft, S.K. Moestrup, H.J. Moller // *International journal of cancer Journal international du cancer*. - 2012. - Vol. 131, N 10. - P. 2320-31.
317. 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. Samoilova, A. Petrenko, I. Zborovskaya, V. Mochalnikova, V. Kataev, Y. Khlopko, A. Plotnikov, A. Gratchev // *Biomedicines*. - 2020. - Vol. 8, N 9. - P.
318. Egeblad, M. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression / M. Egeblad, Z. Werb // *Nature reviews Cancer*. - 2002. - Vol. 2, N 3. - P. 161-74.
319. Krishna, M. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple / M. Krishna, H. Narang // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. - 2008. - Vol. 65, N 22. - P. 3525-44.
320. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. - 2000. - Vol. 100, N 1. - P. 57-70.
321. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions / D. Hanahan // *Cancer discovery*. - 2022. - Vol. 12, N 1. - P. 31-46.
322. Tian, C. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8(+) or CD3(+) T lymphocytes and interleukin-2 expression in radically resected non-small cell lung cancer / C. Tian, S. Lu, Q. Fan, W. Zhang, S. Jiao, X. Zhao, Z. Wu, L. Sun, L. Wang // *Chin Med J (Engl)*. - 2015. - Vol. 128, N 1. - P. 105-10.
323. Lu, C.F. Infiltrating macrophage count: a significant predictor for the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan / C.F. Lu, C.S. Huang, J.W. Tjiu, C.P. Chiang // *Head & neck*. - 2010. - Vol. 32, N 1. - P. 18-25.

324. Helm, O. Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis / O. Helm, J. Held-Feindt, E. Grage-Griebenow, N. Reiling, H. Ungefroren, I. Vogel, U. Kruger, T. Becker, M. Ebsen, C. Rocken, D. Kabelitz, H. Schafer, S. Sebens // *International journal of cancer Journal international du cancer*. - 2014. - Vol. 135, N 4. - P. 843-61.
325. Mak, K.S. PU.1 and Haematopoietic Cell Fate: Dosage Matters / K.S. Mak, A.P. Funnell, R.C. Pearson, M. Crossley // *Int J Cell Biol*. - 2011. - Vol. 2011, N. - P. 808524.
326. Scott, E.W. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages / E.W. Scott, M.C. Simon, J. Anastasi, H. Singh // *Science*. - 1994. - Vol. 265, N 5178. - P. 1573-7.
327. McKercher, S.R. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities / S.R. McKercher, B.E. Torbett, K.L. Anderson, G.W. Henkel, D.J. Vestal, H. Baribault, M. Klemsz, A.J. Feeney, G.E. Wu, C.J. Paige, R.A. Maki // *EMBO J*. - 1996. - Vol. 15, N 20. - P. 5647-58.
328. Iwasaki, H. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation / H. Iwasaki, C. Somoza, H. Shigematsu, E.A. Duprez, J. Iwasaki-Arai, S. Mizuno, Y. Arinobu, K. Geary, P. Zhang, T. Dayaram, M.L. Fenyus, S. Elf, S. Chan, P. Kastner, C.S. Huettner, R. Murray, D.G. Tenen, K. Akashi // *Blood*. - 2005. - Vol. 106, N 5. - P. 1590-600.
329. Verbiest, T. PU.1 downregulation in murine radiation-induced acute myeloid leukaemia (AML): from molecular mechanism to human AML / T. Verbiest, S. Bouffler, S.L. Nutt, C. Badie // *Carcinogenesis*. - 2015. - Vol. 36, N 4. - P. 413-9.
330. Torlakovic, E.E. Prognostic significance of PU.1 in follicular lymphoma / E.E. Torlakovic, N. Bilalovic, R. Golouh, A. Zidar, S. Angel // *The Journal of pathology*. - 2006. - Vol. 209, N 3. - P. 352-9.
331. Puderecki, M. Novel prognostic molecular markers in lung cancer / M. Puderecki, J. Szumilo, B. Marzec-Kotarska // *Oncol Lett*. - 2020. - Vol. 20, N 1. - P. 9-18.
332. Ohri, C.M. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival / C.M. Ohri, A. Shikotra, R.H. Green, D.A. Waller, P. Bradding // *The European respiratory journal*. - 2009. - Vol. 33, N 1. - P. 118-26.
333. Ma, J. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time / J. Ma, L. Liu, G. Che, N. Yu, F. Dai, Z. You // *BMC cancer*. - 2010. - Vol. 10, N. - P. 112.
334. Wang, X. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? / X. Wang, Y. Lin // *Acta pharmacologica Sinica*. - 2008. - Vol. 29, N 11. - P. 1275-88.

335. 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, N. - P. 584.
336. Wu, H. Indoleamine 2, 3-dioxygenase regulation of immune response (Review) / H. Wu, J. Gong, Y. Liu // *Molecular medicine reports*. - 2018. - Vol. 17, N 4. - P. 4867-73.
337. Astigiano, S. Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer / S. Astigiano, B. Morandi, R. Costa, L. Mastracci, A. D'Agostino, G.B. Ratto, G. Melioli, G. Frumento // *Neoplasia*. - 2005. - Vol. 7, N 4. - P. 390-6.
338. Zhang, M.L. Differential expression of PD-L1 and IDO1 in association with the immune microenvironment in resected lung adenocarcinomas / M.L. Zhang, M. Kem, M.J. Mooradian, J.P. Eliane, T.G. Huynh, A.J. Iafrate, J.F. Gainor, M. Mino-Kenudson // *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* - 2019. - Vol. 32, N 4. - P. 511-23.
339. Hu, J.M. CD163 as a marker of M2 macrophage, contribute to predicte aggressiveness and prognosis of Kazakh esophageal squamous cell carcinoma / J.M. Hu, K. Liu, J.H. Liu, X.L. Jiang, X.L. Wang, Y.Z. Chen, S.G. Li, H. Zou, L.J. Pang, C.X. Liu, X.B. Cui, L. Yang, J. Zhao, X.H. Shen, J.F. Jiang, W.H. Liang, X.L. Yuan, F. Li // *Oncotarget*. - 2017. - Vol. 8, N 13. - P. 21526-38.
340. Barani, R. Evaluation of iNOS Expression in Esophageal Cancer Patients / R. Barani, G. Motalleb, H. Maghsoudi // *Gastrointest Tumors*. - 2016. - Vol. 3, N 1. - P. 44-58.
341. Jin, Y. [Abnormal expression of p53, Ki67 and iNOS in human esophageal carcinoma in situ and pre-malignant lesions] / Y. Jin, W. Zhang, B. Liu // *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*. - 2001. - Vol. 23, N 2. - P. 129-31.
342. Schumacher, K. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas / K. Schumacher, W. Haensch, C. Roefzaad, P.M. Schlag // *Cancer Res*. - 2001. - Vol. 61, N 10. - P. 3932-6.
343. Cho, Y. CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma / Y. Cho, M. Miyamoto, K. Kato, A. Fukunaga, T. Shichinohe, Y. Kawarada, Y. Hida, T. Oshikiri, T. Kurokawa, M. Suzuoki, Y. Nakakubo, K. Hiraoka, S. Murakami, T. Shinohara, T. Itoh, S. Okushiba, S. Kondo, H. Katoh // *Cancer Res*. - 2003. - Vol. 63, N 7. - P. 1555-9.
344. Wang, G. FOXP3 expression in esophageal cancer cells is associated with poor prognosis in esophageal cancer / G. Wang, G. Liu, Y. Liu, X. Li, Z. Su // *Hepatogastroenterology*. - 2012. - Vol. 59, N 119. - P. 2186-91.
345. Herbst, R.S. Lung cancer / R.S. Herbst, J.V. Heymach, S.M. Lippman // *The New England journal of medicine*. - 2008. - Vol. 359, N 13. - P. 1367-80.

346. Pauly, J.L. Cigarette smoke, bacteria, mold, microbial toxins, and chronic lung inflammation / J.L. Pauly, G. Paszkiewicz // *J Oncol.* - 2011. - Vol. 2011, N. - P. 819129.
347. Gomes, S. Profiling of lung microbiota discloses differences in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma / S. Gomes, B. Cavadas, J.C. Ferreira, P.I. Marques, C. Monteiro, M. Sucena, C. Sousa, L. Vaz Rodrigues, G. Teixeira, P. Pinto, T. Tavares de Abreu, C. Barbara, J. Semedo, L. Mota, A.S. Carvalho, R. Matthiesen, L. Pereira, S. Seixas // *Scientific reports.* - 2019. - Vol. 9, N 1. - P. 12838.
348. Huang, D. The characterization of lung microbiome in lung cancer patients with different clinicopathology / D. Huang, X. Su, M. Yuan, S. Zhang, J. He, Q. Deng, W. Qiu, H. Dong, S. Cai // *American journal of cancer research.* - 2019. - Vol. 9, N 9. - P. 2047-63.
349. Invernizzi, R. Bacterial burden in the lower airways predicts disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis and is independent of radiological disease extent / R. Invernizzi, J. Barnett, B. Rawal, A. Nair, P. Ghai, S. Kingston, F. Chua, Z. Wu, A.U. Wells, E.R. Renzoni, A.G. Nicholson, A. Rice, C.M. Lloyd, A.J. Byrne, T.M. Maher, A. Devaraj, P.L. Molyneaux // *The European respiratory journal.* - 2020. - Vol. 55, N 4. - P.
350. Jin, C. Commensal Microbiota Promote Lung Cancer Development via gammadelta T Cells / C. Jin, G.K. Lagoudas, C. Zhao, S. Bullman, A. Bhutkar, B. Hu, S. Ameh, D. Sandel, X.S. Liang, S. Mazzilli, M.T. Whary, M. Meyerson, R. Germain, P.C. Blainey, J.G. Fox, T. Jacks // *Cell.* - 2019. - Vol. 176, N 5. - P. 998-1013 e16.
351. Oki, E. Trifluridine/tipiracil plus bevacizumab as a first-line treatment for elderly patients with metastatic colorectal cancer (KSCC1602): A multicenter phase II trial / E. Oki, A. Makiyama, Y. Miyamoto, M. Kotaka, H. Kawanaka, K. Miwa, A. Kabashima, T. Noguchi, K. Yuge, T. Kashiwada, K. Ando, M. Shimokawa, H. Saeki, Y. Akagi, H. Baba, Y. Maehara, M. Mori // *Cancer medicine.* - 2021. - Vol. 10, N 2. - P. 454-61.
352. Wei, M.Q. Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era / M.Q. Wei, A. Mengesha, D. Good, J. Anne // *Cancer letters.* - 2008. - Vol. 259, N 1. - P. 16-27.
353. Wang, Q. Oral Microbiome in Patients with Oesophageal Squamous Cell Carcinoma / Q. Wang, Y. Rao, X. Guo, N. Liu, S. Liu, P. Wen, S. Li, Y. Li // *Scientific reports.* - 2019. - Vol. 9, N 1. - P. 19055.
354. Nasrollahzadeh, D. Variations of gastric corpus microbiota are associated with early esophageal squamous cell carcinoma and squamous dysplasia / D. Nasrollahzadeh, R. Malekzadeh, A. Ploner, R. Shakeri, M. Sotoudeh, S. Fahimi, S. Nasseri-Moghaddam, F. Kamangar, C.C. Abnet, B. Winckler, F. Islami, P. Boffetta, P. Brennan, S.M. Dawsey, W. Ye // *Scientific reports.* - 2015. - Vol. 5, N. - P. 8820.

355. Gunathilake, M. Alterations in Gastric Microbial Communities Are Associated with Risk of Gastric Cancer in a Korean Population: A Case-Control Study / M. Gunathilake, J. Lee, I.J. Choi, Y.I. Kim, J. Yoon, W.J. Sul, J.F. Kim, J. Kim // *Cancers (Basel)*. - 2020. - Vol. 12, N 9. - P.
356. Buc, E. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer / E. Buc, D. Dubois, P. Sauvanet, J. Raisch, J. Delmas, A. Darfeuille-Michaud, D. Pezet, R. Bonnet // *PloS one*. - 2013. - Vol. 8, N 2. - P. e56964.
357. Dalmaso, G. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment / G. Dalmaso, A. Cougnoux, J. Delmas, A. Darfeuille-Michaud, R. Bonnet // *Gut Microbes*. - 2014. - Vol. 5, N 5. - P. 675-80.
358. Holland, T. Invasive gram-positive bacterial infection in cancer patients / T. Holland, V.G. Fowler, Jr., S.A. Shelburne, 3rd // *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. - 2014. - Vol. 59 Suppl 5, N. - P. S331-4.
359. Kovacs, T. The Microbiome as a Component of the Tumor Microenvironment / T. Kovacs, E. Miko, G. Ujlaki, Z. Sari, P. Bai // *Advances in experimental medicine and biology*. - 2020. - Vol. 1225, N. - P. 137-53.
360. Mantovani, A. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization / A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, M. Locati // *Trends Immunol*. - 2004. - Vol. 25, N 12. - P. 677-86.
361. Wang, J. Bacterial colonization dampens influenza-mediated acute lung injury via induction of M2 alveolar macrophages / J. Wang, F. Li, R. Sun, X. Gao, H. Wei, L.J. Li, Z. Tian // *Nature communications*. - 2013. - Vol. 4, N. - P. 2106.
362. Tedesco, S. Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? / S. Tedesco, F. De Majo, J. Kim, A. Trenti, L. Trevisi, G.P. Fadini, C. Bolego, P.W. Zandstra, A. Cignarella, L. Vitiello // *Front Pharmacol*. - 2018. - Vol. 9, N. - P. 71.
363. Playford, M.P. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology / M.P. Playford, M.D. Schaller // *Oncogene*. - 2004. - Vol. 23, N 48. - P. 7928-46.
364. Loesch, M. The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? / M. Loesch, G. Chen // *Front Biosci*. - 2008. - Vol. 13, N. - P. 3581-93.
365. Puri, P.L. Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells / P.L. Puri, Z. Wu, P. Zhang, L.D. Wood, K.S. Bhakta, J. Han, J.R. Feramisco, M. Karin, J.Y. Wang // *Genes Dev*. - 2000. - Vol. 14, N 5. - P. 574-84.
366. Haq, R. Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence / R. Haq, J.D. Brenton, M. Takahashi, D. Finan, A. Finkielstein, S. Damaraju, R. Rottapel, B. Zanke // *Cancer Res*. - 2002. - Vol. 62, N 17. - P. 5076-82.

367. Chen, S. A role for p38 mitogen-activated protein kinase and c-myc in endothelin-dependent rat aortic smooth muscle cell proliferation / S. Chen, Y. Qiong, D.G. Gardner // *Hypertension*. - 2006. - Vol. 47, N 2. - P. 252-8.
368. 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 // *Curr Med Chem*. - 2014. - Vol. 21, N 4. - P. 501-10.
369. 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, N 3. - P. 499-506.
370. Li, X. Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis / X. Li, Y. Liu, B. Wu, Z. Dong, Y. Wang, J. Lu, P. Shi, W. Bai, Z. Wang // *Oncology reports*. - 2014. - Vol. 32, N 6. - P. 2605-11.
371. Tsukamoto, S. Clinical significance of osteoprotegerin expression in human colorectal cancer / S. Tsukamoto, T. Ishikawa, S. Iida, M. Ishiguro, K. Mogushi, H. Mizushima, H. Uetake, H. Tanaka, K. Sugihara // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. - 2011. - Vol. 17, N 8. - P. 2444-50.
372. Ito, R. Expression of osteoprotegerin correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric carcinoma / R. Ito, H. Nakayama, K. Yoshida, K. Kuraoka, J. Motoshita, N. Oda, N. Oue, W. Yasui // *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. - 2003. - Vol. 443, N 2. - P. 146-51.
373. Russmueller, G. Upregulation of osteoprotegerin expression correlates with bone invasion and predicts poor clinical outcome in oral cancer / G. Russmueller, D. Moser, T. Wurger, F. Wrba, P. Christopoulos, G. Kostakis, R. Seemann, V. Stadler, G. Wimmer, G. Kornek, A. Psyrrri, M. Filipits, C. Perisanidis // *Oral Oncol*. - 2015. - Vol. 51, N 3. - P. 247-53.
374. 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, N 1. - P. 27.
375. Han, C. Exosome-mediated communication between tumor cells and tumor-associated macrophages: implications for tumor microenvironment / C. Han, C. Zhang, H. Wang, L. Zhao // *Oncoimmunology*. - 2021. - Vol. 10, N 1. - P. 1887552.
376. Li, X. Exosomes released from M2 macrophages transfer miR-221-3p contributed to EOC progression through targeting CDKN1B / X. Li, M. Tang // *Cancer medicine*. - 2020. - Vol. 9, N 16. - P. 5976-88.
377. Zhou, J. Exosomes Released from Tumor-Associated Macrophages Transfer miRNAs That Induce a Treg/Th17 Cell Imbalance in Epithelial Ovarian Cancer / J. Zhou, X. Li, X. Wu, T. Zhang,



Q. Zhu, X. Wang, H. Wang, K. Wang, Y. Lin, X. Wang // *Cancer Immunol Res.* - 2018. - Vol. 6, N 12. - P. 1578-92.

378. Chan, J.J. Noncoding RNA:RNA Regulatory Networks in Cancer / J.J. Chan, Y. Tay // *International journal of molecular sciences.* - 2018. - Vol. 19, N 5. - P.

379. Ren, X. Genome-wide analysis reveals the emerging roles of long non-coding RNAs in cancer / X. Ren // *Oncology letters.* - 2020. - Vol. 19, N 1. - P. 588-94.

380. Chen, L. Long noncoding RNA SOX2OT promotes the proliferation of pancreatic cancer by binding to FUS / L. Chen, J. Zhang, Q. Chen, W. Ge, L. Meng, X. Huang, P. Shen, H. Yuan, G. Shi, Y. Miao, K. Jiang // *International journal of cancer Journal international du cancer.* - 2020. - Vol. 147, N 1. - P. 175-88.

381. Ma, Y. LncRNA IGFL2-AS1 functions as a ceRNA in regulating ARPP19 through competitive binding to miR-802 in gastric cancer / Y. Ma, Y. Liu, Y.S. Pu, M.L. Cui, Z.J. Mao, Z.Z. Li, L. He, M. Wu, J.H. Wang // *Molecular carcinogenesis.* - 2020. - Vol. 59, N 3. - P. 311-22.

382. Wright, C.M. Long non coding RNAs (lncRNAs) are dysregulated in Malignant Pleural Mesothelioma (MPM) / C.M. Wright, M.B. Kirschner, Y.Y. Cheng, K.J. O'Byrne, S.G. Gray, K. Schelch, M.A. Hoda, S. Klebe, B. McCaughan, N. van Zandwijk, G. Reid // *PloS one.* - 2013. - Vol. 8, N 8. - P. e70940.

383. Chen, W.M. LncRNA POT1-AS1 accelerates the progression of gastric cancer by serving as a competing endogenous RNA of microRNA-497-5p to increase PDK3 expression / W.M. Chen, Y.M. Chen, S.Y. Jiang, Y.P. Tao, Y.G. Hong, L. Yang, H. Zheng, J.Q. Chen // *Journal of gastrointestinal oncology.* - 2021. - Vol. 12, N 6. - P. 2728-42.

384. Cen, X. LncRNA IGFL2-AS1 Promotes the Proliferation, Migration, and Invasion of Colon Cancer Cells and is Associated with Patient Prognosis / X. Cen, Y. Huang, Z. Lu, W. Shao, C. Zhuo, C. Bao, S. Feng, C. Wei, X. Tang, L. Cen, W. Guo, X. Tian, Q. Tang, X. Huang // *Cancer Manag Res.* - 2021. - Vol. 13, N. - P. 5957-68.

385. Wei, X. LncRNA MBNL1-AS1 represses cell proliferation and enhances cell apoptosis via targeting miR-135a-5p/PHLPP2/FOXO1 axis in bladder cancer / X. Wei, X. Yang, B. Wang, Y. Yang, Z. Fang, C. Yi, L. Shi, D. Song // *Cancer medicine.* - 2020. - Vol. 9, N 2. - P. 724-36.

386. Li, G. Overexpression of antisense long noncoding RNA ZNF710AS1202 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis of clear cell renal cell carcinoma via regulation of ZNF710 expression / G. Li, M. Xie, Z. Huang, H. Li, P. Li, Z. Zhang, Y. Ding, Z. Jia, J. Yang // *Molecular medicine reports.* - 2020. - Vol. 21, N 6. - P. 2502-12.

387. Zhang, H. LncRNA PSMB8-AS1 contributes to pancreatic cancer progression via modulating miR-382-3p/STAT1/PD-L1 axis / H. Zhang, C. Zhu, Z. He, S. Chen, L. Li, C. Sun // *Journal of experimental & clinical cancer research : CR.* - 2020. - Vol. 39, N 1. - P. 179.

388. Wu, L. Long noncoding RNA LINC01291 promotes the aggressive properties of melanoma by functioning as a competing endogenous RNA for microRNA-625-5p and subsequently increasing IGF-1R expression / L. Wu, K. Li, W. Lin, J. Liu, Q. Qi, G. Shen, W. Chen, W. He // *Cancer gene therapy*. - 2021. - Vol., N. - P.

389. Xiao, L. Downregulation of LINC01508 contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer via the regulation of the Hippo-YAP pathway / L. Xiao, X.Y. Shi, Z.L. Li, M. Li, M.M. Zhang, S.J. Yan, Z.L. Wei // *J Gynecol Oncol*. - 2021. - Vol. 32, N 5. - P. e77.