

На правах рукописи

КАЛИНИНА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА

**ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ, ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ И
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО
ЦИКЛОФИЛИНА А ЧЕЛОВЕКА**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Казанский Дмитрий Борисович

Официальные оппоненты:

Немцова Елена Романовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отделения экспериментальной фармакологии и токсикологии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена - филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Филатов Александр Васильевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией №23 иммунохимии федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России».

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «5» марта 2020 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

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

Автореферат разослан «.....» 20__ года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Химио- и радиотерапия являются традиционными и широко используемыми методами лечения онкологических заболеваний, одним из наиболее серьезных и клинически значимых побочных действий которых является миелосупрессия (Wang, 2006; Shao, 2013). При цитопении ухудшается качество жизни пациента, возникает риск развития оппортунистических инфекций и повышается вероятность кровотечений. Кроме того, миелосупрессия может стать причиной снижения дозы или отсрочки повторных курсов лечения, что, в свою очередь, негативно сказывается на результатах терапии и может привести к снижению общей выживаемости и выживаемости без признаков заболевания (Wang, 2006; Shao, 2013). Огромный практический интерес представляет поиск новых подходов для нейтрализации побочных эффектов традиционной терапии онкологических заболеваний, которые позволят ускорить процесс восстановления гемопоэза и снизить риск развития хронического повреждения костного мозга и ассоциированных с ним миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза.

В настоящее время, наряду с химио- и радиотерапией, активно разрабатываются и внедряются в клиническую практику различные методы иммунотерапии онкологических заболеваний (Zhang, 2018; Li, 2018). Поиск новых факторов стимуляции собственной иммунной системы организма, а также разработка персонализированных методов комбинированной иммунотерапии являются актуальной и перспективной областью исследований в онкологии.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что нативный циклофилин А мыши (ЦфА) (Khromykh, 2007) и рекомбинантный циклофилин А человека (рчЦфА) (Хромых, 2015) усиливают хемотаксис гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), что указывает на способность ЦфА участвовать в процессах восстановления кроветворной и иммунной систем организма после радио- и химиотерапии. С другой стороны, ЦфА является провоспалительным фактором, участвует в формировании очага воспаления (Nigro, 2013), регулирует действие других хемокинов и продукцию провоспалительных цитокинов (Dawar, 2017) и может участвовать в индукции и развитии иммунного ответа, в том числе противоопухолевого. За счет предполагаемых иммуномодулирующих свойств исследуемый белок может оказывать противоопухолевое действие, например, посредством формирования локального очага острого воспаления (Korniluk, 2017). Изучение ЦфА как фактора гемопоэза, иммуномодуляции и противоопухолевой защиты организма имеет важное значение для экспериментальной и клинической онкологии.

Цель исследования

Целью данного исследования являлось изучение гемopoэтических, иммуномодулирующих и противоопухолевых свойств рекомбинантного циклофилина А человека.

Задачи исследования

1. Изучить роль рчЦфА в регенерации кроветворной и иммунной систем организма путем анализа его влияния на субпопуляционный состав клеток костного мозга, крови и органов иммунной системы экспериментальных животных в норме и после воздействия цитостатика и облучения.
2. Оценить влияние рчЦфА на развитие иммунного ответа у интактных животных и у животных, подвергнутых воздействию цитостатика и облучения.
3. Оценить влияние рчЦфА на рост перевиваемых опухолевых штаммов различного гистогенеза в системе *in vivo* без воздействия и на фоне воздействия химиотерапевтического препарата.
4. Разработать модель для изучения роли ЦфА как фактора микроокружения ГСК путем создания трансгенных мышей с повышенной экспрессией ЦфА мышцы в остеобластах.

Методы и методология исследования

В работе использовали рекомбинантный циклофилин А человека (рчЦфА) (продуцент - *E. coli*). Для индукции лейкопении проводили сублетальное облучение мышей (доза 4,5 Гр) или обработку животных 5-фторурацилом. Анализ субпопуляционного состава органов гемopoэтической и иммунной систем проводили методом проточной цитофлуориметрии. Функциональную активность иммунной системы экспериментальных животных оценивали в моделях *in vivo* на модельный антиген методом Эрне (гуморальный ответ) и в реакции гиперчувствительности замедленного типа (клеточный ответ) и *in vitro* в реакциях бласттрансформации и смешанной культуры лимфоцитов. Исследование противоопухолевой активности рчЦфА проводили в системе *in vivo* на моделях перевиваемых опухолевых штаммов карциномы легкого Льюис (LLC), меланомы В16, аденокарциномы молочной железы Са755 и рака шейки матки РШМ-5. Оценку антиметастатического действия рчЦфА проводили на модели постоперационного метастазирования LLC *in vivo*. Влияние рчЦфА на уровень экспрессии различных генов в тканях первичной опухоли исследовали *in vivo* на модели перевиваемой меланомы В16 методом ПЦР в реальном времени. Влияние рчЦфА на ангиогенез опухоли исследовали *in vivo* на модели перевиваемой меланомы В16 методом иммуногистохимии. Роль рчЦфА в развитии противоопухолевого иммунного ответа оценивали в аллогенной системе отторжения лимфомы EL-4 (K^bD^b) мышами линии В10.D2(R101) ($K^dI-A^dI-E^dD^b$) и трансгенной линии 1D1b ($K^dI-A^dI-E^dD^b$). Для создания генетических конструкций

использовали метод молекулярного клонирования. Первичных трансгенных мышей получали методом микроинъекции ДНК в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. Наличие трансгена в геноме животных подтверждали методом ПЦР. Выведение чистой трансгенной линии проводили методом возвратных скрещиваний с мышами инбредной линии C57BL/6. Эмбриотоксические свойства рчЦфА изучали на беременных самках, которым вводили белок в доимплантационный период, период органо- или фетогенеза. Морфологические пороки развития эмбрионов оценивали визуально при помощи бинокля. Процессы оссификации скелета эмбрионов оценивали после окрашивания ализариновым красным по методике Доусона. Достоверность результатов подтверждена адекватным выбором методов и использованием современных методов математической статистики. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента и дисперсионного анализа ANOVA. Различия признавали значимыми при допустимых в медико-биологических исследованиях 5% уровне значимости ($p \leq 0,05$).

Научная новизна

Научная новизна обусловлена тем, что впервые изучена биологическая активность рчЦфА, в частности, впервые продемонстрировано:

- рчЦфА в фармакологических концентрациях не вызывает значительных изменений гомеостаза гемопоэтической системы организма;
- высокие дозы рчЦфА обладают сенсibiliзирующим действием;
- рчЦфА является фактором активации и пролиферации В-лимфоцитов и комитогеном для активированных Т-клеток;
- в системе *in vivo* выявлено иммуномодулирующее действие рчЦфА, направленное на стимуляцию гуморального и противоопухолевого иммунного ответа;
- рчЦфА участвует в восстановлении кроветворной и иммунной систем организма после воздействия высоких доз цитостатика и облучения;
- рчЦфА обладает противоопухолевой и антиметастатической активностью *in vivo*;
- аддитивное действие рчЦфА и 5-фторурацила, которое приводит к усиленному подавлению роста опухоли;
- уникальная модель трансгенных мышей с индуцируемой гиперэкспрессией ЦфА в остеобластах для изучения роли данного белка как фактора микроокружения ГСК;
- эмбриотоксическое действие высоких доз нативного ЦфА мыши и рчЦфА.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы определяется тем, что полученные результаты значительно расширили представления о функциональной активности ЦфА. В рамках данной работы выявлены и изучены свойства рчЦфА как гемопоэтического, иммуномодулирующего,

противоопухолевого и эмбриотоксического фактора. Практическая значимость работы определяется тем, что полученные результаты открывают перспективы для использования в клинической практике лекарственных средств на основе рчЦФА: в качестве поддерживающей терапии заболеваний, сопровождающихся лейкопенией; в качестве иммуномодулятора для коррекции иммунодефицитных состояний; в качестве самостоятельного противоопухолевого агента; в составе комбинированной лекарственной терапии онкологических заболеваний.

Личный вклад

Автор лично провел анализ научной литературы по теме диссертации, принимал непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке плана исследования. Автором проведены экспериментальная реализация плана исследования, анализ и обобщение полученных данных, подготовлены публикации, отражающие полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены автором на всероссийских и международных научных конференциях.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – онкология и областям исследования п.2. «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» и п.6. «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

Положения, выносимые на защиту

1. РчЦФА способствует восстановлению кроветворной и иммунной систем организма после сублетального облучения и воздействия цитостатика (5 - фторурацила).
2. РчЦФА обладает иммуномодулирующими свойствами, направленными на стимуляцию врожденного и адаптивного иммунитета.
3. РчЦФА обладает противоопухолевым действием в отношении перевиваемых опухолевых штаммов различного гистогенеза.
4. РчЦФА обладает антиметастатическим действием.
5. При сочетанной терапии перевиваемого рака шейки матки выявлено аддитивное действие рчЦФА и 5ФУ.
6. Создана модель трансгенных мышей с индуцируемой гиперэкспрессией ЦФА в остеобластах для изучения роли данного белка в микроокружении ГСК.

Внедрение результатов исследования

Полученные результаты открывают широкие перспективы для внедрения рчЦФА в практическую онкологию. Применение рчЦФА на фоне химио- и радиотерапии позволит

контролировать развитие лейкопении и проводить иммунокоррекцию онкологических больных. Благодаря выявленным иммуномодулирующим и противоопухолевым свойствам рчЦФА может использоваться в качестве самостоятельного противоопухолевого средства и как компонент комбинированной иммунотерапии и комплексной лекарственной терапии злокачественных новообразований.

Апробация

Полученные в рамках данной диссертационной работы результаты защищены тремя патентами Российской Федерации. Результаты исследований были представлены на следующих конференциях: XV Международном конгрессе иммунологов (22 - 27 августа 2013 г., Милан, Италия), XII Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» (31 марта - 1 апреля 2015 г., Москва), III Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (6 - 8 декабря 2017 г., Москва), V съезде физиологов СНГ и V съезде биохимиков России (4 - 8 октября 2018 г., Сочи-Дагомыс), V Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2019» (20 - 23 июня 2019 г., Санкт-Петербург).

Апробация диссертации состоялась 18 октября 2019 года на совместной научной конференции лаборатории механизмов регуляции иммунитета, лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток и лаборатории биологии стромальных клеток опухоли НИИ канцерогенеза, лаборатории клеточного иммунитета и лаборатории экспериментальной химиотерапии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, лаборатории клинической иммунологии опухолей и хирургического отделения №10 (онкодерматологии) НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и лаборатории дифференцировки лимфоцитов Федерального государственного бюджетного учреждения "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства России".

Публикации

Материалы диссертационных исследований изложены в 18 научных работах, из них 2 статьи в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, и 3 патента Российской Федерации на изобретение.

Объем и структура работы

Диссертационная работа написана по традиционной форме, изложена на 194 страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты исследования» и «Обсуждение результатов», заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего ссылки на 187 отечественных и зарубежных источников, и содержит 87 иллюстраций и 32 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Мыши. В работе использовали мышей линии C57BL/6, FVB, B10.D2(R101), CBA/Lac, гибридов F1(C57BL/6 x DBA/2) и F1(CBA/Lac x C57BL/6), а также трансгенные линии 1D1b и Osx-Cre.

Облучение животных проводили при помощи терапевтического аппарата "Агат-Р" (Россия) (источник γ -излучения Co^{60} с начальной мощностью $1,9 \times 10^{14}$ Бк) в дозах 2,5 - 6,5 Гр.

Рекомбинантный циклофилин А человека (рчЦФА) выделяли из бактериальной биомассы *Escherichia coli* BL21(DE3)Gold, трансформированной плазмидой pETCYPori, содержащей кДНК ЦФА человека, с использованием фракционирования сульфатом аммония. Очистку проводили при помощи тандемной анионообменной хроматографии на колонках DEAE- и Q-Sepharose. рчЦФА использовали в виде раствора в натрий-калий фосфатно-солевом буфере (PBS).

5-фторурацил (Фторурацил-Лэнс, ООО "Ленс-Фарм", Россия) вводили животным внутривентриально двукратно с интервалом в 96 ч.

Введение рчЦФА проводили подкожно в течение 7 дней. Для оценки противоопухолевого действия рчЦФА вводили 1) в течение 7 дней до и 7 дней после прививки опухолевого штамма; или 2) в течение 7 дней после прививки опухолевого штамма. При оценке антиметастатического действия рчЦФА вводили 1) в течение 7 дней до удаления первичного опухолевого узла; или 2) в течение 7 дней после удаления первичного узла. Для оценки иммуномодулирующего действия рчЦФА мышам вводили белок внутривентриально в дозе 100,0 мкг/мышь в течение 3 дней, начиная обработку через 3 часа после введения клеток лимфомы EL-4. Мышей трансгенной линии 1D1b обрабатывали рчЦФА путем подкожного введения 200,0 мкг/мышь в течение 7 дней после иммунизации клетками EL-4. При изучении эмбриотоксического действия рчЦФА использовали дозу белка 2,0 мг/кг, которую вводили беременным самкам 1) 0,5 - 5,5 день беременности (доимплантационный период); 2) 6,5 - 11,5 день беременности (органогенез); или 3) 12,5 - 17,5 день беременности (фетогенез). Во всех исследованиях контрольной группе животных аналогичным образом вводили PBS качестве плацебо.

Цитофлуориметрический анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (BD, США) в программе FACSDiva 6.0. Обработку результатов проводили в программе FlowJo 7.6. (BD, США).

Определение количества антителообразующих клеток (АОК). Мышей F1(CBA/Lac x C57BL/6) внутривентриально иммунизировали эритроцитами барана и на 5 сутки определяли число АОК методом Ерне.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа. Мышей иммунизировали тринитробензосульфоновой кислотой в основание хвоста или эритроцитами барана подкожно. Вторую инъекцию антигена проводили на 5 сутки в подушечку задней стопы. Результаты реакции регистрировали через 24 ч путем определения массы "опытной" и "контрольной" стоп.

Реакция бласттрансформации. Спленоциты мышей помещали в культуру с рЧЦФА (0,01 - 100,0 мкг/мл) или конканавалином А (КонА) (4,0 мкг/мл). Предварительную активацию спленоцитов интактных мышей КонА (1,5 - 12,0 мкг/мл) проводили в течение 2 ч. Клетки инкубировали в течение 48 ч. Уровень пролиферации оценивали по интенсивности включения ^3H - тимидина, внесенного за последние 18 ч инкубации.

Смешанная культура лимфоцитов. Стимуляторы подготавливали путем обработки спленоцитов мышей митомицином С (25 мкг/мл, 37°C, 30 мин). Клетки - респондеры смешивали с клетками - стимуляторами в соотношении 3:5 и культивировали в течение 72 ч. Уровень пролиферации клеток оценивали описанным выше образом.

Опухолевые штаммы. В работе использовали 2 - 7 пассажи *in vivo* карциномы легкого Льюис (LLC), рака шейки матки РШМ - 5, меланомы В16, аденокарциномы Са 755. Опухолевые клетки в дозе $5,0 \times 10^6$ кл/мышь прививали мышам подкожно в область правой подмышечной впадины. Лимфому EL-4 получали в асцитной форме путем внутрибрюшинной прививки сингенным мышам линии C57BL/6 в количестве $3,0 - 5,0 \times 10^6$ клеток.

Оценку противоопухолевой активности рЧЦФА проводили по показателям торможения роста опухоли и увеличения продолжительности жизни опытных животных.

Оценку антиметастатического действия рЧЦФА проводили на модели постоперационного метастазирования LLC. Первичный опухолевый узел удаляли хирургическим путем на 8 день после прививки. Интенсивность метастазирования LLC в легких определяли на 21 день после операции.

Выделение мРНК проводили с использованием TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc, США) по протоколу производителя. Образцы РНК обрабатывали ДНКазой I.

Синтез кДНК осуществляли с помощью коммерческого набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя.

ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием красителя EvaGreen (Biotium, США) на приборе BioRad CFX-96 (США). В качестве генов домашнего хозяйства использовали ген гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (*hprt*) и ТАТА-связывающего белка (*tbp*). Анализ ПЦР проводили с использованием программы BioRad CFX Manager 3.1.

Имуногистохимическое исследование. Срезы опухолевой ткани меланомы В16 обрабатывали антителами к молекуле CD34 (BD Pharmingen, США) согласно протоколу производителя.

Трансгенных мышей получали методом микроинъекции генетической конструкции в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. **Наличие трансгена в геноме** мышей определяли методом ПЦР на приборе Терцик (ДНК-Технология, Россия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием парного двухвыборочного t-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Различия признавали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние рчЦФА на гемопоэтическую и иммунную системы экспериментальных животных в норме

В ходе исследований было показано, что курсовое 7 - дневное введение рчЦФА (100,0 мкг/мышь) не влияет на субпопуляционный состав клеток костного мозга, а также относительное количество и активационный фенотип Т - лимфоцитов периферической крови интактных мышей. При курсовом введении в дозах 0,1 - 3,0 мг/мышь рчЦФА индуцирует активацию В - клеток периферической крови экспериментальных животных (рис. 1).

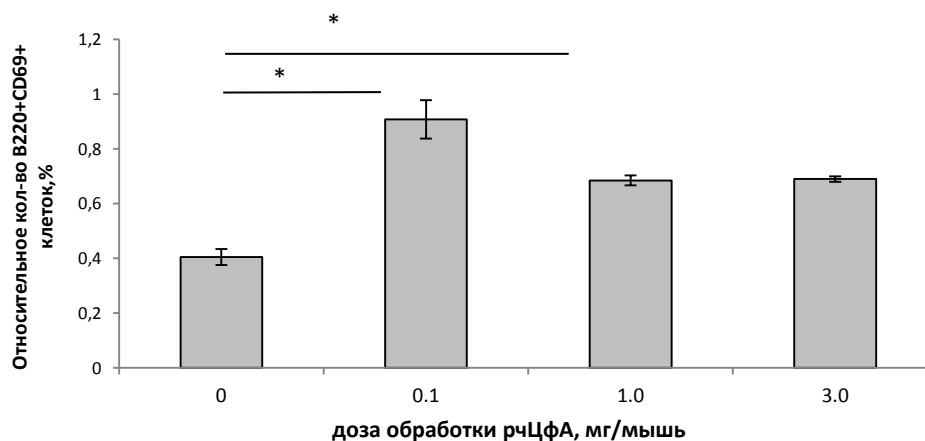


Рисунок 1 - Относительное количество активированных В-клеток (B220+CD69+) в периферической крови мышей F1(CBA/Lac x C57BL/6) после курсового введения рчЦФА. * $p \leq 0,05$

Исследования *ex vivo* выявили повышенную спонтанную пролиферацию спленоцитов мышей, обработанных высокими дозами рчЦФА (рис. 2А). Дополнительное воздействие *ex vivo* Т-клеточным митогеном КонА или рчЦФА вызывает подавление пролиферативной активности клеток этих животных (рис. 2Б, В), что, вероятно, связано с избыточной активацией лимфоцитов. Полученные данные свидетельствуют о способности рчЦФА в высоких дозах индуцировать неспецифическую активацию лимфоцитов *in vivo*, повышая их чувствительность к дополнительным активационным стимулам.

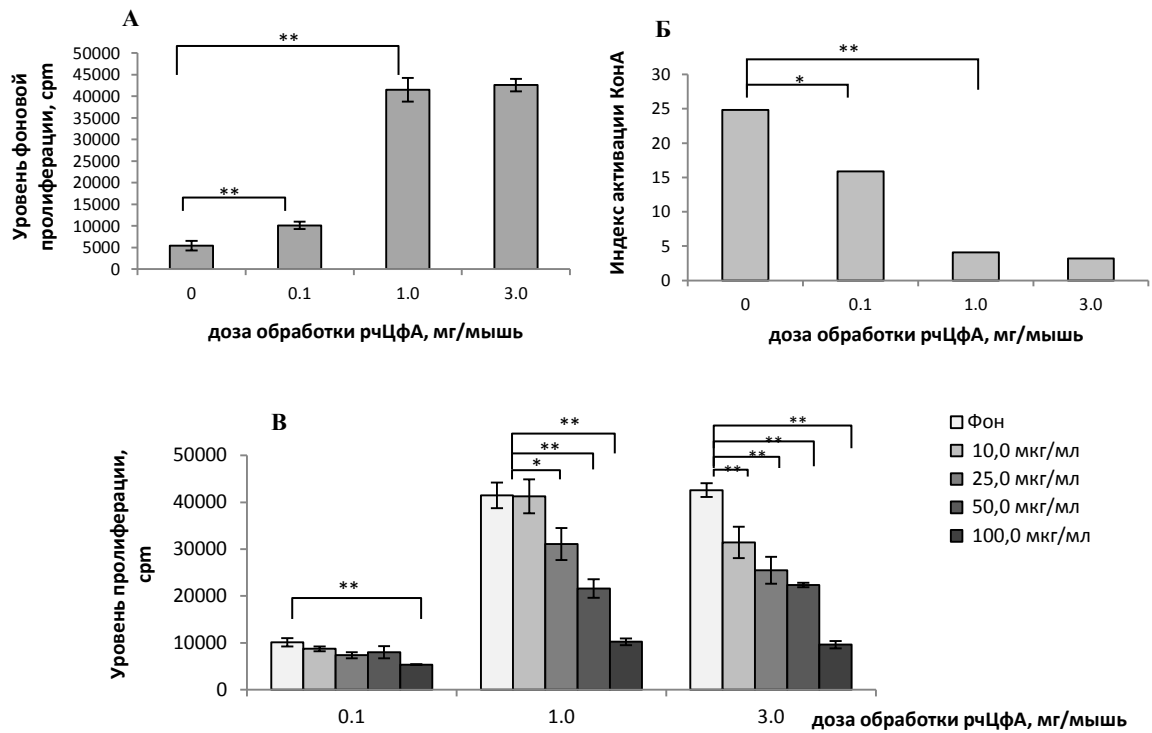


Рисунок 2 - Уровень *ex vivo* пролиферации спленоцитов мышей F1(СВА/Лас х С57ВL/6) после курсового введения рчЦФА. А) Спонтанная пролиферация; Б) Пролиферация в присутствии конканавалина А (Кона, 4,0 мкг/мл); В) Пролиферация в присутствии рчЦФА. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Анализ развития иммунного ответа *in vivo* показал, что курсовое введение рчЦФА приводит к усилению гуморального иммунного ответа (рис. 3А), что может быть обусловлено рчЦФА - индуцированной активацией В-клеток.

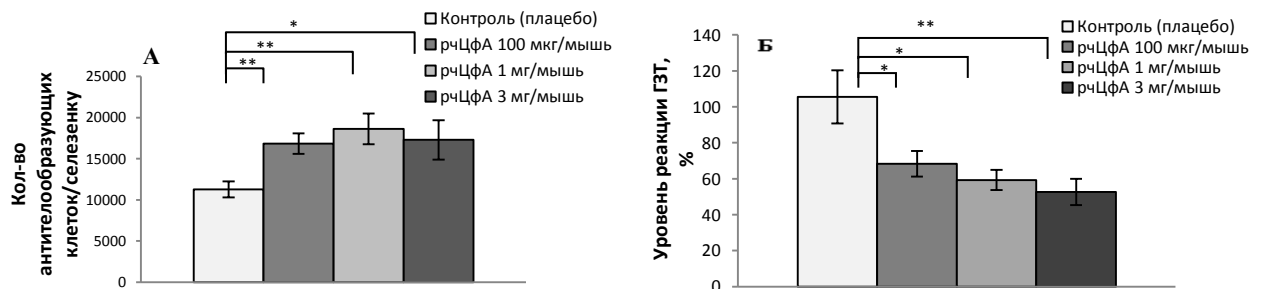


Рисунок 3 - Уровень *in vivo* гуморального (А) и клеточного (Б) иммунного ответа мышей F1(СВА/Лас х С57ВL/6) после курсового введения рчЦФА. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Между тем, у мышей, обработанных рчЦФА, наблюдали подавление реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) (рис. 3Б). Вероятно, введение модельного антигена после курсовой обработки животных рчЦФА могло привести к избыточной активации Т-лимфоцитов *in vivo*, и, как следствие, подавлению их эффекторных функций при вторичном контакте с антигеном.

Митогенные свойства рЦфА

В данном исследовании оценивали митогенную активность рЦфА *in vitro* в отношении спленоцитов интактных животных. Было показано, что рЦфА в высоких дозах (10 - 25 мкг/мл) стимулирует пролиферацию клеток селезенки (рис. 4А). Это сопровождается увеличением доли активированных В-клеток в культуре (рис. 4Б).

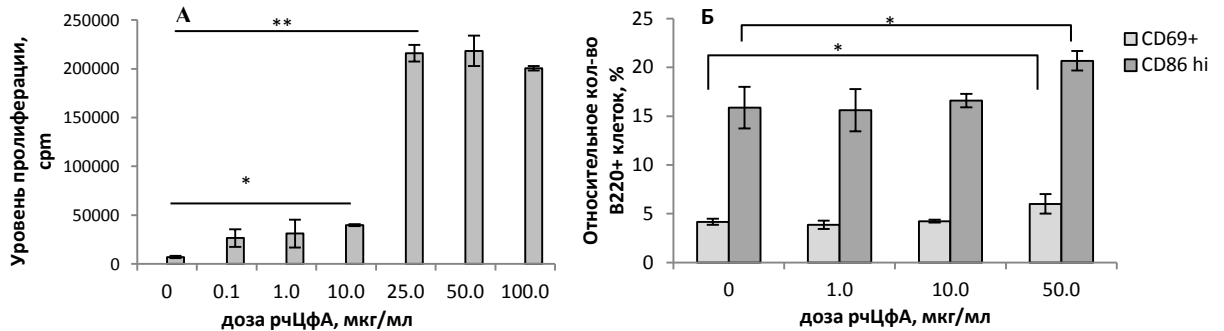


Рисунок 4 - Влияние рЦфА на *in vitro* пролиферацию спленоцитов интактных мышей F1(СВА/Лас х С57ВL/6). А) Уровень пролиферативной активности через 48ч инкубации с рЦфА; Б) Относительное количество активированных В-клеток в культуре спленоцитов через 48ч инкубации с рЦфА. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Кроме того, показано, что рЦфА обладает комитогенной активностью в отношении активированных Т-клеток (рис. 5).

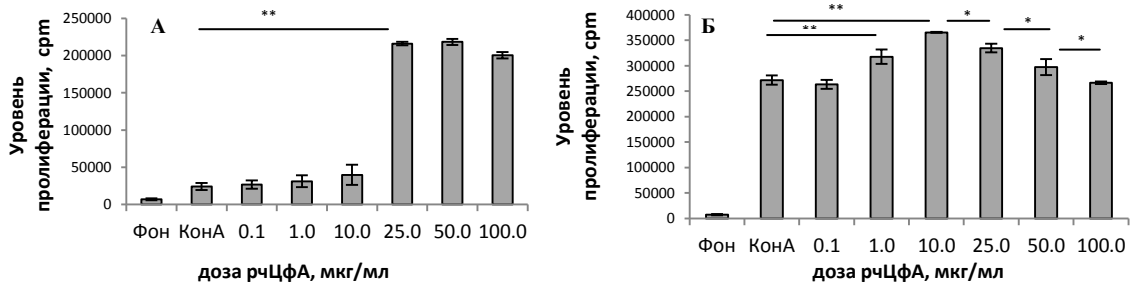


Рисунок 5 - Влияние рЦфА на *in vitro* пролиферацию активированных Т-клеток. А) Т-клетки, предварительно обработанные 4,0 мкг/мл Кона; Б) Т-клетки, предварительно обработанные 12,0 мкг/мл Кона. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Таким образом, выявлены иммуномодулирующие свойства рЦфА как митогена и фактора активации В - лимфоцитов и регулятора пролиферации активированных Т-лимфоцитов, что может иметь важное значение для контроля их эффекторных функций. Курсовое введение рЦфА в дозе 100,0 мкг/мышь не оказывает влияния на гемопоэтическую систему интактного организма, однако при высоких дозах (1,0 - 3,0 мг/мышь) индуцирует неспецифическую активацию лимфоцитов и повышает их чувствительность к активационным и митогенным стимулам.

Влияние рчЦФА на восстановление кроветворной и иммунной систем организма облученных мышей

Исследования показали, что однократное внутривенное введение рчЦФА (100,0 мкг/мышь) стимулирует формирование эндоколоний в селезенке сублетально облученных мышей (4,5 Гр) (рис. 6).

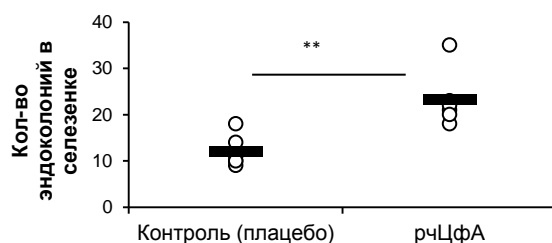


Рисунок 6 - Количество эндоколоний в селезенке облученных мышей линии C57BL/6. $**p \leq 0,01$

Курсовое введение рчЦФА способствовало восстановлению абсолютного количества лейкоцитов в периферической крови облученных мышей на 7 день после облучения (рис. 7А), что сопровождалось увеличением доли гранулоцитов (рис. 7Б). На более поздних сроках данный эффект не наблюдали.

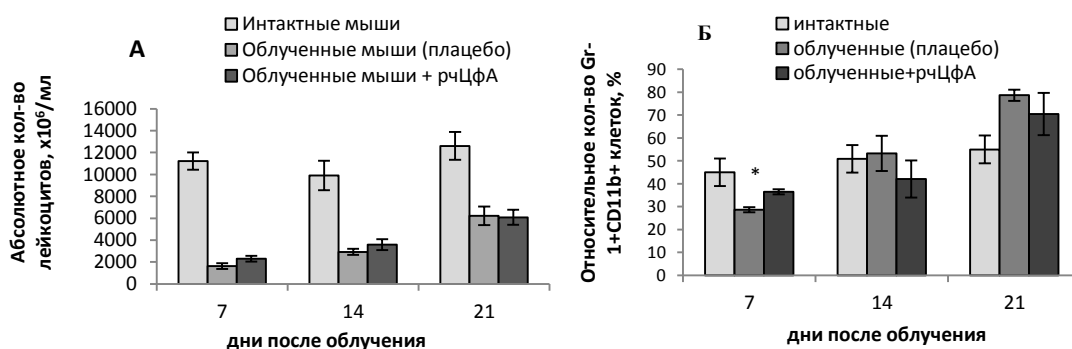


Рисунок 7 - Влияние рчЦФА на динамику восстановления периферической крови облученных мышей. А) Абсолютное количество лейкоцитов ($\times 10^6/\text{мл}$); Б) Относительное количество (%) гранулоцитов (Gr1+CD11b+). $**p \leq 0,01$

Обработка животных рчЦФА в течение первой недели после облучения способствовала полному восстановлению пула стволовых клеток в селезенке к 7 дню после облучения (рис. 8А), а также стимулировала регенерацию поздних коммитированных предшественников (Sca1-CD31+) и В-клеток (рис. 8Б) в данном органе через 14 дней после облучения.

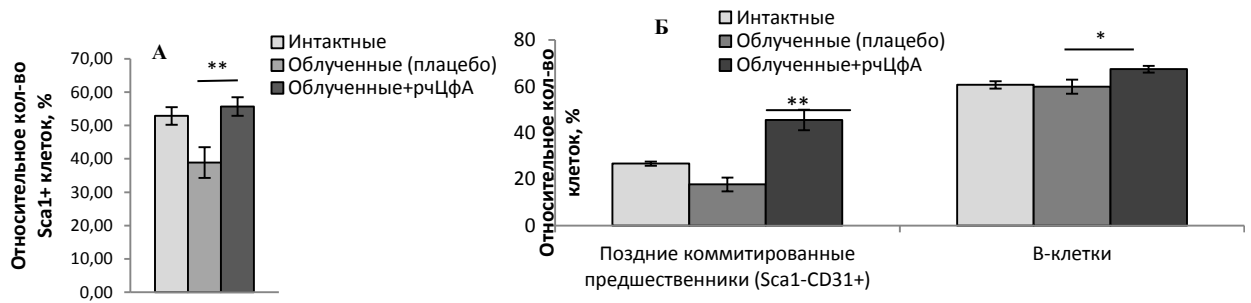


Рисунок 8 - Влияние рЦФА на динамику восстановления селезенки облученных мышей. Относительное количество (%) А) стволовых клеток (Sca1+); Б) поздних коммитированных предшественников (Sca1-CD31+) и В-клеток. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Таким образом, при сублетальном облучении рЦФА стимулирует миграцию гемопоэтических стволовых клеток в селезенку, способствуя регенерации гранулоцитопоэза и В-лимфопоэза в периферических органах. При этом не происходит опустошения и субпопуляционных перестроек костного мозга.

Кроме того, показано, что рЦФА способствует восстановлению клеточности тимуса (рис. 9А) и нормализации соотношения основных популяций тимоцитов (рис. 9Б) к 21 дню после облучения.

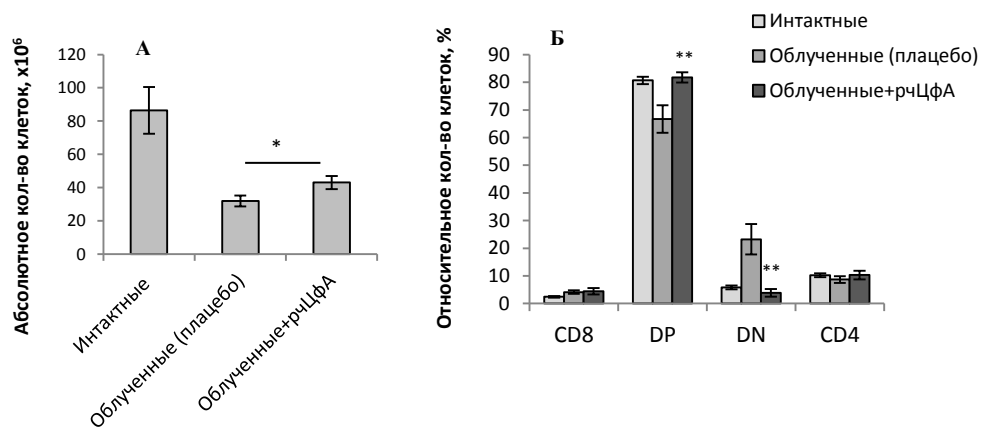


Рисунок 9 - Влияние рЦФА на динамику восстановления тимуса облученных мышей к 3 неделе после облучения. А) Абсолютное количество клеток ($\times 10^6$); Б) Относительное количество (%) CD8+, двойных позитивных CD8+CD4+ (DP), двойных негативных CD8-CD4- (DN) и CD4+ клеток в тимусе. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

При оценке функциональной активности иммунной системы облученных мышей было показано, что курсовое введение рЦФА стимулирует аллогенный иммунный ответ лимфоцитов *in vitro* к 14 дню после облучения (рис. 10А). Однако, к 3 неделе после облучения наблюдали подавление гуморального и клеточного иммунных ответов *in vivo* у мышей, обработанных рЦФА (рис. 10 Б, В). Данные результаты, вероятно, являются следствием

системных взаимодействий, которые приводят к супрессорному эффекту, что требует дальнейшего изучения как по параметрам взаимодействующих цитокинов, так и во временной динамике.

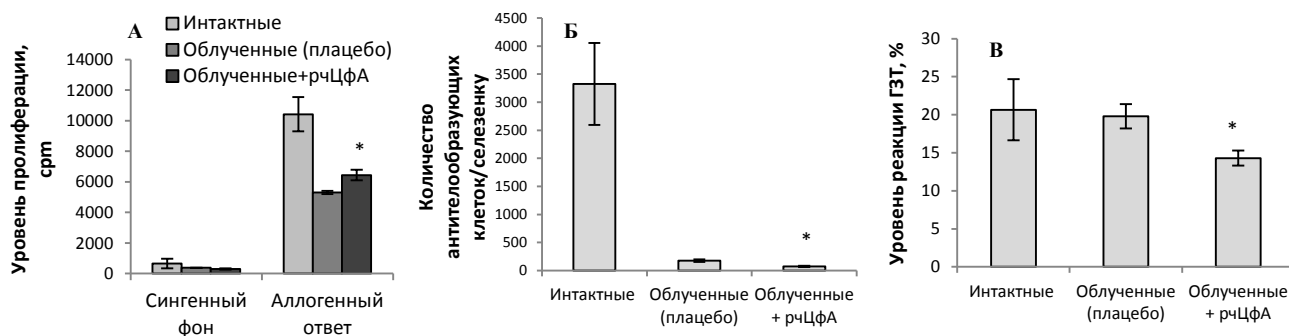


Рисунок 10 - Влияние рЦФА на функциональную активность иммунной системы облученных мышей. Уровень аллогенного иммунного ответа спленоцитов *in vitro* в реакции смешанной культуры лимфоцитов через 2 недели после облучения (А); Уровень *in vivo* гуморального (Б) и клеточного (В) иммунного ответа облученных мышей через 3 недели после облучения. * $p \leq 0,05$

Влияние рЦФА на восстановление кроветворной и иммунной систем организма мышей после воздействия 5-фторурацила (5ФУ)

Курсовое введение рЦФА (100,0 мкг/мышь) животным, обработанным 5ФУ (80,0 мг/кг), препятствовало развитию лейкопении в селезенке (рис. 11А), стимулировало полное восстановление лейкоцитов в периферической крови к 3 дню (рис. 11Б) и в костном мозге к 7 дню по окончании введения химиопрепарата (рис. 11В).

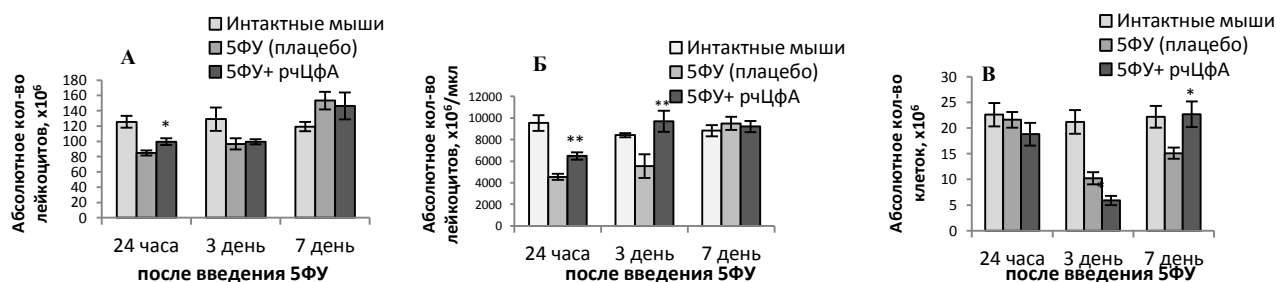


Рисунок 11 - Влияние рЦФА на динамику восстановления абсолютного количества лейкоцитов в селезенке (А), периферической крови (Б) и костном мозге (В) мышей линии C57BL/6 после обработки 5ФУ. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Исследования показали, что под действием рЦФА процессы регенерации гранулоцитопоза и лимфопоза в периферических органах сопровождаются активной миграцией коммитированных предшественников (Sca-1+CD31+), Т-клеток (CD3+) и В-клеток (B220+) из костного мозга (рис. 12).

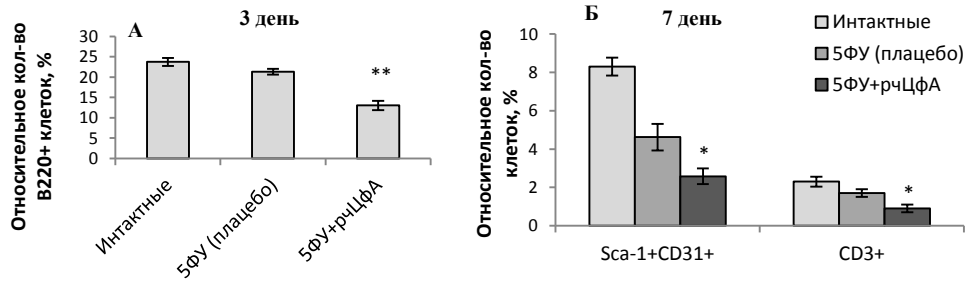


Рисунок 12 - Относительное количество (%) В-клеток (А), коммитированных предшественников (Sca1+CD31+) и Т-клеток (CD3+) (Б) в костном мозге мышей линии C57BL/6 после обработки 5ФУ. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Влияние рЦФА на рост опухоли *in vivo*

Данное исследование проводили с использованием перевиваемых опухолевых штаммов различного гистогенеза: рака шейки матки РШМ-5, меланомы В16, аденокарциномы молочной железы Ca755, карциномы легкого Льюис (LLC). Был выявлен выраженный противоопухолевый эффект рЦФА в отношении всех используемых опухолевых штаммов (рис. 13).

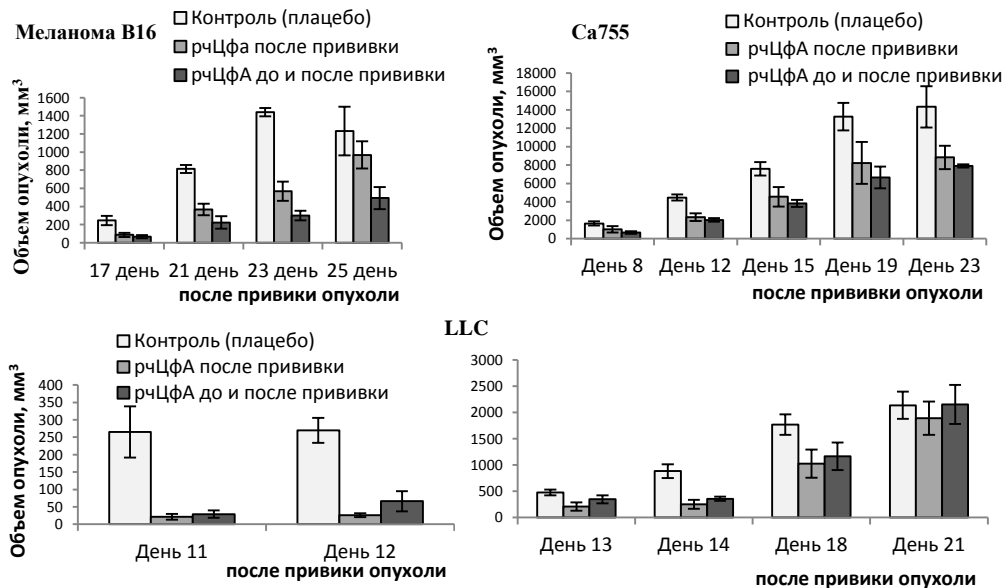


Рисунок 13 - Влияние рЦФА на динамику роста меланомы В16, аденокарциномы молочной железы Ca755 и карциномы легкого Льюис (LLC) *in vivo*

На модели перевиваемого рака шейки матки РШМ-5 оценивали влияние рЦФА на динамику роста развивающейся опухоли (рис. 14А) и развившегося опухолевого узла (рис. 14Б). В обеих экспериментальных системах в качестве препарата сравнения использовали 5ФУ (40,0 мкг/кг). Кроме того, оценивали влияние сочетанного действия рЦФА и 5ФУ на рост РШМ-5 *in vivo*. Было показано, что противоопухолевое действие рЦФА сопоставимо с

эффектами 5ФУ, а также выявлен аддитивный эффект рЧЦФА и 5ФУ при комплексной терапии развивающегося опухолевого узла РШМ-5 (рис. 14А).

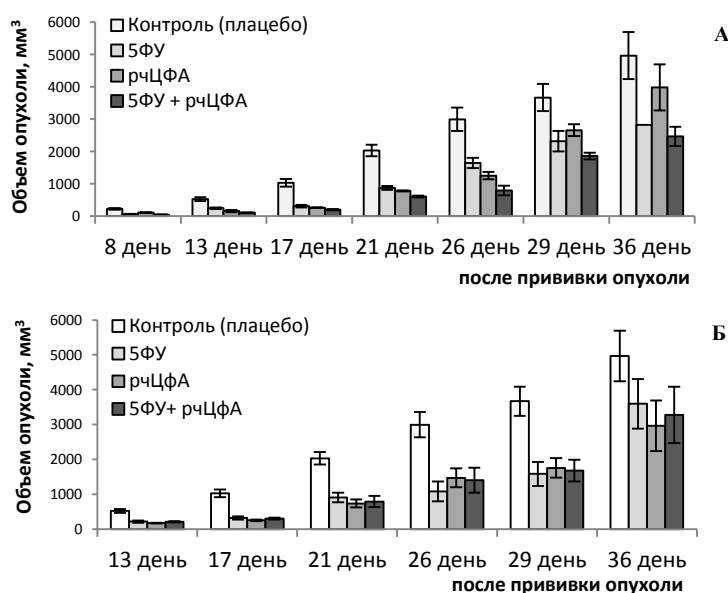


Рисунок 14 - Влияние рЧЦФА на динамику роста развивающегося (А) и развившегося (Б) опухолевого узла РШМ-5 *in vivo*

Влияние рЧЦФА на метастазирование LLC

Влияние рЧЦФА на интенсивность метастазирования оценивали в модели постоперационного метастазирования LLC. Исследуемый белок вводили в течение 7 дней до операции или 7 дней после операции для изучения профилактического антиметастатического действия и влияния на рост уже сформированных метастазов соответственно. Было показано, что рЧЦФА обладает ярко выраженным профилактическим антиметастатическим действием (с показателями торможения метастазирования более 70%) и не оказывает никакого влияния на рост уже сформированных метастазов (рис. 15).

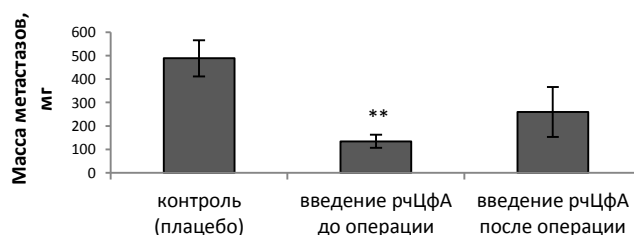


Рисунок 15 - Влияние рЧЦФА на интенсивность постоперационного метастазирования LLC. ** $p \leq 0,01$

Механизмы противоопухолевого действия рЧЦФА

В качестве возможного молекулярного механизма противоопухолевого действия рЧЦФА оценивали влияние данного белка на экспрессию генов ряда матричных металлопротеиназ (ММП) (рис. 16А), тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP-1 и TIMP-2) (рис. 16Б), а

также эндогенного ЦфА (Ppia) и его основного рецептора CD147 (Bsg) (рис. 16B) в первичной опухолевой ткани меланомы B16.

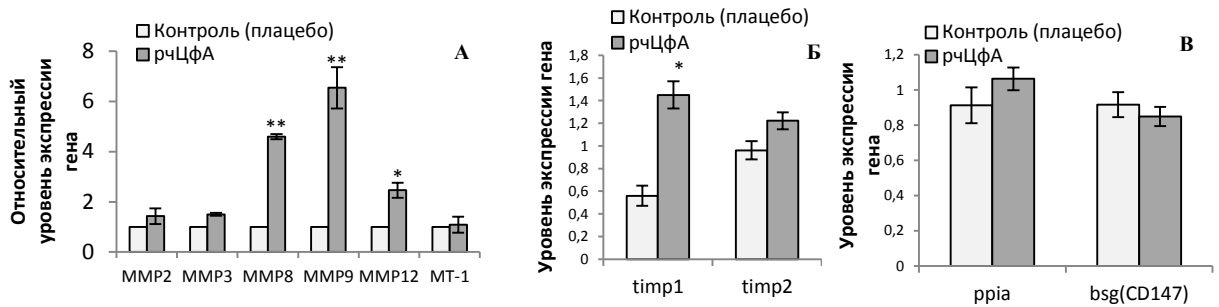


Рисунок 16 - Влияние рЦфА на экспрессию генов матриксных металлопротеиназ (А), тканевых ингибиторов металлопротеиназ (Б), эндогенного ЦфА (Ppia) и CD147 (Bsg) (В) в первичной опухолевой ткани меланомы B16. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Было показано, что рЦфА не влияет на экспрессию в тканях первичной меланомы B16 генов ряда MMP с хорошо изученными проонкогенными функциями. Кроме того, исследуемый белок не стимулирует экспрессию гена нативного ЦфА и CD147, для которых также показана важная роль в канцерогенезе. Следовательно, по данным параметрам в используемой модели рЦфА не выступает в качестве фактора опухолевой прогрессии. Более того, рЦфА повышает экспрессию генов MMP8, 9 и 12 и тканевого ингибитора металлопротеиназ Timp-1, способных проявлять противоопухолевую активность на разных стадиях канцерогенеза.

Кроме того, проведено исследование влияния рЦфА на процесс ангиогенеза опухоли на модели перевиваемой меланомы B16. На 10 день после прививки опухоли в первичных опухолевых узлах B16 определяли количество сосудов методом иммуногистохимии (рис. 17). Введение рЦфА мышам - опухоленосителям не оказало влияния на степень васкуляризации меланомы B16.

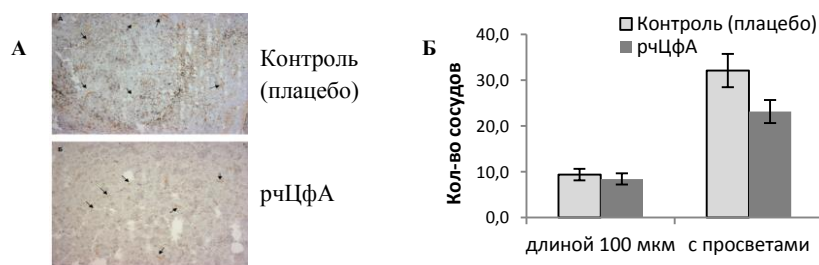


Рисунок 17 - Влияние рЦфА на процессы ангиогенеза меланомы B16. А) Репрезентативные гистологические срезы первичных опухолевых узлов меланомы B16; Б) Среднее количество сосудов в первичной меланоме B16.

В образцах опухолевой ткани меланомы B16 также определяли уровень экспрессии гена фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), который является одним из важнейших

медиаторов ангиогенеза при росте злокачественных новообразований. Было показано, что рчЦФА не оказал влияния на уровень мРНК *VEGF-A* в клетках данной опухоли, что коррелировало с результатами иммуногистохимического исследования.

Роль рчЦФА в развитии противоопухолевого иммунного ответа

Данное исследование проводили с использованием аллогенной системы отторжения клеток опухоли EL-4 (K^bD^b) у мышей линии B10.D2(R101) ($K^dI-A^dI-E^dD^b$). Элиминация опухоли в данной системе происходит за счет различий в одной молекуле главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса. Введение мышам рчЦФА приводило к ускоренному отторжению клеток EL-4 (рис. 18А), что было обусловлено ранним интенсивным накоплением гранулоцитов в сайте-локализации опухоли (рис. 18Б) и системным накоплением эффекторных цитотоксических Т-клеток (рис. 18В).

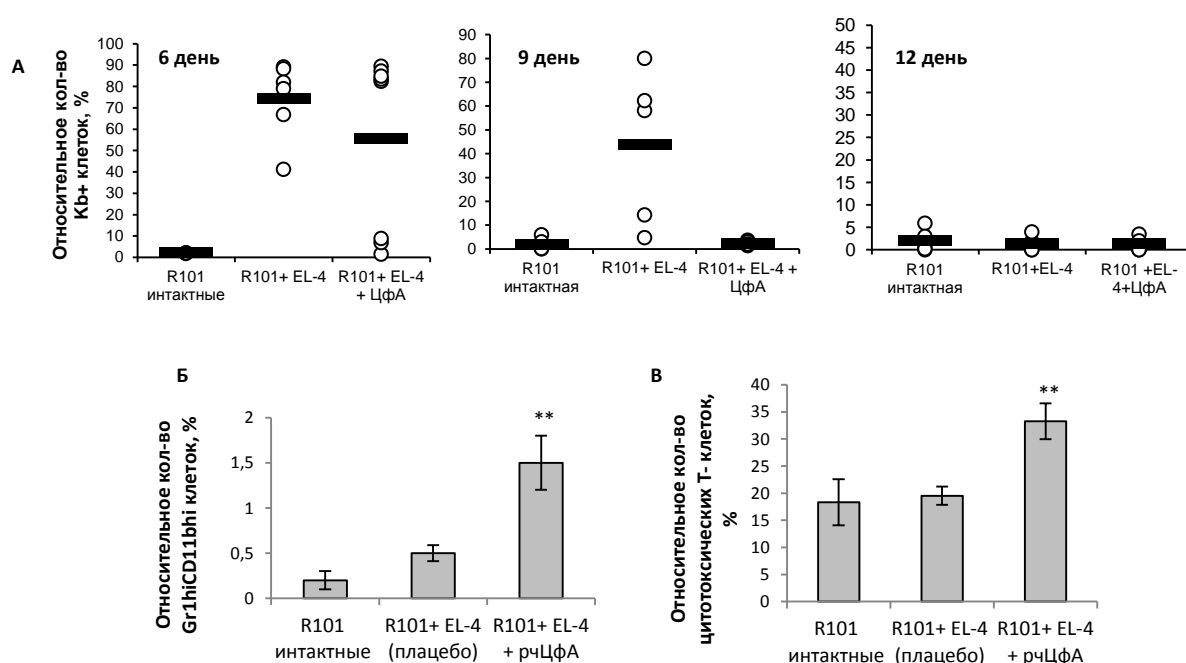


Рисунок 18 - Влияние рчЦФА на динамику отторжения клеток EL-4. Относительное количество (%) опухолевых клеток EL-4 в брюшной полости мышей (А); зрелых гранулоцитов в брюшной полости мышей на 6 день после иммунизации (Б); цитотоксических Т-клеток в селезенке мышей на 9 день после иммунизации (В). ** $p \leq 0,01$

Таким образом, полученные результаты дают основание предполагать, что ЦФА является фактором противоопухолевой защиты организма. Данная функция белка может быть реализована за счет нескольких механизмов, которые, вероятно, во многом опосредованы взаимодействием ЦФА с его основным рецептором CD147 (рис. 19).



Рисунок 19 - Возможные механизмы реализации противоопухолевой активности рЦфА

Разработка модели для изучения роли ЦфА как фактора микроокружения ГСК

Генетическую конструкцию для трансгеноза создали на основе экспрессионного вектора рUC18, который содержит первый интрон и фрагмент промотора крысиного коллагена I типа α (2,3kb Col1a1), обеспечивающий специфичную экспрессию трансгена в остеобластах. В ходе работы было выявлено эмбриотоксическое действие высоких концентраций ЦфА при его конститутивной гиперэкспрессии, которое проявлялось в гибели 80% микроинъектированных зигот до имплантации и 66% трансгенных эмбрионов после имплантации. Вследствие выявленных эффектов получение жизнеспособных трансгенных мышей оказалось невозможным. Для преодоления эмбриотоксичности ЦфА на следующем этапе работы создана линия мышей *Сур-STOP*, у которых экспрессия гена мЦфА под контролем промотора 2,3kb Col1a1 предотвращалась Cre-регулируемой СТОП-кассетой (рис. 20). Полученные трансгенные животные были жизнеспособными и не имели фенотипических отличий в росте и развитии от мышей дикого типа. Для получения целевых трансгенных животных проводили скрещивания мышей линии *Сур-STOP* с мышами линии *Osx-Cre*, которые характеризуются тетрациклин-зависимой (tet-off) индукцией экспрессии Cre-рекомбиназы (рис. 21). Гиперэкспрессия гена мЦфА в остеобластах индуцировалась только у мышей с генотипом *Сур+Cre+* в отсутствие тетрациклина.

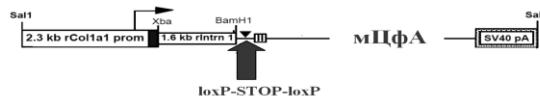


Рисунок 20 - Схематичное изображение экспрессионной конструкции рUC18 - STOP - мЦФА

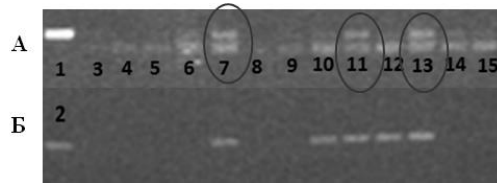


Рисунок 21 - Фрагмент ПЦР - анализа потомков F1 скрещивания *Cyp* - STOP x *Osx* - Cre: **А)** амплификация праймерами к генетической конструкции рUC18 - STOP - мЦФА; **Б)** амплификация праймерами к генетической конструкции *Osx* - Cre; 1 - генетическая конструкция рUC18 - STOP - мЦФА (положительный контроль); 2 - генетическая конструкция *Osx*-Cre (положительный контроль); 3 - 15 - геномная ДНК мышей - потомков F1. Трансгенные мыши с генотипом *Cyp*-STOP⁺Cre⁺ №№ 7,11,13.

Таким образом, получена уникальная модель кондиционных трансгенных мышей, открывающая широкие перспективы для изучения функций ЦФА в дифференцировке ГСК, а также в формировании и функционировании гемопоэтической системы организма в различные периоды онтогенеза.

Эмбриотоксическое действие рЦФА

Данное исследование проводили на беременных самках F1(CBA/Lac x C57BL/6), которым вводили рЦФА (2,0 мг/мышь) в доимплантационный период (0,5- 5,5 день беременности), в период органогенеза (6,5 - 11,5 день беременности) и в период фетогенеза (12,5 - 17,5 день беременности). Выявлено тератогенное действие рЦФА при введении самкам в период органогенеза, которое проявлялось в развитии анатомических пороков (рис. 22А) и нарушении процессов оссификации всех костей черепа и, реже, костей конечностей (рис. 22Б).

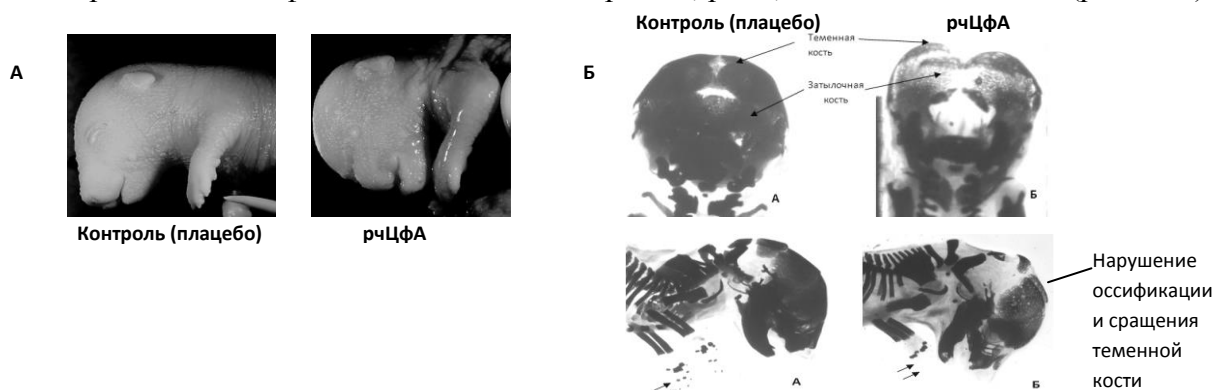


Рисунок 22 - Тератогенное действие рЦФА. **А)** Анатомические пороки развития плода при введении рЦФА в период органогенеза. **Б)** Дефекты развития теменной и затылочной костей черепа при введении рЦФА в период органогенеза. Стрелками показано отсутствие дистальных фаланг пальцев верхней конечности.

ВЫВОДЫ

1. Курсовое введение умеренных доз рчЦфА не влияет на гомеостаз кроветворной системы здорового (интактного) организма.
2. Курсовое введение высоких доз рчЦфА индуцирует неспецифическую активацию лимфоцитов и вызывает их сенсibilизацию к дополнительным активационным стимулам.
3. РчЦфА способствует восстановлению периферических кроветворных органов после облучения за счет индукции миграции ГСК из костного мозга и стимуляции гранулоцито- и В-лимфопоэза и устраняет 5ФУ-индуцированную лейкопению за счет быстрого восстановления клеточности гемопоэтических органов и стимуляции гранулоцитопоэза.
4. РчЦфА обладает иммуномодуляторным действием, направленным на стимуляцию врожденного и адаптивного звеньев иммунитета, активацию и пролиферацию В-лимфоцитов и усиление гуморального иммунного ответа.
5. РчЦфА обладает выраженным противоопухолевым и антиметастатическим действием, которое реализуется посредством его иммуномодулирующих свойств и изменения опухолевого микроокружения.
6. РчЦфА проявляет аддитивное противоопухолевое действие при совместном использовании с 5-фторурацилом.
7. Создана уникальная модель для изучения роли ЦфА в микроокружении ГСК и в функционировании кроветворной и иммунной систем организма, представляющая собой трансгенных мышей с индуцируемой экспрессией ЦфА в остеобластах.
8. Высокие концентрации нативного ЦфА и рчЦфА обладают выраженным эмбриотоксическим действием, вызывая тяжелые дефекты формирования скелета, а также гибель эмбрионов мыши.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендуется проведение дальнейших исследований гемопоэтических свойств ЦфА с использованием разработанной модели трансгенных животных с гиперэкспрессией данного белка в остеобластах. Целесообразно дальнейшее изучение молекулярных механизмов противоопухолевой активности рчЦфА. Рекомендуется проведение клинических исследований лекарственного средства на основе рчЦфА для оценки перспективности его практического использования в онкологии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Калинина, А.А. Роль рекомбинантного циклофилина А человека в развитии противоопухолевого иммунного ответа / А.А. Калинина, Ю.Ю. Силаева, Д.Б. Казанский, Л.М. Хромых // Acta Naturae. — 2019. — № 2(41). — С. 63 - 67.

2. Калинина, А.А. Циклофилин А: строение и функции / А.А. Калинина, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский // Успехи молекулярной онкологии. — 2017. — № 4. — С. 17 - 23.
3. Kalinina, A. Analyses of the Toxic Properties of Recombinant Human Cyclophilin A in Mice / A. Kalinina, M. Zamkova, E. Antoshina, L. Trukhanova, T. Gorkova, D. Kazansky, L. Khromykh // Journal of Immunotoxicology. — 2019. — V. 16. — №1. — P. 182-190.
4. Калинина, А.А.. Рекомбинантный человеческий циклофилин А обладает гепариноподобным действием *in vivo* и *in vitro* / А. А. Калинина, Ю. А. Морозов, Л. М. Хромых, Н. Л. Куликова, Д. Б. Казанский // Материалы всеукраинской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины и фармации». — Украинський медичний альманах. — 2012. — № 5. — С. 325-326.
5. Калинина, А.А.. Циклофилин А препятствует автоволновому процессу свертывания крови / А. А. Калинина, Ю. А. Морозов, Л. М. Хромых, Н. Л. Куликова, Д. Б. Казанский // Материалы всеукраинской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины и фармации». — Украинський медичний альманах. — 2012. — № 5. — С. 326.
6. Kalinina, A.. Cyclophilin A stimulates recovery of the hematopoietic and the immune system of the organism after radiotherapy / A. Kalinina, Y. Silaeva, D. Kazansky, L. Khromykh // Proceedings of the International conference - 15th International Congress of Immunology (ICI). — Front. Immunol. — 2013. — doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00363.
7. Khromykh, L. Recombinant human Cyclophilin A supports differentiation of granulocytes / L. Khromykh, N. Kulikova, I. Grivcova, A. Kalinina, M. Frenkel, N. Tupicin, D. Kazansky // Proceedings of the International conference - 15th International Congress of Immunology (ICI). — Front. Immunol. — 2013. — doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00286.
8. Калинина, А.А.. Антиметастатическая активность рекомбинантного циклофилина А человека / А. А. Калинина, Л. М. Хромых, И. А. Кудрявцев, Д. Б. Казанский // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Отечественные противоопухолевые препараты". — Российский Биотерапевтический журнал. — 2015. — № 1. — С. 87.
9. Калинина, А.А.. Влияние рекомбинантного циклофилина А человека на рецидив опухоли / А. А. Калинина, Л. М. Хромых, И. А. Кудрявцев, Д. Б. Казанский // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Отечественные противоопухолевые препараты". — Российский Биотерапевтический журнал. — 2015. — № 1. — С. 87.

10. Хромых, Л.М.. Противоопухолевый эффект рекомбинантного циклофилина А человека / Л. М. Хромых, Н. П. Маркова, И.С. Голубева, А. А. Калинина, И. А. Кудрявцев, Д. Б. Казанский // *Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Отечественные противоопухолевые препараты"*. — Российский Биотерапевтический журнал. — 2015. — № 1. — С. 143.
11. Калинина, А.А.. Модуляция экспрессии матриксных металлопротеиназ как возможный механизм противоопухолевого действия циклофилина А / А.А. Калинина, Л.М. Хромых, М.А. Замкова, Д.Б. Казанский // *Материалы III Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии*. — Успехи молекулярной онкологии. — 2017. — № 4. — С. 97.
12. Калинина, А.А.. Синергическое взаимодействие рекомбинантного циклофилина А человека и 5-фторурацила при химиотерапии рака шейки матки / А. А. Калинина, Л. М. Хромых, Н. П. Маркова, И. С. Голубева, Д. Б. Казанский // *Материалы V съезда физиологов СНГ V съезде биохимиков России (4 - 8 октября 2018 г., Сочи-Дагомыс)*. — *Acta Naturae*. — 2016. — № 1. — С. 120.
13. Хромых, Л.М.. Рекомбинантный циклофилин А человека - индуктор секреции белков острой фазы воспаления / Л. М. Хромых, М. А. Замкова, А. А. Калинина, Д. Б. Казанский // *Материалы V съезда физиологов СНГ V съезде биохимиков России (4 - 8 октября 2018 г., Сочи-Дагомыс)*. — *Acta Naturae*. — 2016. — № 1. — С. 148.
14. Хромых, Л.М.. Изучение циклофилина А как фактора противоопухолевого иммунного ответа / Л. М. Хромых, А. А. Калинина, Ю. Ю. Силаева, Д. Б. Казанский // *Материалы V Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2019» (20 - 23 июня, Санкт-Петербург)*. — 2019. — С. 23.
15. Khromykh, L. Cyclophilin A plays a role in the antitumor defense / L. Khromykh, A. Kalinina, N. Yavorskaya, I. Golubeva, Yu. Silaeva, D. Kazansky // *Proceedings of the International conference// World Immune Regulating Meeting VIII (18-23 March, Davos)*. — 2014. — P. 99.
16. Хромых, Л.М. Штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)Gold/pETmin-СурА - продуцент рекомбинантного циклофилина А человека / Л. М. Хромых, В. Н. Лазарев, В. А. Манувера, А. А. Калинина, Ю. Ю. Силаева, М. С. Вагида, Д. Б. Казанский // *Патент на изобретение № 2557305*. — 2013.
17. Хромых, Л.М. Противоопухолевое средство / Л. М. Хромых, А.А. Калинина, Н.П. Яворская, И.С. Голубева, Д.Б. Казанский // *Патент на изобретение № 2575572*. — 2014.
18. Хромых, Л.М.. Штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)Gold/pETCYPopti- продуцент рекомбинантного циклофилина А человека / Л.М. Хромых, А.А. Калинина, А.В. Козырь, А.В. Колесников, Ю.Ю. Силаева, Д.Б. Казанский // *Патент на изобретение № 2603283*. — 2015.