

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

*На правах рукописи*

**КАЛИНИНА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА**

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

14.01.12 – онкология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
доктор биологических наук, проф.  
**Казанский Дмитрий Борисович**

**Москва – 2019**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1. Строение ЦфА .....	19
1.2. Внутриклеточный ЦфА: локализация и функции .....	21
1.3. Секреторный ЦфА.....	22
1.3.1. Секреторный ЦфА - хемоаттрактант и провоспалительный фактор.....	23
1.3.1.1. Строение рецептора CD147.....	24
1.3.1.2. CD147 - широко распространенный трансмембранный рецептор.....	25
1.3.1.3. Хемокиновая функция ЦфА реализуется за счет взаимодействия с CD147.....	26
1.3.2. Роль ЦфА в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и при оксидативных стрессах .....	27
1.3.3. Роль ЦфА в развитии онкологических заболеваний .....	28
1.3.3.1. Возможные функции ЦфА при злокачественных трансформациях.....	30
1.3.3.1.1. Стимуляция пролиферации.....	30
1.3.3.1.2. Стимуляция метастазирования .....	31
1.3.3.1.3. Фактор адаптации.....	32
1.3.3.1.4. Роль в индукции лекарственной устойчивости.....	32
1.3.3.2. Роль CD147 в развитии онкологических заболеваний.....	32
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	35
2.1. Животные .....	35
2.2. Облучение животных.....	35
2.3. Схема введения 5-фторурацила (5ФУ) .....	36
2.4. Получение рчЦфА.....	36
2.5. Схемы введения рчЦфА .....	36
2.6. Определение количества эндоколоний .....	38
2.7. Подготовка суспензий клеток.....	38
2.8. Подсчет лейкоцитов.....	39
2.9. Антитела.....	39

2.10. Цитофлуориметрический анализ клеток .....	40
2.11. Определение числа антителообразующих клеток (АОК).....	40
2.12. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) .....	41
2.13. Реакция бласттрансформации (РБТ) .....	41
2.14. Реакция смешанной культуры лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR).....	42
2.15. Опухолевые штаммы .....	43
2.16. Оценка противоопухолевого действия рчЦфА .....	43
2.17. Оценка антиметастатического действия рчЦфА .....	44
2.18. Выделение матричной РНК (мРНК) .....	45
2.19. Синтез комплементарной ДНК (кДНК).....	46
2.20. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (Real-time ПЦР).....	47
2.21. Последовательность праймеров.....	47
2.22. Иммуногистохимическое исследование .....	48
2.23. Иммунизация животных.....	49
2.24. Оценка уровня противоопухолевого иммунного ответа <i>in vivo</i> .....	49
2.25. Создание экспрессионной генетической конструкции для трансгеноза .....	49
2.26. Создание трансгенных животных .....	50
2.27. Анализ наличия трансгена методом ПЦР .....	50
2.28. Оценка эмбриотоксического действия экспрессионной конструкции рUC18-мЦфА .....	51
2.29. Изучение эмбриотоксического действия рчЦфА .....	51
2.30. Окрашивание скелета плода ализарином по методике Доусона.....	52
2.31. Статистическая обработка данных.....	52
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	53
3.1. Оценка влияния рчЦфА на субпопуляционный состав клеток костного мозга, крови и органов иммунной системы экспериментальных животных в норме и после воздействия высоких доз облучения и цитостатиков.....	53
3.1.1. Влияние рчЦфА на субпопуляционный состав клеток костного мозга и крови мышей в норме .....	53

3.1.2. Влияние рчЦфА на субпопуляционный состав органов кроветворной и иммунной систем мышей после облучения .....	57
3.1.2.1. Влияние рчЦфА на миграцию стволовых клеток костного мозга мыши ..	57
3.1.2.2. Анализ субпопуляционного состава клеток периферической крови облученных мышей.....	59
3.1.2.3. Анализ субпопуляционного состава клеток костного мозга облученных мышей.....	62
3.1.2.4. Анализ субпопуляционного состава клеток селезенки облученных мышей.....	64
3.1.2.5. Анализ субпопуляционного состава клеток тимуса облученных мышей..	67
3.1.3. Влияние рчЦфА на субпопуляционный состав органов кроветворной и иммунной систем мышей после воздействия химиопрепарата .....	71
3.1.3.1. Анализ субпопуляционного состава клеток периферической крови мышей после введения 5ФУ.....	71
3.1.3.2. Анализ субпопуляционного состава клеток костного мозга мышей после введения 5ФУ.....	75
3.1.3.3. Анализ субпопуляционного состава клеток селезенки мышей после введения 5ФУ.....	78
3.1.3.4. Анализ субпопуляционного состава клеток тимуса мышей после введения 5ФУ .....	82
3.2. Оценка влияния рчЦфА на развитие иммунного ответа у интактных животных и у животных, подвергнутых воздействию высоких доз цитостатика или облучения.....	86
3.2.1. Оценка влияния рчЦфА на развитие иммунного ответа интактных мышей.....	86
3.2.1.1. Изучение влияния рчЦфА на развитие гуморального иммунного ответа .	86
3.2.1.2. Изучение влияния рчЦфА на развитие клеточного иммунного ответа .....	87
3.2.1.3. Оценка митогенных свойств рчЦфА.....	88
3.2.1.4. Оценка сенсibiliзирующих свойств рчЦфА .....	93

3.2.2. Оценка влияния рчЦфА на развитие иммунного ответа облученных мышей.....	96
3.2.3. Оценка влияния рчЦфА на развитие иммунного ответа мышей после воздействия 5ФУ .....	99
3.3. Оценка влияния рчЦфА на рост перевиваемых опухолевых штаммов различного гистогенеза <i>in vivo</i> .....	100
3.3.1. Оценка влияния рчЦфА на рост меланомы В16 .....	101
3.3.2. Оценка влияния рчЦфА на рост карциномы легкого Льюис (LLC).....	104
3.3.3. Оценка влияния рчЦфА на рост аденокарциномы Са 755.....	105
3.3.4. Оценка влияния рчЦфА на рост рака шейки матки РШМ-5 .....	107
3.3.5. Оценка влияния рчЦфА на метастазирование LLC.....	112
3.4. Изучение механизмов противоопухолевого действия рчЦфА.....	115
3.4.1. Влияние рчЦфА на экспрессию генов ММР .....	115
3.4.2. Влияние рчЦфА на формирование сосудов в опухоли .....	117
3.4.3. Роль рчЦфА в развитии противоопухолевого иммунного ответа .....	119
3.4.3.1. Оценка влияния рчЦфА на динамику отторжения клеток лимфомы EL-4 в мышцах линии В10.D2(R101) .....	119
3.4.3.2. Оценка влияния рчЦфА на динамику отторжения клеток лимфомы EL-4 в мышцах трансгенной линии 1D1b .....	124
3.5. Создание модели для оценки роли ЦфА как фактора микроокружения костного мозга, участвующего в дифференцировке стволовых клеток.....	127
3.5.1. Получение трансгенных мышей с повышенной экспрессией ЦфА в остеобластах.....	128
3.5.2. Оценка антенатального развития трансгенных эмбрионов .....	131
3.5.3. Создание трансгенных мышей с индуцируемой экспрессией ЦфА в остеобластах.....	132
3.5.4. Изучение эмбрио - и фетотоксического действия рчЦфА.....	134
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	140
4.1. Влияние рчЦфА на гемопоэз и иммунную систему интактных животных ...	140

4.2. Роль рчЦфА в восстановлении гемопозитической и иммунной систем организма после сублетального облучения.....	142
4.3. Роль рчЦфА в восстановлении гемопозитической и иммунной систем организма после воздействия цитостатика.....	145
4.4. Влияние рчЦфА на рост перевиваемых опухолевых штаммов <i>in vivo</i> .....	147
4.5. Механизмы противоопухолевой активности рчЦфА.....	151
4.6. Разработка трансгенной модели для изучения роли ЦфА как фактора микроокружения ГСК.....	157
4.7. Эмбриотоксическое действие рчЦфА.....	160
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	162
ВЫВОДЫ .....	166
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	167
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	170
БЛАГОДАРНОСТИ .....	194

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Химио- и радиотерапия являются традиционными и широко используемыми методами лечения онкологических заболеваний. Однако они имеют ряд тяжелых побочных действий, обусловленных повреждением здоровых тканей. Одним из наиболее серьезных и клинически значимых осложнений является миелосупрессия, которая наблюдается при умеренных и высоких дозах тотальной лучевой терапии, а также при использовании большинства химиотерапевтических препаратов: алкилирующих агентов, аналогов пиримидинов, антрациклинов, антрахинонов, нитрозомочевин, метотрексата, гидроксикарбамида и митомицина С [1]. Гематологическая токсичность проявляется в форме лейкопении, тромбоцитопении и анемии, при этом 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 [1; 2].

Основной причиной цитопении при химио- и радиотерапии является нарушение гемопоэтической системы организма, при этом может наблюдаться острое и хроническое повреждение костного мозга. Острая фаза характеризуется гибелью быстро пролиферирующих мультипотентных предшественников и клеток - предшественников различных ростков дифференцировки, а также зрелых клеточных форм. Известно, например, что одним из наиболее радиочувствительных типов клеток являются лимфоциты: ЛД50 и ЛД90 для них составляет 2 Гр и 3 Гр, соответственно [3]. Лимфопения и, как следствие, снижение инфильтрации опухоли лимфоцитами является плохим прогностическим фактором при раке молочной железы, раке прямой кишки, мультиформной глиобластоме, немелкоклеточном раке легкого и других типах опухолей [4; 5; 6; 7].

Покоящиеся гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) костного мозга являются более химио- и радиорезистентными, и за счет их самообновления и дифференцировки происходит восстановление гомеостаза кроветворной системы онкологических больных. Для ускорения этого процесса широко используются различные гемопоэтические факторы роста, такие как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМКСФ) и эритропоэтин [8; 9; 10].

Тем не менее в ряде случаев у пациентов может развиваться хроническое повреждение костного мозга. Чаще это наблюдается при использовании карбоплатина, бусульфана, кармустина и/или умеренных и высоких доз тотального облучения, реже - при однократном введении цитарабина, 5-фторурацила (5ФУ) или циклофосфамида. Однако при курсовом введении, например, 5ФУ может также возникать хроническое нарушение гемопоэза [11; 12; 13; 14; 15; 16]. Оно протекает в латентной форме и не отображается на общем анализе крови, но может привести к развитию гипопластической анемии, миелодиспластического синдрома или острого миелоидного лейкоза [1; 2].

Одной из основных причин развития хронического нарушения костного мозга считается преждевременное старение ГСК, которое возникает вследствие оксидативного стресса, индуцированного химио- и/или радиотерапией [17; 18]. Старение ГСК сопровождается снижением способности к самообновлению, что приводит к истощению их пула, а также нарушению клоногенных функций [19; 20]. Так, известно, что в селезенке летально облученных мышей образуется незначительное количество эндоколоний при трансплантации костного мозга животных, подвергнутых облучению или воздействию цитостатиков. Длительная репопуляция наблюдается при аутологичной трансплантации костного мозга пациентов, прошедших курс химио- и радиотерапии [21; 22]. Стоит особо отметить, что использование гемопоэтических ростовых факторов усугубляет хроническое повреждение костного мозга, поскольку приводит к еще большему истощению пула ГСК и замедляет процесс восстановления нормального гемопоэза [9; 10; 23].

Таким образом, 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 [24; 25; 26]. Условно можно выделить подходы пассивной и активной иммунотерапии [24].

Моноклональные антитела (mAbs, от англ. monoclonal antibodies) являются одним из наиболее часто используемых методов пассивной иммунотерапии [27]. По механизму действия выделяют несколько типов mAbs: блокирующие сигнальную трансдукцию и пролиферацию злокачественных клеток; индуцирующие комплемент-зависимую или антитело-зависимую клеточную цитотоксичность; индуцирующие апоптоз опухолевых клеток [27]. К особой группе относятся ингибиторы контрольных точек иммунитета (от англ. immune checkpoint inhibitors), например, антитела к PD-1, PD-L1 и CTLA-4, использование которых позволяет рестимулировать противоопухолевый иммунный ответ у пациента [28]. Кроме того, применяют конъюгированные mAbs для доставки химиопрепаратов или радиоактивных частиц к опухолевым клеткам [29]. Эффективность mAbs показана при лечении рака молочной железы, толстой кишки, лимфом и др. [30]. Однако их использование может вызывать такие побочные эффекты, как лихорадка, озноб, тошнота, диарея, сыпь и повышенное давление [31].

Адоптивная клеточная терапия (АСТ, от англ. adoptive cell therapy) представляет собой другой подход пассивной иммунотерапии и предполагает введение пациенту аутологичных опухолеспецифических Т-лимфоцитов [32]. В качестве источника Т-клеток для АСТ могут использоваться опухолеинфильтрирующие лимфоциты (TIL, от англ. tumor - infiltrating lymphocytes),

однако существенный недостаток данного метода заключается в длительном процессе экспансии TIL *in vitro* (2 - 3 недели) для получения достаточного количества жизнеспособных клеток [24; 32]. Генетическая модификация T-лимфоцитов T-клеточными рецепторами (ТКР) или химерными антигенными рецепторами (CAR, от англ. chimeric antigen receptors), специфичными к антигенам опухоли, позволяет значительно повысить эффективность АСТ [24; 32]. Многочисленные клинические данные подтверждают успешное использование ТКР-модифицированных T-клеток при лечении различных солидных опухолей, в частности, меланомы, синовиальной саркомы, карциномы толстой кишки [32]. В свою очередь, CAR-T-клетки применяют, в основном, для терапии различных B-клеточных лимфом [32].

Между тем, АСТ на основе генетически модифицированных T-лимфоцитов имеет одно важное ограничение, которое заключается в трудностях подбора опухолевых антигенов ввиду значительной антигенной гетерогенности солидных опухолей и быстрых темпов иммуноредактирования при прогрессии злокачественного новообразования [32]. К факторам, снижающим эффективность АСТ, относятся низкая жизнеспособность и короткое время персистенции T-клеток в организме пациента после адоптивного переноса [33; 34], а также потеря их функциональной активности в супрессорном микроокружении опухоли [35]. Более того, при АСТ может развиваться синдром цитокинового шторма или наблюдаться повреждение здоровых клеток и тканей, экспрессирующих тот же опухоль-ассоциированный антиген (on-target, off-tumor токсичность) или антиген, к которому ТКР проявляет кросс-реактивность (off-target токсичность) [36].

Методы активной иммунотерапии основаны на вакцинации (профилактической и терапевтической), использовании различных цитокинов и иммуномодуляторов [24]. Поиск новых факторов стимуляции собственной иммунной системы организма, а также разработка персонализированных методов комбинированной иммунотерапии являются перспективной областью исследований в онкологии.

## **Степень разработанности проблемы**

Ранее в нашей лаборатории было показано, что нативный циклофилин А мыши (ЦфА) [37] и рекомбинантный циклофилин А человека (рчЦфА) [38] усиливают хемотаксис ГСК у сублетально облученных мышей, а также миграцию незрелых гранулоцитов, предшественников дендритных клеток, Т- и В - лимфоцитов различных стадий дифференцировки из костного мозга интактных мышей. ЦфА также является хемоаттрактантом для нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и активированных Т-клеток периферической крови человека [39]. Исходя из этого, мы предположили, что данный белок может участвовать в восстановлении кроветворной и иммунной систем организма после различных стрессовых воздействий, в том числе после радио- и химиотерапии, а также участвовать в дифференцировке стволовых клеток костного мозга как фактор микроокружения.

С другой стороны, ЦфА является провоспалительным фактором и участвует в формировании очага воспаления [40]. ЦфА регулирует действие других хемокинов и продукцию провоспалительных цитокинов [41]. Данный белок также способствует дифференцировке и созреванию дендритных клеток [42]. Таким образом, ЦфА может являться фактором стимуляции врожденного и адаптивного иммунитета и участвовать в индукции и развитии иммунного ответа, в том числе противоопухолевого. За счет предполагаемых иммуномодулирующих свойств исследуемый белок может также влиять на опухолевое микроокружение, например, посредством формирования локального очага острого воспаления, которое является неблагоприятным для роста злокачественного новообразования [43]. Исходя из этого, мы предположили, что ЦфА обладает противоопухолевой активностью.

Указанные потенциальные функции ЦфА как фактора гемопоэза, иммуномодуляции и противоопухолевой защиты организма ранее не были изучены, однако они могут иметь большое практическое значение при разработке новых подходов терапии злокачественных новообразований.

## **Основные цели и задачи исследования**

Целью данной работы является изучение гемopoэтических, иммуномодулирующих и противоопухолевых свойств рекомбинантного циклофилина А человека.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

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.

## **Научная новизна исследования**

Впервые показано, что рчЦфА в фармакологических концентрациях не вызывает значительных изменений гомеостаза гемopoэтической системы организма.

Впервые выявлено сенсibiliзирующее действие высоких доз рчЦфА.

Впервые показано, что рчЦфА является фактором активации и пролиферации В-лимфоцитов и митогеном для активированных Т-клеток. В системе *in vivo* выявлено иммуномодулирующее действие исследуемого белка, направленное на стимуляцию гуморального и противоопухолевого иммунного ответа.

Впервые показана способность рчЦфА восстанавливать кроветворную и иммунную системы организма после воздействия высоких доз цитостатиков и облучения.

Впервые в системе *in vivo* на ряде моделей показана противоопухолевая активность рчЦфА.

Впервые в системе *in vivo* показана способность рчЦфА ингибировать постоперационное метастазирование опухоли.

Впервые в системе *in vivo* показано аддитивное действие рчЦфА и 5ФУ, приводящее к усиленному подавлению роста опухоли.

Разработана уникальная модель трансгенных мышей с индуцируемой гиперэкспрессией ЦфА в остеобластах для изучения роли данного белка как фактора микроокружения ГСК.

Впервые показано и изучено эмбриотоксическое действие высоких доз нативного ЦфА мыши и рчЦфА.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

**Теоретическая значимость работы:** полученные результаты значительно расширили представления о функциональной активности ЦфА. В рамках данной работы выявлены и изучены свойства рчЦфА как:

- гемопозитического фактора, участвующего в восстановлении кроветворной и иммунной систем организма после различных стрессовых воздействий (в частности, воздействия цитостатика и облучения);
- иммудомодулирующего фактора;
- противоопухолевого фактора;
- эмбриотоксического фактора.

**Практическая значимость работы:** полученные результаты открывают широкие 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.

### **Методология и методы исследования**

В исследованиях использовали рекомбинантный циклофилин А человека (рчЦфА) (продуцент - *E. coli*), который вводили животным подкожно или внутрибрюшинно однократно или в течение 3 - 7 дней.

Для изучения влияния рчЦфА на гомеостаз кроветворной системы интактного организма проводили подсчет миелограмм костного мозга и анализировали субпопуляционный состав клеток периферической крови мышей с использованием флуоресцентно меченых антител на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (BD, США). Для исследования иммуномодулирующего действия рчЦфА проводили оценку уровня гуморального и клеточного иммунного ответа на модельный антиген по подсчету количества антителообразующих клеток (АОК) методом Ерне и в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) соответственно. Митогенные и сенсибилизирующие свойства рчЦфА оценивали *in vitro* в реакции бласттрансформации (РБТ).

Для исследования роли рчЦфА в регенерации гемопозитической и иммунной систем организма при вторичных иммунодефицитах анализировали субпопуляционный состав клеток костного мозга, периферической крови, селезенки и тимуса сублетально облученных мышей и мышей, обработанных

цитостатиком (5-фторурацилом, 5ФУ), методом проточной цитофлуориметрии. Влияние рчЦфА на восстановление функциональной активности иммунной системы животных со вторичным иммунодефицитом оценивали в системах *in vivo* методом Эрне и по реакции ГЗТ и *in vitro* в РБТ и смешанной культуре 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 [44].

Изучение сочетанного действия рчЦфА и 5ФУ при противоопухолевой терапии проводили *in vivo* на модели перевиваемого рака шейки матки РШМ-5.

Оценку антиметастатического действия рчЦфА проводили на модели *in vivo* постоперационного метастазирования LLC.

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 ( $K^dI-A^dI-E^dD^b$ ). Динамику элиминации опухолевых клеток и субпопуляционный состав клеток брюшной полости и селезенки иммунных животных оценивали методом проточной цитофлуориметрии.

Для создания генетической конструкции для получения трансгенных мышей полноразмерную кДНК ЦфА мыши (мЦфА) клонировали в экспрессионный вектор рUC18. Модификацию генетической конструкции рUC18-мЦфА проводили путем вставки последовательности СТОП - кассеты, фланкированной loxP - сайтами, между первым интроном промотора и последовательностью кДНК мЦфА. Первичных трансгенных мышей получали

методом микроинъекции экспрессионной конструкций рUC18-мЦфА или рUC18 - STOP - мЦфА в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. Наличие трансгена в геноме животных подтверждали методом ПЦР. Для получения чистой трансгенной линии проводили 6 возвратных скрещиваний первичных трансгенных мышей с мышами инбредной линии C57BL/6.

Эмбриотоксические свойства рчЦфА изучали на беременных самках F1(CBA/Lac x C57BL/6), которым вводили белок в доимплантационный период, период органо- или фетогенеза. Морфологические пороки развития эмбрионов оценивали визуально при помощи бинокля. Для изучения влияния рчЦфА на процессы оссификации скелеты эмбрионов окрашивали ализариновым красным по методике Доусона и анализировали зоны оссификации при помощи стереомикроскопа.

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

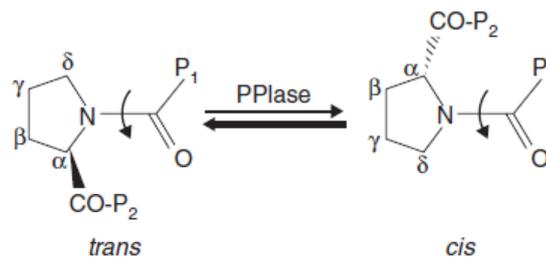
1. РчЦфА способствует восстановлению кроветворной и иммунной систем организма после сублетального облучения и воздействия цитостатика (5ФУ).
2. РчЦфА обладает иммуномодулирующими свойствами, направленными на стимуляцию врожденного и адаптивного иммунитета.
3. РчЦфА обладает противоопухолевым действием 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.

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

Работа выполнена в соответствии с принятыми стандартами молекулярно-биологических исследований. Экспериментальные группы состояли с 6 - 10 животных. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Различия признавали значимыми при допустимых в медико-биологических исследованиях 5% уровне значимости ( $p \leq 0,05$ ). Обсуждение результатов проведено с учетом современных литературных данных. Научные положения и выводы, представленные в диссертационной работе, подтверждены фактическим материалом и основаны на статистически достоверных данных. Полученные в рамках данной диссертационной работы результаты защищены тремя патентами РФ. Результаты исследований были представлены на конференциях: XV Международном конгрессе иммунологов (22-27 августа 2013, 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).

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

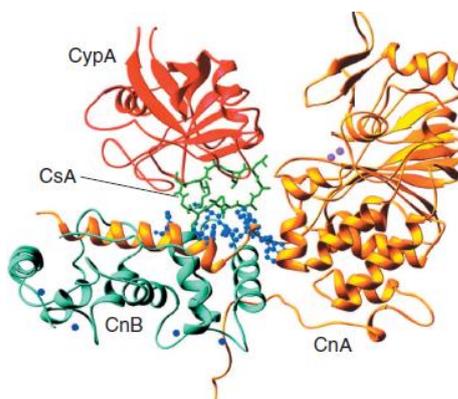
Циклофилин А (ЦфА) – наиболее распространенный белок семейства циклофилинов, которые являются эволюционно древними, консервативными белками и обнаруживаются у млекопитающих, насекомых, растений, грибов и бактерий. Все циклофилины обладают пептидил-пролил цис- транс- изомеразной активностью (рис. 1), которая играет важную роль в фолдинге и сборке мультидоменных белков [45], внутриклеточном транспорте белков, поддержании стабильности мультибелковых комплексов, регуляции транскрипции и клеточного цикла, а также в передаче сигнала от T- клеточного рецептора [46] и клеточной дифференцировке [47].



**Рисунок 1** - Пептидил- пролил- изомеразная активность циклофилинов [45]. Схематичное изображение *транс* - и *цис*- изомеров амидной связи между пролином и другой аминокислотой (P1) белка при катализе циклофилином (PPIase) процесса изомеризации. Атомы углерода пролина указаны греческими буквами; P2 – третья аминокислота с другой стороны пролина [45]

Мощным толчком для изучения ЦфА послужило исследование механизмов действия циклоспорина А (ЦсА). Данный циклический пептид, синтезируемый грибом *Tolypocladium inflatum*, широко используется в клинической практике как важнейший компонент иммуносупрессивной терапии при трансплантации органов. Исследования показали, что ЦфА является внутриклеточным лигандом ЦсА [48], иммуносупрессивное действие которого реализуется за счет связывания комплекса ЦсА - ЦфА с кальцийнейрином (кальций - кальмодулин - зависимая

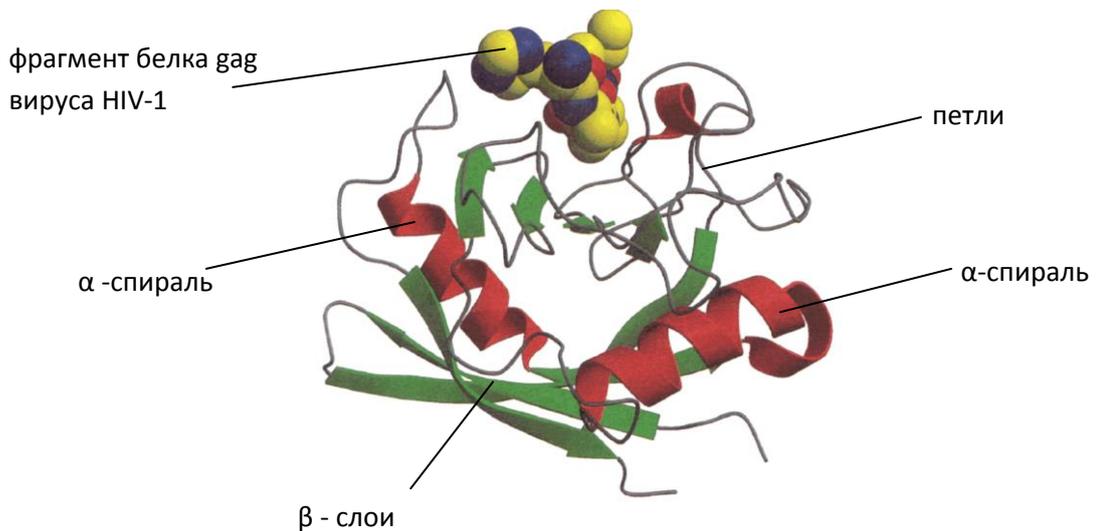
серин/треонин протеинфосфатаза) (рис. 2). В результате отмены действия кальцийнейрина блокируется переход ядерного фактора активированных Т-лимфоцитов (NFAT) из цитоплазмы в ядро, что препятствует транскрипции генов, кодирующих различные цитокины, в частности интерлейкин – 2 [45], при дефиците которого не развивается Т - клеточный иммунный ответ.



**Рисунок 2** - Структура комплекса циклоспорин А (CsA) - циклофилин А (CypA) - кальцийнейрин (Cn) [45] Комплекс циклоспорин А- циклофилин А лежит на спирали каталитической субъединицы кальцийнейрина (CnA), которая связана со своей регуляторной субъединицей (CnB). Обе субъединицы формируют гидрофобный желоб, уникальный для кальцийнейрина, с которым комплекс циклоспорин А - циклофилин А связывается с высокой специфичностью [45]

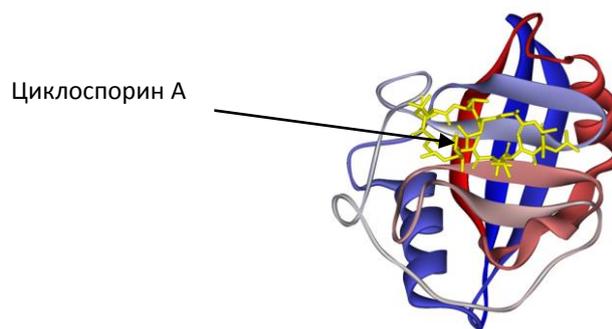
### 1.1. Строение ЦфА

ЦфА состоит из 165 аминокислот, и структурно данный белок образован восемью анти - параллельными  $\beta$ -слоями и двумя  $\alpha$ -спиралями (рис. 3). Неглубокий карман, образованный аминокислотными остатками R55, F60, M61, Q63, F113, W121, L122 и H126, составляет активный сайт пептидил- пролил - изомеразы. При этом остаток R55 является главным каталитическим центром, так как точечная мутация R55A приводит к полной потере изомеразной активности ЦфА [49; 50].



**Рисунок 3** - Кристаллическая структура циклофилина А [51]:  $\alpha$ -спирали показаны красным цветом,  $\beta$ -слои – зеленым, петли – серым. Желтым цветом показан фрагмент белка gag вируса HIV-1, с которым способен соединяться циклофилин А [51]

Зона связывания ЦфА с ЦсА представляет собой компактный гидрофобный кор, сформированный петлей от Lys118 до His126 и четырьмя  $\beta$ -слоями ( $\beta 3$  -  $\beta 6$ ). Эта зона совпадает с каталитическим центром ЦфА, поскольку ЦсА связывается с данным белком через остатки R55, F60, M61, Q63, G72, A101, N102, A103, Q111, F113, W121, L122 и H126 [49] (рис. 4).



**Рисунок 4** - Структура комплекса циклофилин А - циклоспорин А [Protein Data Bank]

## 1.2. Внутриклеточный ЦфА: локализация и функции

Цитозольный ЦфА присутствует во всех тканях млекопитающих (табл. 1). В паренхиматозных органах данный белок содержится в основном в клетках паренхимы, а не стромы. Исключением являются почки, где ЦфА продуцируется главным образом в эпителиальных клетках проксимальных канальцев [52]. Большое количество ЦфА обнаруживается в эритроцитах селезенки и миелобластах [53]. Самый высокий уровень данного белка отмечается в головном мозге, в частности в коре головного мозга и гиппокампе, при этом в нейронах, особенно в клетках Пуркинье, его содержится больше, чем в клетках глии [52; 53].

**Таблица 1** - Содержание ЦфА в различных тканях человека [52]

Орган	Содержание ЦфА, мкг/мг общего белка*
Кора головного мозга	2,8 ± 0,4
Жировая ткань	1,1 ± 0,2
Сердце	1,1 ± 0,2
Кишечник	1,3 ± 0,3
Почки	1,3 ± 0,4
Печень	0,9 ± 0,2
Легкие	0,8 ± 0,1
Лимфатические узлы	1,4 ± 0,4
Поджелудочная железа	1,5 ± 0,2
Околоушная железа	1,7 ± 0,3
Кожа	0,8 ± 0,1
Селезенка	1,5 ± 0,3
Тимус	1,6 ± 0,4

\*Среднее значение ± стандартное отклонение, полученное при анализе четырех экстрактов одного органа (n=4)

Помимо общих для всех членов семейства функций ЦфА обладает антиоксидантными свойствами. Он защищает кардиомиоциты от гибели при реперфузии, вследствие которой происходит накопление супероксидного радикала и перекиси водорода [54; 55]. Данный процесс осуществляется за счет связывания ЦфА с тиол-специфичным антиоксидантом Aop1, что приводит к усилению ферментативной активности последнего [54; 56]. Являясь шапероном, ЦфА участвует в ослаблении токсического эффекта белковых агрегатов, которые могут обуславливать гибель нейронов после оксидативного стресса, в том числе после ишемии [57].

ЦфА также регулирует проведение внутриклеточного сигнала в Т-клетках, в норме ингибируя действие нерецепторной тирозинкиназы Itk, необходимой для активации Т-хелперов 2 типа, путем взаимодействия с ее регуляторным пролиновым остатком. Это было показано на нокаутных по ЦфА мышах (Pria-/-), которые оказались предрасположены к спонтанному развитию аллергии [46].

### **1.3. Секреторный ЦфА**

В 1992 году впервые было показано, что при стимуляции липополисахаридом макрофаги мыши способны секретировать ЦфА [58]. Дальнейшие исследования установили, что данный белок может секретироваться клетками различных тканей в ответ на инфекцию и при оксидативном стрессе, в том числе в условиях гипоксии [55; 58; 59]. ЦфА не содержит сигнальной последовательности для транспорта в аппарат Гольджи, поэтому его секреция происходит неклассическими путями, в том числе через везикулы [60].

Концентрация ЦфА в цельной крови здорового человека составляет 3,9 мкг/мл; при этом секреторная форма белка составляет 0,6 мкг/мл, остальное его содержание приходится на цитозольную форму, находящуюся в клетках крови (табл. 2) [52].

**Таблица 2** - Содержание циклофилина А в крови здорового человека [52]

	Содержание ЦфА, мкг/мл
Цельная кровь	3,9 ± 0,5
Плазма крови	0,6 ± 0,1
Форменные элементы крови:	
Эритроциты	6,6 ± 0,8
Тромбоциты	0,3 ± 0,1
Лимфоциты	1,5 ± 0,3

### ***1.3.1. Секреторный ЦфА - хемоаттрактант и провоспалительный фактор***

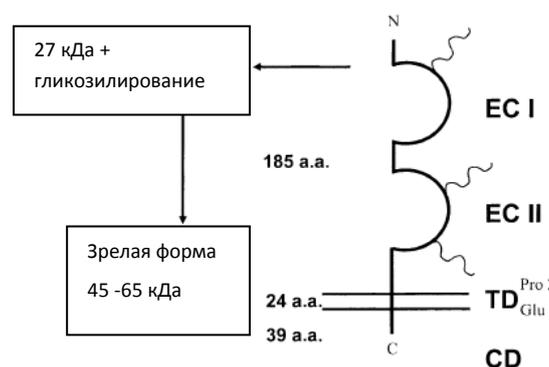
Одна из наиболее важных функций секреторного ЦфА заключается в его роли хемоаттрактанта и провоспалительного фактора. Данный белок стимулирует миграцию стволовых клеток, а также предшественников дендритных клеток, гранулоцитов и Т- и В-клеток из костного мозга на периферию [37]. Он способствует дифференцировке и созреванию дендритных клеток за счет повышения экспрессии поверхностных маркеров CD11b и CD11c. ЦфА также усиливает захват и презентацию антигенов незрелыми дендритными клетками, участвуя таким образом в развитии адаптивного иммунного ответа [42].

Исследования *in vitro* показали, что данный белок вызывает хемотаксис нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека. Он также является хемоаттрактантом для эозинофилов и стимулирует их дегрануляцию (выброс пероксидазы) [39]. Кроме того, ЦфА индуцирует хемотаксис активированных Т-клеток, в особенности Т-хелперов 2 типа [61; 62]. Таким образом формируется очаг воспаления, в котором происходит локальное повышение уровня секреторного ЦфА. Это, в свою очередь, усугубляет воспалительный процесс посредством усиления инфильтрации тканей клетками иммунной системы, что было показано, например, при аллергической астме [62], ревматоидном артрите [63], сепсисе [64].

Хемокиновая функция ЦфА реализуется посредством взаимодействия с его основным рецептором CD147, известным также как внеклеточный индуктор матриксных металлопротеиназ (EMMPRIN).

### ***1.3.1.1. Строение рецептора CD147***

CD147 является трансмембранным гликопротеином I типа и состоит из эктодомена, трансмембранного и цитоплазматического домена (рис. 5). Во внеклеточном регионе (эктодоме), представляющем собой два иммуноглобулиновых домена, имеются три сайта гликозилирования, где происходит присоединение гликанов размером от 5 до 35 кДа, в результате чего завершается формирование рецептора. Зрелая форма CD147 имеет молекулярную массу 45 - 65 кДа. Высококонсервативный трансмембранный домен состоит из гидрофобных аминокислот и имеет в центре одну заряженную аминокислоту – глутаминовую кислоту (Glu218). Эта структурная особенность позволяет CD147 формировать комплексы с другими трансмембранными белками [65; 66]. Другая важная аминокислота трансмембранного домена - пролин (Pro211) - обеспечивает связывание молекулы рецептора с внутриклеточным циклофилином 60, посредством которого осуществляется транспорт CD147 из эндоплазматического ретикулума к клеточной мембране [67; 68]. Кроме того, Pro211 может частично выходить на поверхность клеточной мембраны и служить активным сайтом для связывания ЦфА [69; 70]. В результате этого взаимодействия происходит изомеризация рецептора CD147 за счет стабилизации цис - связи Trp210-Pro211, а это конформационное изменение, в свою очередь, индуцирует передачу внутриклеточного сигнала [69; 70]. Цитоплазматический домен CD147 необходим для связывания с монокарбоксилатным транспортером 1 [71].



**Рисунок 5** - Схематичное строение молекулы CD147 [71]. **EC I** – первый иммуноглобулиновый домен; **EC II** - второй иммуноглобулиновый домен; **TD** - трансмембранный домен; **CD** - цитоплазматический домен; в виде спиралей показаны три олигосахарида, связанных с N-терминальным концом молекулы; **а.а.** – аминокислотные остатки, Pro - пролин, Glu - глутамин [71]

Молекулы CD147 способны образовывать гомо - олигомеры на плазматической мембране через N-терминальный иммуноглобулиновый домен (**Рис. 5**, EC I), что, вероятно, приводит к повышению общей avidности данного рецептора. Этот же иммуноглобулиновый домен участвует в индукции секреции матриксных металлопротеиназ (MMP) [72].

### ***1.3.1.2. CD147 - широко распространенный трансмембранный рецептор***

CD147 экспрессируется практически на всех типах клеток, в том числе на гемопоэтических клетках, эпителиальных и эндотелиальных клетках, фибробластах, тромбоцитах, лейкоцитах [65] и эритроцитах [73], и имеет важное значение для их нормального функционирования. Интересно отметить, что практически все тимоциты несут на своей поверхности данный рецептор, что может указывать на необходимость CD147 в развитии Т-клеток [74]. Кроме того, высокий уровень экспрессии CD147 на активированных Т- и В- клетках (бластах) [74] обуславливает их чувствительность к секреторному ЦфА, что имеет важное значение при развитии различных воспалительных процессов.

CD147 также экспрессируется на нервных клетках различных отделов центральной нервной системы, клетках серого вещества спинного мозга и на эндотелиальных клетках капилляров головного мозга [75].

### ***1.3.1.3. Хемокиновая функция ЦфА реализуется за счет взаимодействия с CD147***

Как было сказано выше, именно за счет связывания с рецептором CD147 реализуется хемокиновая активность ЦфА. Так, на моделях астмы [62], синдрома острого повреждения легких [76] и ревматоидного артрита [77] было показано, что подавление этого взаимодействия анти-CD147 антителами или ЦсА приводит к значительному подавлению миграции клеток иммунной системы в очаг воспаления.

Стоит особо отметить, что при воспалительном процессе секреторный ЦфА по аутокринно-паракринному механизму стимулирует экспрессию рецептора CD147 на поверхности иммунных клеток, привлеченных в очаг воспаления. Например, при ревматоидном артрите наблюдается локальное и системное повышение уровня секреторного ЦфА [76], который стимулирует экспрессию CD147 на гранулоцитах, моноцитах/макрофагах и нейтрофилах. Это, в свою очередь, приводит к ЦфА-опосредованной миграции данных типов клеток в синовиальную жидкость, где происходит усиление экспрессии CD147 на их поверхности [40; 77; 78]. При этом взаимодействие ЦфА со своим рецептором приводит к продукции MMP9 моноцитами/макрофагами и усилению адгезии этих клеток к внеклеточному матриксу, что может способствовать разрушению хрящевой и костной ткани [40].

Экспрессия CD147 повышается также на поверхности активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, например, при астме. При этом уровень экспрессии данного рецептора на CD4<sup>+</sup> Т-клетках, инфильтрирующих легкие, становится значительно ниже, чем на циркулирующих в крови CD4<sup>+</sup> Т-клетках. Вероятно, CD147 играет наиболее важную роль именно на стадии привлечения этих клеток в очаг воспаления [62].

Интересно, что хемокиновая активность ЦфА не связана с его пептидил-пролил-изомеразной активностью. ЦфА способен взаимодействовать непосредственно с эктодоменом CD147 (рис. 5), и точечные мутации белка в этой зоне связывания (H70A, T107A и R69A) значительно снижают его хемоаттрактивные свойства, не оказывая влияния на изомеразную активность. Кроме того, мутантная форма ЦфА - R55A, не обладающая изомеразной активностью, способна индуцировать хемотаксис в той же мере, что и нативный белок [49].

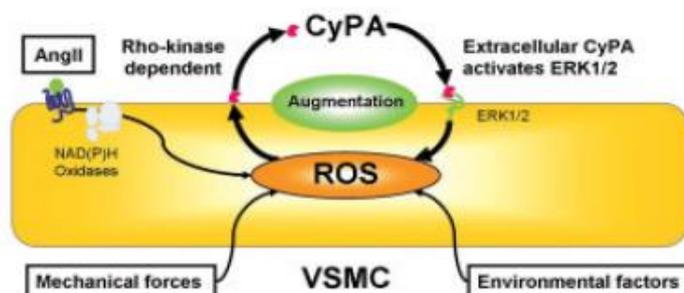
### ***1.3.2. Роль ЦфА в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и при оксидативных стрессах***

Помимо роли в развитии воспалительных и аутоиммунных процессов ЦфА также участвует в патогенезе различных сердечно-сосудистых заболеваний. Так, у мышей - нокауты по данному белку не происходит структурной перестройки стенок сосудов, не наблюдается повреждение тканей при ишемии/реперфузии и не развивается аневризма аорты, атеросклероз, гипертрофия сердца [40]. Функции ЦфА в развитии данных патологий также опосредованы взаимодействием с рецептором CD147, повышение экспрессии которого наблюдается в тканях, например, при сердечной недостаточности, ишемии миокарда и атеросклерозе [65].

При различных сердечно-сосудистых заболеваниях наблюдается повышенная продукция активных форм кислорода (ROS, от англ. reactive oxygen species), что приводит к усиленной секреции ЦфА [79; 80]. Действуя по аутокринно-паракринному механизму, данный белок оказывает регенеративное действие, стимулируя пролиферацию и ингибируя апоптоз клеток гладкой мускулатуры сосудов за счет активации сигнальных путей ERK 1/2, Akt и JAK/STAT [79].

Аналогичным образом ЦфА защищает нейроны от оксидативного стресса и ишемии: его взаимодействие с CD147 приводит к активации сигнальных путей ERK 1/2, что, в свою очередь, инициирует транскрипцию анти-апоптотических

белков Vcl-2 и Bag-1 [50; 81]. С другой стороны, активация ERK 1/2 может стимулировать продукцию ROS (рис. 6).



**Рисунок 6** - ROS-индуцированная секреция циклофилина А усиливает продукцию ROS [80]. Индукторы ROS, такие как ангиотензин II (AngII), механические повреждения и другие факторы (например, гипоксия), стимулируют секрецию ЦфА клетками гладкой мускулатуры сосудов. Секреторный ЦфА активирует ERK 1/2, что приводит к усилению продукции ROS [80].

Эксперименты *in vitro* показали, что при оксидативном стрессе ЦфА проявляет себя как бифазный медиатор. При низких концентрациях он способен стимулировать пролиферацию, миграцию, инвазию эндотелиальных клеток, а также формирование тубулярных структур, в частности, за счет индукции секреции активной MMP2, участвующей в клеточной миграции и ангиогенезе. Однако при высоких концентрациях ЦфА ингибирует миграцию и индуцирует гибель клеток эндотелия [82; 83].

### ***1.3.3. Роль ЦфА в развитии онкологических заболеваний***

Анализ профиля экспрессии ЦфА в здоровых и опухолевых тканях показал, что при злокачественной трансформации практически во всех изученных тканях достоверно увеличивается экспрессия данного белка на уровне мРНК (табл. 3) [59].

**Таблица 3** - Уровень мРНК ЦфА в различных органах и тканях в норме и при опухолевой трансформации [59]

Ткань/орган	Количество транскриптов ЦфА на 200,000 транскриптов (M ± SD)	
	Нормальная ткань	Опухолевая ткань
Головной мозг	181 ± 28	270 ± 14
Молочная железа	229 ± 16	319 ± 22
Толстый кишечник	87 ± 23	234 ± 2
Почки	195 ± 98	540
Печень	156	943
Лимфатический узел	316 ± 156	612 ± 51
Мышцы	23 ± 5	332
Поджелудочная железа	92	140 ± 4
Брюшина	134	258
Сетчатка глаза	188 ± 34	452
Кожа	236 ± 26	423 ± 121
Желудок	181 ± 61	353 ± 25
Щитовидная железа	351	401
Предстательная железа	352 ± 110	410 ± 69

Имеющиеся на сегодняшний день данные показывают, что продукция ЦфА повышается при различных видах рака, в том числе при раке легких (особенно немелкоклеточном раке легкого), печени, аденокарциноме поджелудочной железы, карциноме эндометрия, плоскоклеточном раке пищевода и меланоме [59]. Уровень ЦфА в клеточных линиях хронического миелобластного лейкоза (KYO.1 (хроническая фаза), LAMA 84 (фаза акселерации) и K562 (бластный криз)) в 10, 4,5 и 4 раза соответственно превышает содержание данного белка в мононуклеарах периферической крови здорового человека [84].

Повышение экспрессии ЦфА при некоторых типах опухолей рассматривается как плохой прогностический фактор, поскольку данный белок

может участвовать в прогрессии злокачественных новообразований посредством различных механизмов. При этом некоторые химиотерапевтические препараты, например, 5-аза-2-дезоксцитидин, целекоксиб и 5-фторурацил, способны подавлять экспрессию ЦфА [85; 86; 87]. С другой стороны, отмечена отрицательная корреляция между продукцией циклофилина А и инвазивностью и метастазированием клеток различных форм аденокарциномы желудка [88].

### ***1.3.3.1. Возможные функции ЦфА при злокачественных трансформациях***

#### ***1.3.3.1.1. Стимуляция пролиферации***

ЦфА стимулирует клеточную пролиферацию, в частности при мелкоклеточном раке легких [89], аденокарциноме поджелудочной железы [90] и гепатоцеллюлярной карциноме [91]. Это происходит за счет индукции экспрессии циклинов D1, Cdk4 и, таким образом, перехода клеточного цикла из фазы G1 в фазу S [92]. Было показано, что подавление экспрессии внутриклеточного ЦфА малыми интерферирующими РНК (siRNA) приводит к аресту клеток карциномы эндометрия в фазе G0/G1 [93].

Митогенная активность ЦфА опосредована взаимодействием с CD147, что продемонстрировали эксперименты *in vitro* на линии клеток рака поджелудочной железы Pan-1: взаимодействие ЦфА со своим рецептором активировало сигнальные пути ERK1/2 и p38, а также стимулировало продукцию этими клетками двух важных цитокинов - интерлейкина - 5 и интерлейкина - 17. При этом предварительная обработка клеток линии Pan-1 анти - CD147 антителами приводила к значительному подавлению их пролиферации под действием экзогенного ЦфА [90].

Подавление экспрессии ЦфА в опухолевых клетках посредством siRNA значительно замедляет рост опухолей *in vivo*, что было показано на клеточных линиях немелкоклеточного рака легких 5M2 и LC-103H и карциномы эндометрия HEC-1-B при трансплантации мышам SCID (тяжелый комбинированный

иммунодефицит, от англ. severe combined immunodeficiency) [94] и nude [93] соответственно.

Стоит отметить, что в способности ЦфА стимулировать пролиферацию опухолевых клеток важную роль играет его пептидил-пролил-изомеразная активность. R55A мутантная форма, не обладающая этой функцией, не способна индуцировать пролиферацию *in vitro* клеточной линии мелкоклеточного рака легкого H446. Инкубация с ЦсА также ингибирует ЦфА-индуцированную пролиферацию этих клеток [89].

### ***1.3.3.1.2. Стимуляция метастазирования***

ЦфА может стимулировать миграцию опухолевых клеток и их метастазирование. Так, например, уровень экспрессии данного белка в метастазирующей меланоме выше по сравнению с первичной опухолью [95]. Подавление экспрессии ЦфА посредством siRNA или блокирование его изомеразной активности ЦсА приводит к снижению миграции клеток линии остеосаркомы U2OS *in vitro*. Аналогичным образом ЦсА подавляет *in vitro* миграцию и инвазию высокометастатической линии рака молочной железы ER-MDA-231. Кроме того, *in vivo* обработка ЦсА приводит к значительному некрозу первичного опухолевого узла и полному отсутствию метастазов у мышей с ксенографтами рака молочной железы [59]. Стабильная экспрессия ЦфА в клетках линии SK-Nер1 стимулирует их подвижность, хемотаксис и метастазирование в моделях *in vivo*. Было показано, что данный белок стимулирует метастазирование гепатоклеточной карциномы за счет повышения экспрессии MMP3 и MMP9 [96]. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали участие ЦфА в эпителиально-мезенхимальном переходе и метастазировании немелкоклеточного рака легкого за счет активации p38 MAP-киназного каскада и позитивной регуляции экспрессии  $\beta$ -катенина, виментина, Snail и MMP9 [97; 98]. Стоит также отметить, что ЦфА регулирует сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин в клетках глиомы посредством связывания с  $\beta$ -катенином и, как следствие, увеличения транскрипционной активности TCF4. Это способствует поддержанию

стволовости, потенциала к самообновлению и радиорезистентности стволовых клеток глиомы [99].

#### ***1.3.3.1.3. Фактор адаптации***

Наблюдающаяся при росте и развитии солидной опухоли гипоксия индуцирует продукцию ЦфА не только злокачественными клетками [100], но и эндотелиальными клетками и клетками гладкой мускулатуры сосудов, в результате чего происходит активация и пролиферация этих клеток. Считается, что таким образом ЦфА способен стимулировать ангиогенез [59].

#### ***1.3.3.1.4. Роль в индукции лекарственной устойчивости***

Повышенная продукция ЦфА в опухолевых клетках стимулирует экспрессию генов, кодирующих интерлейкин - 6, белки множественной лекарственной устойчивости (2 и 3) и глутатион - трансферазу зета 1, которые участвуют в формировании лекарственной устойчивости [40]. ЦфА также стимулирует экспрессию АТФ - связанных кассетных транспортеров (ABC - транспортеров), которые уменьшают накопление лекарственного средства внутри клетки [101]. Эксперименты *in vitro* показали, что клетки печени SK-Nep-1-CypA, стабильно экспрессирующие ЦфА, обладают повышенной устойчивостью к доксорубину и винкристину.

Проонкогенные функции ЦфА могут проявляться в том числе за счет взаимодействия с рецептором CD147, что продемонстрировано, например, при раке поджелудочной железы [90] и раке молочной железы [102].

#### ***1.3.3.2. Роль CD147 в развитии онкологических заболеваний***

Повышенная экспрессия CD147 является маркером для рака предстательной железы, печени, желудка [70], мочевого пузыря, кожи, рака легкого, рака молочной железы и лимфомы [72]. Уровень экспрессии CD147 положительно коррелирует с уровнем злокачественности таких опухолей, как рак молочной железы, рак яичников, глиома, гепатома, плоскоклеточный рак кожи и меланома

[72; 103]. CD147 участвует в регуляции клеточной пролиферации, апоптоза и оксидативного стресса, в частности, при злокачественной меланоме [103].

CD147 экспрессируется в первичных опухолях и клетках микрометастазов, на основании чего предположили, что данный рецептор участвует в прогрессии и ранних этапах метастазирования опухоли. Наиболее яркое подтверждение эта гипотеза получила в экспериментах *in vivo* на *nude* мышах: трансфекция клеток рака молочной железы кДНК CD147 приводила к значительному усилению роста данной опухоли [72]. Иммуногистохимические исследования показали, что CD147 экспрессируется преимущественно на периферии кластеров прорастающих опухолевых клеток, что может свидетельствовать о участии данного рецептора в инвазии опухоли. Действительно, связывание CD147 блокирующими антителами приводит к существенному подавлению инвазии клеток меланомы и плоскоклеточной карциномы через искусственную базальную мембрану [72].

Взаимодействие опухолевых клеток со стромой через рецептор CD147 приводит к экспрессии стромальными клетками MMP, которые представляют собой секретируемые или мембранно - связанные  $Zn^{2+}$  - зависимые эндопептидазы. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что существует положительная корреляция между уровнем экспрессии и активностью MMP и степенью злокачественности опухоли [104; 105].

MMP участвуют в нескольких стадиях развития злокачественных новообразований. Во-первых, они регулируют рост опухоли за счет генерации ростовых сигналов (например, трансформирующего ростового фактора - альфа ( $TGF\alpha$ ), инсулиноподобного фактора роста (IGF)) посредством расщепления их неактивных предшественников. Влияя на состав внеклеточного матрикса, MMP косвенно регулируют поступление ростовых сигналов через интегрины. Кроме того, MMP (например, MMP7 и MMP11) обладают антиапоптотическим действием. Однако стоит отметить, что некоторые MMP способствуют подавлению роста опухоли за счет активации  $TGF\beta$  или генерации про-апоптотических факторов, таких как лиганд к рецептору Fas (FasL) или фактор некроза опухоли альфа ( $TNF\alpha$ ). Во-вторых, MMP участвуют в инвазии и

метастазировании опухоли посредством разрушения компонентов внеклеточного матрикса и базальной мембраны, что способствует проникновению опухолевых клеток в кровеносные сосуды [105]. В-третьих, MMP регулируют ангиогенез опухоли также за счет разрушения внеклеточного матрикса, что позволяет клеткам эндотелия проникать в строму опухоли [105].

Повышение экспрессии CD147 на поверхности опухолевых клеток приводит к синтезу фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в этих клетках. В дальнейшем CD147- опосредованное взаимодействие опухолевых клеток со стромой стимулирует усиленную продукцию VEGF стромальными клетками. И, наконец, индуцированная CD147 экспрессия MMP приводит к накоплению активных про-ангиогенных факторов во внеклеточном матриксе [106].

В представленных источниках описаны функции ЦфА в патологических процессах, выявленные на стадии выраженного течения различных заболеваний. Однако, роль секреторного ЦфА в норме и на начальных этапах патогенеза на сегодняшний день мало изучена. Между тем, способность ЦфА стимулировать развитие иммунного ответа по пути Т-хелперов 1 типа, его взаимодействие с такими цитокинами, как интерферон гамма ( $IFN\gamma$ ),  $TNF\alpha$  и т.п. [41], могут указывать на наличие у данного белка иммуномодулирующих свойств. Таким образом, дальнейшее изучение механизмов действия ЦфА, его рецепторов и функций имеет не только важное фундаментальное значение, но может привести к появлению новых подходов в терапии различных заболеваний, в том числе онкологических.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Животные

В работе использовали мышей линии C57BL/6 ( $K^bI-A^bD^b$ ), FVB ( $K^qI-A^qI-E^qD^q$ ), B10.D2(R101) ( $K^dI-A^dI-E^dD^b$ ) и гибридов F1(C57BL/6 x DBA/2), которых получали из экспериментально-биологической лаборатории НИИ ЭДИТО ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России. Также в исследованиях использовали мышей линии CBA/Lac и гибридов F1(CBA/Lac x C57BL/6), которых получали из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Мышей трансгенной линии 1D1b, выведенных на генетической основе мышей линии B10.D2(R101) ( $K^dI-A^dI-E^dD^b$ ) в лаборатории механизмов регуляции иммунитета НИИ Канцерогенеза ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина", получали из собственного разведения лаборатории [107]. Мыши трансгенной линии Osx-Cre [108] были любезно предоставлены Department of Clinical Pathobiochemistry, Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Technische Universität (Дрезден, Германия). В работе использовали самок 6-8-недельного возраста массой 20-22 г. Для создания трансгенных мышей в качестве доноров яйцеклеток использовали неполовозрелых самок мышей линии C57BL/6 и гибридов F1(CBA/Lac x C57BL/6) весом 12-13 г, а также половозрелых самцов и самок данных линий весом 16-18 г. Мышей содержали в стандартных условиях. Для проведения острых экспериментов животных умерщвляли методом цервикальной дислокации. Экспериментальные группы состояли из 6 - 10 животных.

### 2.2. Облучение животных

Мышей линии C57BL/6 облучали в дозе 4,5 Гр, мышей линии CBA/Lac облучали в дозе 2,5 или 6,5 Гр при помощи терапевтического аппарата "Агат-Р" (Россия), содержащего источник  $\gamma$ -излучения  $Co^{60}$  с начальной мощностью 1,9 x  $10^{14}$  Бк.

### 2.3. Схема введения 5-фторурацила (5ФУ)

Мышей линии C57BL/6 и CBA/Lac обрабатывали 5ФУ (Фторурацил-Лэнс, ООО "Лэнс-Фарм", Россия) путем двукратного внутрибрюшинного введения 40,0 мг/кг препарата, разведенного в стерильной деионизированной воде, в объеме 200 мкл с интервалов в 96 ч (суммарная доза 5ФУ составляла 80,0 мг/кг).

### 2.4. Получение рчЦфА

Рекомбинантный белок выделяли из бактериальной биомассы *Escherichia coli* BL21(DE3)Gold, трансформированной плазмидой pETCYPori, содержащей кДНК ЦфА человека, с использованием фракционирования сульфатом аммония [38]. Очистку проводили при помощи тандемной анионообменной хроматографии на колонках DEAE- и Q-Sepharose (GE Healthcare, США). РчЦфА использовали в виде раствора в натрий-калий фосфатно-солевом буфере (PBS; pH 7,3) с чистотой более 95% по данным электрофореза. По результатам LAL-теста [109] наличие эндотоксина (ЛПС) в образцах рчЦфА не превышало 0,038 нг на 1 мг белка. По результатам масс-спектрометрического анализа аминокислотная последовательность рекомбинантного белка полностью соответствовала аминокислотной последовательности нативного ЦфА человека [38]. Изомеразную активность рчЦфА определяли в парном тесте с использованием химотрипсина и его субстрата N-сукцинил-Ала-Ала-Про-Фе-П-нитроанилида (Sigma, США) [37]. Также подтверждено, что специфическая биологическая активность рчЦфА (способность стимулировать миграцию гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга на периферию) соответствует биологической активности нативного ЦфА мыши [37].

### 2.5. Схемы введения рчЦфА

В исследованиях, где не указано иное, проводили подкожные инъекции рчЦфА в дозе 5,0 мг/кг (100 мкг/мышь, условно принято за терапевтическую дозу, 1 ТД). Интактным мышам F1(CBA/Lac x C57BL/6) вводили рчЦфА в течение 7 дней в дозах 0,1; 1,0 и 3,0 мг/мышь (5,0; 50,0 и 150,0 мг/кг соответственно).

Облученным мышам линии C57BL/6 и CBA/Lac вводили рчЦфА в течение 7 дней, начиная инъекции через 24 часа после облучения. Для оценки влияния рчЦфА на миграцию стволовых клеток костного мозга мышам линии C57BL/6 однократно вводили 100,0 мкг/мышь (1 ТД) раствора белка в PBS в хвостовую вену через 24 ч после сублетального облучения.

При обработке мышей линии C57BL/6 и CBA/Lac 5ФУ рчЦфА вводили в течение 7 дней, при этом инъекции белка начинали через 3 часа после введения первой дозы химиопрепарата.

Для оценки противоопухолевого действия рчЦфА мышам подкожно вводили белок по следующим схемам: 1) в течение 7 дней до и 7 дней после прививки опухолевого штамма; 2) в течение 7 дней после прививки опухолевого штамма. Введение белка продолжали/начинали через 24 часа после прививки опухоли.

При оценке сочетанного действия рчЦфА и 5ФУ белок вводили в течение 7 дней после прививки опухолевого штамма РШМ-5. 5ФУ вводили мышам внутрибрюшинно двукратно с интервалом 96 ч в дозе 20 мг/кг (суммарная доза 5ФУ составляла 40 мг/кг). Введение 5ФУ начинали через 48 ч после прививки опухолевого штамма РШМ-5. При исследовании влияния рчЦфА и 5ФУ на рост сформированной опухоли РШМ-5 обработку мышей начинали с 8 дня после прививки опухолевого штамма и вводили 5ФУ по указанной выше схеме и рчЦфА в течение 7 дней.

При оценке антиметастатического действия рчЦфА мышам линии C57BL/6 подкожно вводили данный белок в дозе 200,0 мкг/мышь в течение 7 дней до удаления первичного опухолевого узла LLC (начало введения - через 24 ч после прививки) или в течение 7 дней после удаления первичного узла (начало введения - через 24 ч после операции).

Для оценки иммуномодулирующего действия рчЦфА мышам линии B10.D2(R101) вводили белок внутрибрюшинно 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 лимфомы EL-4.

При изучении эмбриотоксического действия рчЦфА использовали дозу белка 100,0 мг/кг (20 ТД), которую вводили беременным самкам F1(СВА/Лас х С57BL/6) по следующим схемам: 0,5 - 5,5 день беременности (доимплантационный период); 6,5 - 11,5 день беременности (органогенез); 12,5 - 17,5 день беременности (фетогенез). За 0,5 день беременности самки принимали день обнаружения копулятивной пробки.

При изучении процессов восстановления кроветворной системы после введения химиопрепарата, а также при оценке антиметастатического действия рчЦфА в качестве негативного контроля использовали липополисахарид (ЛПС) (Sigma Aldrich, США), который вводили мышам соответствующих линий в дозе 8,0 пг/мышь и 16,0 пг/мышь соответственно (эквивалентно содержанию ЛПС в 100,0 мкг/мышь и 200,0 мкг/мышь рчЦфА соответственно) по схемам, аналогичным введению рчЦфА.

Во всех исследованиях контрольным животным в качестве плацебо вводили PBS по схемам, аналогичным введению рчЦфА.

## **2.6. Определение количества эндоколоний**

Мышей линии С57BL/6 умерщвляли через 7 дней после сублетального облучения, извлекали селезенку и помещали в фиксирующий раствор, состоящий из абсолютного спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 1 : 3. Количество эндоколоний подсчитывали визуально при помощи бинокля (Zeiss Stemi Dv4, Германия).

## **2.7. Подготовка суспензий клеток**

Мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации и извлекали тимус, селезенку и сегменты берцовой и бедренной кости. Лимфоидные органы помещали в гомогенизатор Поттера в 3 мл PBS и клетки осторожно выдавливали пестиком из стромы органа. Из костей путем промывания при помощи шприца

выделяли костный мозг в 2 мл PBS. Забор образцов крови проводили из ретроорбитального синуса мышей гематокритными капиллярами, обработанными гепарином. После подсчета количества лейкоцитов (см. ниже) лизировали эритроциты в лизирующем буфере (BD, США) с последующей отмывкой в PBS путем центрифугирования (200 x g, 5 мин, 4°C). Смыв брюшной полости (лаваж) мышей линии B10.D2(R101) проводили 2 мл PBS при помощи шприца.

## 2.8. Подсчет лейкоцитов

Подсчет количества лейкоцитов проводили в камере Горяева в 3,0% уксусной кислоте. На мазках костного мозга, предварительно фиксированных метиловым спиртом и окрашенных по Нохту-Максимову [110], подсчитывали миелограммы (x 10<sup>6</sup>/бедро).

## 2.9. Антитела

Для анализа субпопуляционного состава лейкоцитов периферической крови, тимуса, селезенки и костного мозга использовали флуоресцентно меченые антитела (табл. 4). Перед проведением анализа проводили предварительную раститровку всех антител.

**Таблица 4** - Антитела, использованные в анализе методом проточной цитофлуориметрии

Антитела	Клон	Флуорохром	Производитель	Рабочее разведение
анти - CD3	17A2	eFluor 450	eBioscience, США	1:50
анти - CD4	GK1.5	APC	BD Pharmingen, США	1:50
анти - CD8	53-6.7	PE	BD Pharmingen, США	1:20
анти - B220	RA3-6B2	APC	eBioscience, США	1:100
анти - CD19	eBio103	FITC	eBioscience, США	1:50
анти - CD69	H1.2F3	PE	eBioscience, США	1:20
анти - CD86	PO3.1	PE	eBioscience, США	1:20
анти - CD25	3C7	FITC	BioLegend, США	1:20
анти - CD44	IM7	PE	eBioscience, США	1:50

анти - CD62L	MEL-14	APC-eFluor 780	eBioscience, США	1:50
анти - Sca-1	E13-161.7	FITC	BD Pharmingen, США	1:50
анти - CD31	MEC13.3	PE	BD Pharmingen, США	1:100
анти - Gr1	RB6-8C5	APC	BD Pharmingen, США	1:100
анти - CD11b	M1/70	PE-Cy7	BD Pharmingen, США	1:10
анти - Vb6	RR4-7	PE	BD Pharmingen, США	1:20
анти - Kb	AF-6-88.5	FITC	BD Biosciences, США	1:20

### 2.10. Цитофлуориметрический анализ клеток

1,0 - 5,0 x 10<sup>6</sup> клеток обрабатывали антителами Fc block (клон 2.4G2, BD Pharmingen, США) 5 мин при 4°C для предотвращения неспецифического связывания моноклональных антител, затем инкубировали с флуоресцентно мечеными антителами (табл. 4) 40 мин при 4°C. Клетки отмывали PBS путем центрифугирования (200 x g, 5 мин, 4°C) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (BD, США) в программе FACSDiva 6.0. Мертвые клетки исключали из анализа по окрашиванию пропидий йодидом (BD, США). Для характеристики популяций анализировали 0,5 - 1,0 x 10<sup>6</sup> событий. Использование Fc block, предварительная раститровка антител и исключение из анализа мертвых клеток позволило снизить вероятность неспецифического связывания антител, что, в свою очередь, дало возможность не использовать изотипические контроли. Обработку результатов проводили в программе FlowJo 7.6. (BD, США).

### 2.11. Определение числа антителообразующих клеток (АОК)

Мышам F1(СВА/Лас x С57BL/6) по окончании введения рчЦФА и облученным мышам линии СВА/Лас через 2 и 3 недели после облучения внутрибрюшинно вводили суспензию эритроцитов барана (ЭБ) в количестве 5,0 x 10<sup>7</sup> клеток/мышь. На 5-е сутки после иммунизации определяли число АОК методом Эрне [111].

## 2.12. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ)

По окончании введения рчЦфА мышей F1(СВА/Лас х С57ВL/6) иммунизировали путем инъекции 200 мкл 10 мМ тринитробензосульфоновой кислоты (ТНБС, Fluka Analytical, Швейцария) в основание хвоста. Вторую инъекцию антигена проводили на 6 сутки в количестве 50 мкл 10 мМ ТНБС в подушечку задней лапы.

Облученным мышам линии СВА/Лас через 2 и 3 недели после облучения и мышам линии СВА/Лас через 3 и 7 дней после введения 5ФУ вводили подкожно ЭБ в количестве  $2,0 \times 10^8$  в 200 мкл PBS. Вторую инъекцию антигена (50 мкл суспензии, содержащей  $1,0 \times 10^8$  ЭБ) производили на 5 сутки в подушечку задней стопы (опыт). В контралатеральную стопу вводили 50 мкл стерильного изотонического раствора (контроль). Результаты реакции регистрировали через 24 ч путем определения массы "опытной" и "контрольной" стоп. Для этого мышей умерщвляли, отрезали стопы по голеностопному суставу и взвешивали на лабораторных весах (BM512, Россия). Индекс реакции для каждого животного определяли по формуле:

$$\text{Ир (\%)} = \frac{M_{\text{оп}} - M_{\text{контр}}}{M_{\text{контр}}} \times 100, \quad (1)$$

где  $M_{\text{оп}}$  – масса стопы (опыт),  $M_{\text{контр}}$  – масса стопы (контроль).

## 2.13. Реакция бласттрансформации (РБТ)

Клетки селезенки интактных мышей F1(СВА/Лас х С57ВL/6) и мышей F1(СВА/Лас х С57ВL/6), обработанных рчЦфА в дозах 0,1; 1,0 и 3,0 мг/мышь, помещали в лунки плоскодонного 96 - луночного планшета (Costar, США) в количестве  $5,0 \times 10^5$  кл/лунку в полной среде (ПС), содержащей среду RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 0,01 мг/мл ципрофлоксацина (KRKA, Словения), 0,01М буфера HEPES (ПанЭко, Россия), 200 мМ L-глутамин (Sigma, США) и 10 мМ 2-меркаптэтанол (Merck, Германия). В лунки вносили рчЦфА в концентрациях 0,01 - 100,0 мкг/мл. Для оценки влияния рчЦфА на пролиферативную активность активированных клеток

спленоциты интактных мышей F1(СВА/Лас х С57BL/6) в количестве  $5,0 \times 10^6$  кл/мл обрабатывали конканавалином А (Кон А) в концентрациях 1,5 мкг/мл, 4,0 мкг/мл или 12,0 мкг/мл в 3 мл ПС в течение 2 ч при 37°C. Затем клетки отмывали дважды 2 мл в ПС путем центрифугирования (200 x g, 5 мин, 4°C), ресуспендировали в 3 мл ПС и помещали в лунки плоскодонного 96 - луночного планшета (Costar, США) в количестве  $5,0 \times 10^5$  кл/лунку. В лунки вносили рчЦФА в концентрациях 0,1 - 100,0 мкг/мл. Для оценки фоновой пролиферации в контрольные лунки не вносили рчЦФА или Кон А. Клетки инкубировали в течение 48 ч в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при температуре 37°C и за 18 ч до окончания культивирования в лунки добавляли по 1 мкКи <sup>3</sup>H - тимидина в объеме 20 мкл. Интенсивность включения <sup>3</sup>H - тимидина определяли в клетках, собранных на стекловолокнистые фильтры (Wallac, Финляндия) харвестером Cell Harvester 96 Mach III M (Tomtec, США), с помощью сцинтилляционного бета-счетчика (LKB, Швеция).

#### **2.14. Реакция смешанной культуры лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR)**

Для постановки MLR  $3,0 \times 10^5$  клеток селезенки интактных, облученных или обработанных 5ФУ мышей линии С57BL/6 инкубировали в присутствии аллогенных (FVB) или сингенных (С57BL/6) спленоцитов, обработанных митомицином С (Киова Хакко Когио Ко., Лтд., Япония) (25 мкг/мл, 37°C, 30 мин), в количестве  $5,0 \times 10^5$  клеток на лунку 96-луночного круглодонного планшета (Costar, США). Клетки инкубировали в ПС при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 часов. Пролиферацию клеток оценивали по включению <sup>3</sup>H-тимидина указанным выше образом. Уровень антиген-индуцированной пролиферативной активности клеток выражали в количестве импульсов в минуту (срм) или в виде индекса, который вычисляли по формуле:

$$\text{Ир (\%)} = \frac{\text{УПа}}{\text{УПс}}, \quad (2)$$

где  $УП_a$  - уровень пролиферации спленоцитов в присутствии аллогенных стимуляторов,  $УП_c$  - уровень пролиферации спленоцитов в присутствии сингенных стимуляторов.

### 2.15. Опухолевые штаммы

В работе использовали следующие перевиваемые опухолевые штаммы: эпидермоидную карциному легкого Льюис (далее LLC) (штамм поддерживали на мышах линии C57BL/6), рак шейки матки РШМ - 5 (штамм поддерживали на мышах линии CBA/Lac), меланому B16 (штамм поддерживали на мышах линии C57BL/6), рак молочной железы аденокарциному Ca 755 (штамм поддерживали на мышах F1(C57BL/6 x DBA/2)) [44]. В опытах *in vivo* использовали 2 - 7 пассаж данных опухолевых штаммов. Для перевивки опухолевую ткань измельчали до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 (Панэко, Россия) в соотношении 1:10 и 500 мкл полученной суспензии, что составляет около 50 мг опухолевой ткани ( $\sim 5,0 \times 10^6$  клеток), вводили мышам подкожно в область правой подмышечной впадины.

В работе также использовали лимфому EL-4 ( $K^bD^b$ ), которую получали в асцитной форме путем внутрибрюшинной прививки мышам линии C57BL/6 ( $K^bI-A^bD^b$ ) в количестве  $3,0 - 5,0 \times 10^6$  клеток. Через 10 - 14 дней собирали асцит, трижды отмывали центрифугированием (200g, 5 мин) в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) и использовали для иммунизации мышей линии B10.D2(R101) и трансгенной линии 1D1b (раздел 2.23.).

### 2.16. Оценка противоопухолевого действия рЧЦФА

Оценку противоопухолевого действия рЧЦФА проводили по показателю торможения роста опухоли и увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных [44].

Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = \frac{V_k - V_0}{V_k} \times 100, \quad (3)$$

где  $V_k$  и  $V_o$  – средний объем опухолей ( $\text{мм}^3$ ) в контрольной и опытной группах соответственно.

Объем солидной опухоли определяли как произведение трех перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Измерение объема опухолей проводили после окончания введения рЧЦФА и формирования опухолевого узла с интервалом 4 - 5 дней.

Увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) опытных животных по сравнению с контролем вычисляли по формуле:

$$\text{УПЖ (\%)} = \frac{\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k}{\text{СПЖ}_k} \times 100, \quad (4)$$

где СПЖ<sub>о</sub> и СПЖ<sub>к</sub> – средняя продолжительность жизни (сутки) в опытной и контрольной группах соответственно.

Противоопухолевый эффект рЧЦФА считали достоверным при показателях торможения роста опухоли  $\geq 50-70\%$  продолжительностью не менее 7 дней после окончания введения белка или увеличении продолжительности жизни животных  $\geq 25\%$  [44].

### 2.17. Оценка антиметастатического действия рЧЦФА

7 пассаж *in vivo* карциномы легкого Льюис (LLC) прививали подкожно в область правого бока самкам мышей линии C57BL/6 как описано выше. На 8 день после прививки удаляли первичный опухолевый узел хирургическим способом. Для этого перед началом операции мышам обеспечивали анестезию путем внутрибрюшинного введения 2,5% водного раствора 1 г 2,2,2 –трибромэтанола (Sigma, США) в 1 мл 2-метил-2- бутанола (Sigma, США) из расчета 15 мкл на 1 г веса животного [112]. После обработки операционного поля 2% спиртовым раствором йода удаляли опухолевый узел вместе с прилегающим участком кожи. Затем на кожу накладывали швы кетгутом (Линтекс, Россия) и обрабатывали 5% спиртовым раствором йода.

Умерщвление мышей проводили через 21 день после хирургического удаления первичного узла. Степень метастатического поражения легких

определяли по критериям, разработанным Tarin и Price (1979 г.) (табл. 5) [44].

**Таблица 5** - Оценка степени метастатического поражения легких в зависимости от количества и размера метастазов [44]

Степень поражения	Количество метастазов и их диаметр
0	Отсутствуют
1	Меньше 10 с диаметром не более 1 мм
2	От 10 до 30 метастатических узлов, некоторые из них размером больше 1 мм в диаметре
3	Больше 30 метастазов различных размеров, но отсутствуют сливные
4	Тяжелое поражение легочной ткани, менее 100 штук, но сливного роста еще нет
5	Массивное поражение легких, более 100 метастазов, наличие сплошных опухолевых узлов

Уровень торможения метастазирования (ТМ) вычисляли по формуле:

$$ТМ (\%) = \frac{Мк - Моп}{Мк} \times 100, \quad (5)$$

где Мк и Моп - средняя масса метастазов в контрольной и опытной группе соответственно.

Среднюю массу метастазов в легких определяли путем вычитания из массы легких, пораженных метастазами, среднюю массу легких интактных животных без опухоли.

### 2.18. Выделение матричной РНК (мРНК)

Мышам линии С57ВL/6 прививали подкожно клетки меланомы В16 в дозе  $3,0 \times 10^5$  кл/мышь. Часть животных обрабатывали рчЦфА в количестве 100,0 мкг/мышь в течение 7 дней после прививки опухоли. На 14 день после прививки опухоли мышей контрольной (плацебо) и опытной (рчЦфА) групп умерщвляли путем цервикальной дислокации и извлекали подкожный опухолевый узел. Опухолевую ткань измельчали в жидком азоте и добавляли 1 мл реагента TRI (Molecular Research Center, Inc, США) с последующей инкубацией при комнатной

температуре 10 мин. Далее выделяли РНК согласно протоколу производителя: к 1 мл реагента TRI добавляли 200 мкл хлороформа, тщательно перемешивали в течение 15 сек и инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Затем пробы центрифугировали при 4°C 12000 x g в течение 15 мин, отбирали верхнюю фазу, которая содержит РНК, и добавляли к ней 500 мкл изопропилового спирта (из расчета 500 мкл изопропанола на 1 мл реагента TRI). Смесь перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Далее образцы центрифугировали при 4°C 12000 x g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли и промывали осадок 1 мл 70% этилового спирта путем центрифугирования при 4°C 12000 x g 5 мин. После полного удаления этанола, РНК растворяли в деионизированной воде и инкубировали в течение 5 мин при температуре 55°C. Концентрацию РНК определяли на приборе Nanophotometer (Implen P360, Германия) и хранили при -70°C.

### **2.19. Синтез комплементарной ДНК (кДНК)**

Перед синтезом кДНК проводили обработку выделенной РНК ферментом ДНКазы I (DNase I, Invitrogen, США) для предотвращения контаминации образцов геномной ДНК. Для этого в 20 мкл реакционной смеси смешивали 1 - 2 мкг ДНК, 10x буфер для ДНКазы I, 2 мкл фермента ДНКазы I, 1 мкл RiboLock RNase Inhibitor (ThermoScientific, США) и деионизированную воду. Образцы инкубировали 30 мин. при 37°C, затем добавляли 2 мкл ЭДТА с последующей инкубацией 10 мин. при 65°C. Синтез кДНК осуществляли с помощью коммерческого набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя: к 1-2 мкг РНК, обработанной ДНКазой I, добавляли 1 мкл случайных гексамеров (100 μM) и инкубировали 5 мин при температуре 65°C. Далее добавляли 5x буфер для обратной транскриптазы, 10x смесь дезоксирибонуклеотидов (10 mM dNTPs), 200 ед. обратной транскриптазы и 20 ед. ингибитора РНКаз. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре 5 - 10 мин, затем при температуре 42°C 1 час. Реакцию ингибировали при температуре 70°C в течение 5 мин.

## 2.20. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (Real-time ПЦР)

Для постановки ПЦР в реальном времени полученную кДНК разводили в 100 раз и использовали 10 мкл раствора на 1 реакцию. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал:

1. 10x реакционный буфер (Евроген, Россия);
2. 30x смесь 10 mM dNTPs (Евроген, Россия);
3. 30x смесь 10  $\mu$ M праймеров (прямой и обратный; Евроген, Россия);
4. Smar<sup>NG</sup>Taq ДНК полимеразу (Диалат Лтд, Россия);
5. 20x краситель EvaGreen (Biotium, США);
6. 10 мкл кДНК;
7. деионизированную воду.

ПЦР проводили на приборе BioRad CFX-96 (США) при режиме: 1. 95°C - 2 мин.; 2. 40 циклов: 95°C - 20 сек; 60 °C - 15 сек; 72°C- 15 сек.

Для получения кривой плавления продукта использовали следующий температурный режим: 66°C - 95°C с шагом 0,5°C 5 сек. С каждой парой праймеров один образец кДНК ставили в трех технических повторах. Анализ ПЦР проводили с использованием программы BioRad CFX Manager 3.1. (США).

## 2.21. Последовательность праймеров

Для анализа методом Real-time ПЦР использовали следующие праймеры (табл. 6):

**Таблица 6** - Перечень последовательностей праймеров, используемых в Real-time ПЦР

Название гена	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера	Размер продукта, п.н.
<i>Hprt</i>	AACTTTGCTTTCCCTGGTT	CGTCATCTTAGGCTTTGT	234
<i>Ppia</i>	GACTGAATGGCTGGATGG	CAGAAGGAATGGTTTGATGG	188
<i>Tbp</i>	ACCGTGAATCTTGGCTGTAA	CAGTTGTCCGTGGCTCTC	121

<i>Mmp2</i>	GGCACCACCGAGGACTATG	CAGGAAAGTGAAGGGGAAGA	117
<i>Mmp3</i>	TGAACGATGGACAGAGGATG	AGAGATGGAAACGGGACAAG	155
<i>Mmp8</i>	CCTATTTCTCGTGGCTGCTC	GGATGGGGTTGTCTGAAGGT	176
<i>Mmp9</i>	CGACATAGACGGCATCCAG	TGTGGTTCAGTTGTGGTGGT	84
<i>Mmp12</i>	ATGAGGCAGAAACGTGGACT	ATCAGCAGAGAGGCGAAATG	167
<i>Mtl</i>	CCTCTAAGCGTCACCACGA	ACGGGACAGCAGGAGCAG	111
<i>Timp1</i>	GGTTCCTGGCGTACTCTG	GACCTGATCCGTCCACAA	148
<i>Timp2</i>	GCAGGAAAGGCAGAAGGAG	GGGGAGGAGATGTAGCAAGG	170
<i>VegfA</i>	GGACCCTGGCTTTACTGCT	TGGGACTTCTGCTCTCCTTC	82
<i>Bsg</i>	AAGAGGCGGAAGCCAGAC	GGTAGGTTCAAATCGGGACA	222

## 2.22. Иммуногистохимическое исследование

Мышам линии C57BL/6 прививали подкожно клетки меланомы B16 в дозе  $3,0 \times 10^5$  кл/мышь. Часть животных обрабатывали рчЦфА в количестве 100,0 мкг/мышь в течение 7 дней после прививки опухоли. На 10 день после прививки опухоли мышей контрольной (плацебо) и опытной (рчЦфА) групп умерщвляли путем цервикальной дислокации и извлекали подкожный опухолевый узел, который фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (Синтакон, Россия) в течение 24 ч. Зафиксированную опухолевую ткань заключали в парафин и на микротоме (Accu - Cut SRM, Sakura, Голландия) готовили срезы толщиной 5 мкм, которые помещали на предметные стекла, обработанные поли-L-лизинном (Thermo Fisher Scientific, США). Стекла со срезами инкубировали при 56°C в течение 1 ч., затем при 37°C в течение 24 ч. Далее проводили депарафинирование срезов по нисходящим спиртам (о-кислол I, о-кислол II, 96° этанол I, 96° этанол II, 70° этанол), промывали в дистиллированной воде и осуществляли демаскировку антигена путем инкубации срезов в течение 40 мин. при температуре 95°C в цитратном буфере (pH 6,0; Dako, США). Затем срезы обрабатывали реактивом Peroxidase Block (Dako, США) в течение 10 мин. при комнатной температуре для блокировки активности эндогенной пероксидазы. После этого стекла помещали во влажную камеру и наносили на срезы первичные моноклональные анти-CD34 антитела (клон RAM34, BD Pharmingen, США) в разведении 1:100. Через 18 - 20 ч

инкубации при 4°C вносили вторичные биотинилированные антитела (BD Pharmingen, США) в разведении 1:200 и инкубировали срезы во влажной камере 30 мин. при комнатной температуре. Затем образцы два раза промывали PBS в течение 5 мин. и обрабатывали реагентом стрептавидин-пероксидаза (Dako, США) во влажной камере 15 мин. при комнатной температуре. После двойной промывки PBS в течение 5 мин. на срезы наносили 3,3'-диаминобензидин (Dako, США) на 5 мин. Далее стекла промывали дистиллированной водой в течение 5 мин., окрашивали гематоксилином 1 мин., промывали проточной водой в течение 3 мин., высушивали и заключали в глицергель (Dako, США). Гистологические препараты исследовали при помощи микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Япония).

### **2.23. Иммунизация животных**

Мышей линии B10.D2(R101) иммунизировали клетками лимфомы EL-4 путем внутрибрюшинного введения  $3,0 \times 10^5$  кл/мышь в 1 мл PBS (ПанЭко, Россия). Мышей трансгенной линии 1D1b иммунизировали аналогичным образом клетками EL-4 в дозе  $1,0 \times 10^6$  кл/мышь.

### **2.24. Оценка уровня противоопухолевого иммунного ответа *in vivo***

Через 6, 9 и 12 дней после иммунизации мышей линии B10.D2(R101) умерщвляли путем цервикальной дислокации и подготавливали суспензии клеток лаважа брюшной полости и селезенки описанным выше образом. Через 12 дней после иммунизации у мышей трансгенной линии 1D1b извлекали селезенку и гомогенизировали, как описано выше. Полученные образцы клеток анализировали с использованием флуоресцентных антител (табл. 4) методом проточной цитофлуориметрии, как описано выше.

### **2.25. Создание экспрессионной генетической конструкции для трансгенеза**

Полноразмерную кДНК мышинового ЦфА (мЦфА) амплифицировали с использованием прямого праймера mCypANhe1F 5`-

ATCGCTAGCATGGTCAACCCCACCGTGTTTC- 3` и обратного праймера mCypAClaIR 5`-CGATCGATCTACAGAAGGAATTGTATGAT-3`, которые содержали сайты рестрикции NheI и ClaI (Fermentas, Литва) соответственно (выделено полужирным шрифтом). В качестве матрицы использовали кДНК, синтезированную из тотальной РНК тимуса интактной мыши линии C57BL/6. Выделение РНК и синтез кДНК осуществляли описанным выше образом. Продукт амплификации клонировали в ТА вектор, используя TA Cloning Kit (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя, и секвенировали в Центре коллективного пользования «Геном» Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта. Результаты секвенирования анализировали с помощью программ Chromas v. 1.45, DNAssist v. 1.0 и программы BLAST в режиме on-line. Далее последовательность кДНК мЦфА вырезали из ТА-вектора рестриктазами NheI и ClaI и клонировали в экспрессионный вектор pUC18 (рис. 74), предварительно линеаризованный этими же ферментами рестрикции. Полученную генетическую конструкцию обрабатывали рестриктазой SalI (Fermentas, Литва), и фрагмент pUC18 - мЦфА длиной около 5 т.п.н. использовали для микроинъекций.

## 2.26. Создание трансгенных животных

Первичных трансгенных мышей получали методом микроинъекций раствора ДНК в ТЕ - буфере (концентрация ДНК 5,0 нг/мкл) в мужской пронуклеус оплодотворенных яйцеклеток с последующей пересадкой выживших зигот псевдобеременным реципиентам [107; 113].

## 2.27. Анализ наличия трансгена методом ПЦР

Геномную ДНК для ПЦР-анализа выделяли по стандартному протоколу (Molecular Cloning, США). Для генотипирования трансгенных мышей pUC18-мЦфА использовали прямой праймер 5`-GGAACCCACTGCCACAACTCCTG-3` и обратный праймер 5`-CGATCGATCTACAGAAGGAATTGTATGAT-3`. Для анализа трансгенных мышей Cyp-STOP использовали прямой праймер 5`-GCCTGAAGAACGAGATCAGC-3` и обратный праймер 5`-

GCAAACAGCTCGAAGGAGAC-3'. Для анализа трансгенных мышей линии Osx-Cre использовали прямой праймер 5' - GCGGTCTGGCAGTAAAAАСТАТC - 3' и обратный праймер 5'- GTGAAACAGCATTTGCTGTCACTT - 3'. Амплификацию проводили на приборе Терцик (ДНК-Технология, Россия) при режиме:

1. 94°C – 3 мин.;
2. 4 цикла: 94°C – 20 с, 62°C – 30 с; 72°C – 35 с;
3. 8 циклов: 94°C – 20 с, 60°C – 30 с, 72°C – 35 с;
4. 25 циклов: 94°C – 20 с, 58°C – 30 с, 72°C – 35 с;
5. 72°C – 10 мин.

В качестве контроля прохождения ПЦР использовали праймеры к гену CD4: прямой 5' - GAGGTTCGCCTTCGCAGTTTGAT - 3', обратный 5' - TGGACATGGAGAGAACTTTGGA - 3'. ПЦР - продукты анализировали в присутствии бромистого этидия в трансиллюминаторе (2011 Macrovue, LKB, Швеция) после электрофоретического разделения в 1,5% агарозном геле (Axugen, США).

## **2.28. Оценка эмбриотоксического действия экспрессионной конструкции рUC18-мЦФА**

Самок-реципиентов вскрывали на 12 день после пересадки микроинъекцированных яйцеклеток. Подсчитывали количество живых, мертвых и резорбированных плодов. У эмбрионов брали образец ткани для ПЦР-анализа наличия трансгена указанным выше образом.

## **2.29. Изучение эмбриотоксического действия рЧЦФА**

На 18,5 день беременности самок F1(СВА/Лас х С57BL/6) умерщвляли путем цервикальной дислокации. После вскрытия подсчитывали количество мест имплантации живых, мертвых и резорбированных плодов. Плоды взвешивали и определяли их краниокаудальный размер. Для определения морфологических (анатомических) пороков у эмбрионов с помощью бинокля Zeiss Stemi Dv4 (Германия) визуально оценивали симметричность головы и туловища, состояние органов зрения, слуха, обоняния и осязания, развитие конечностей, наличие пупочной грыжи, а также состояние кожных покровов. Кроме того, на основании

этих параметров делали заключение о стадии развития плода согласно критериям, разработанным в методических указаниях [114]. Общее развитие оценивали по состоянию скелета плодов, при этом учитывали аномалии скелета.

### **2.30. Окрашивание скелета плода ализарином по методике Доусона**

Плоды фиксировали в 96° этиловом спирте (в соотношении 1:10 к массе плода) не менее 7 дней, затем удаляли внутренние органы и погружали в 1% КОН для просветления мягких тканей. Плоды размером 1,0 - 1,5 см выдерживали в КОН около 24 часов, размером более 1,5 см - не более 2 суток. Затем эмбрионы промывали проточной водой около 30 мин., переносили в раствор А (150 мл глицерина, 300 мл дистиллированной воды, 10 г КОН), к которому добавляли 0,1% раствор ализарина красного с рН 5,2. Через 3 - 5 суток окостеневшие участки скелета были прокрашены в красно-фиолетовый цвет. Для обесцвечивания мягких тканей плоды переносили в раствор А на 7 - 14 суток, затем проводили через смеси глицерина, спирта и воды (1:2:7 - 2 часа, 2:2:6 - 2 часа, 4:4:2 - 2 часа) и смесь спирта и глицерина (1:1 - 2 часа) для обезвоживания. Плоды хранили в чистом глицерине с добавлением 1-2 капель формалина. Анализ зон оссификации скелета эмбрионов проводили при помощи стереомикроскопа Olympus SZ 61 (Япония).

### **2.31. Статистическая обработка данных**

Для всех количественных данных вычисляли среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (SEM). Статистическую обработку проводили с использованием парного двухвыборочного t-критерия Стьюдента в программе Excel (Microsoft, США). Предварительно проводили проверку нормальности распределения выборки с использованием критерия Шапиро-Уилка для подтверждения корректности использования t-критерия Стьюдента. В ряде случаев при сравнении 3 и более групп проводили однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) в программе Prism (v. 8.1.2, GraphPad, США). Различия признавали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **3.1. Оценка влияния рчЦфА на субпопуляционный состав клеток костного мозга, крови и органов иммунной системы экспериментальных животных в норме и после воздействия высоких доз облучения и цитостатиков**

ЦфА - эволюционно древний, высококонсервативный белок [45], не обладающий видовой специфичностью. Согласно базе данных Protein NCBI аминокислотные последовательности ЦфА человека (референсная последовательность NCBI NP\_066953.1) и мыши (референсная последовательность NCBI NP\_032933.1) имеют практически 100% гомологию. Таким образом, проведение исследований рчЦфА на животных (мышях) является корректным. Для изучения роли рчЦфА в восстановлении кроветворной и иммунной систем организма после облучения и воздействия химиопрепаратов проводили 7-дневное подкожное введение данного белка в дозе 100,0 мкг/мышь (5,0 мг/кг), которая была условно принята за 1 терапевтическую дозу (ТД). Контрольным животным аналогичным образом вводили PBS (плацебо).

##### **3.1.1. Влияние рчЦфА на субпопуляционный состав клеток костного мозга и крови мышей в норме**

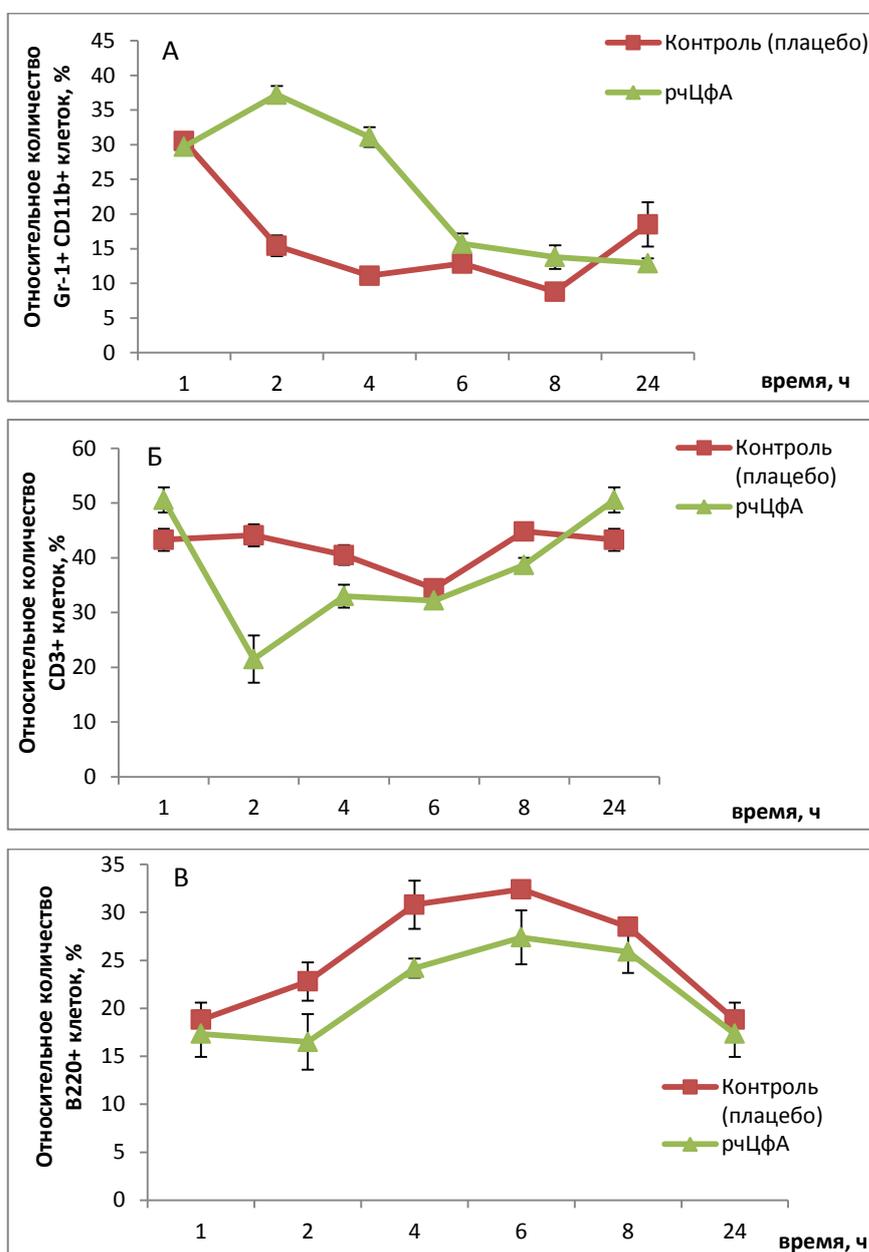
По окончании курсового введения рчЦфА мышам F1(СВА/Лас х С57ВL/6) проводили подсчет общего количества кариоцитов ( $\times 10^6$  клеток/бедренную кость) и анализ миелограмм костного мозга (табл. 7). Было показано, что исследуемый белок не вызывает существенных изменений в субпопуляционном составе клеток костного мозга интактных мышей.

**Таблица 7** - Показатели миелограмм костного мозга мышей F1(СВА/Лас х С57BL/6) по окончании 7- дневного введения рчЦФА

Показатель	Группа животных	
	Плацебо	рчЦФА
Общее количество кариоцитов, $\times 10^6$	74,7 $\pm$ 4,1	74,2 $\pm$ 6,0
Бласты, %	1,0 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,6
Промиелоциты, %	0,4 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,3
Нейтрофильные миелоциты, %	10,6 $\pm$ 2,7	8,0 $\pm$ 1,2
Нейтрофильные метамиелоциты, %	2,6 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,8
Палочкоядерные нейтрофилы, %	28,9 $\pm$ 1,7	32,9 $\pm$ 3,2
Сегментоядерные нейтрофилы, %	23,7 $\pm$ 1,8	28,0 $\pm$ 3,0
Эозинофильные миелоциты, %	0,24 $\pm$ 0,1	0,04 $\pm$ 0,04
Эозинофильные метамиелоциты, %	0,28 $\pm$ 0,1	0,04 $\pm$ 0,04
Палочкоядерные эозинофилы, %	0,28 $\pm$ 0,1	0,48 $\pm$ 0,48
Сегментоядерные эозинофилы, %	0,32 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,04
Моноциты, %	1,7 $\pm$ 0,7	1,4 $\pm$ 0,6
Лимфоциты, %	6,4 $\pm$ 1,1	6,6 $\pm$ 0,7
Нормобласты базофильные, %	1,6 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,7
Нормобласты полихроматофильные, %	13,4 $\pm$ 1,0	11,9 $\pm$ 1,2
Нормобласты оксифильные, %	4,2 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 0,5
Сумма клеток эритроидного ряда, %	21,6 $\pm$ 2,7	17,3 $\pm$ 1,0
Индекс созревания эритроидных клеток	0,9 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,03
Лейко-эритробластическое соотношение	3,4 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 0,8

На следующем этапе работы оценивали динамику изменения относительного количества гранулоцитов (Gr-1+ CD11b+), Т-клеток (CD3+) и В-клеток (B220+) в крови мышей F1(СВА/Лас х С57BL/6) после однократного введения 100,0 мкг/мышь рчЦФА. Было выявлено кратковременное увеличение

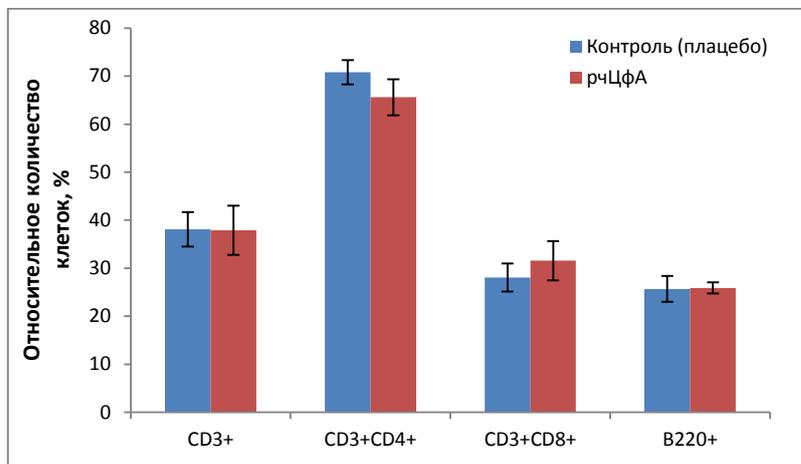
количества гранулоцитов в течение первых 4 часов после введения белка, которое сопровождалось пропорциональным снижением доли Т- и В-клеток (рис. 7). Через 6 часов наблюдалось восстановление субпопуляционного состава периферической крови до показателей контрольных животных (плацебо).



**Рисунок 7** - Динамика изменения относительного количества гранулоцитов (А), Т-клеток (Б) и В-клеток (В) в периферической крови мышей F1(СВА/Лас х С57ВL/6) после однократного введения ЦФА

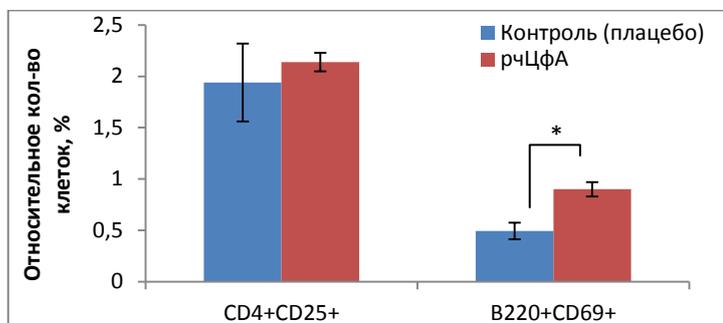
По окончании курсового введения рЧЦФА не было выявлено изменение абсолютного количества лейкоцитов в крови мышей F1(СВА/Лас х С57ВL/6), а

также относительного количества Т- и В-клеток (рис. 8). Соотношение основных субпопуляций Т-клеток - хелперов (CD3+CD4+) и киллеров (CD3+CD8+) - также было без изменений (рис. 8).

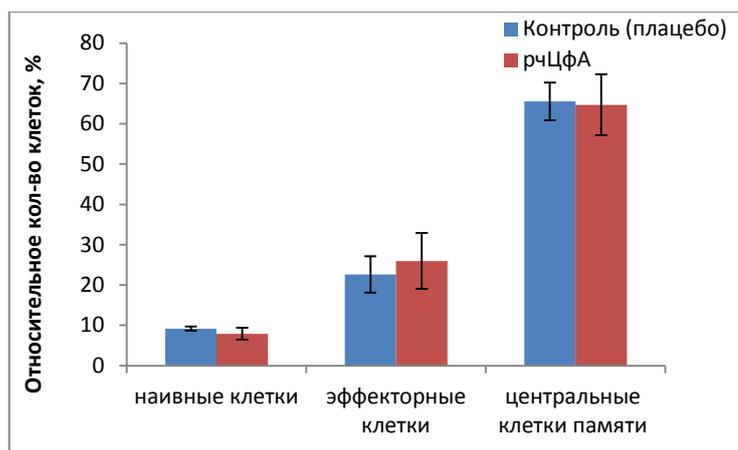


**Рисунок 8** - Относительное количество Т-клеток (CD3+), в том числе Т-хелперов (CD3+CD4+) и Т-киллеров (CD3+CD8+), и В-клеток (B220+) в периферической крови мышей F1(СВА/Лас x C57BL/6) после курсового введения рЦфА

Кроме того, рЦфА не оказал влияния на активационный фенотип CD4+ Т-клеток (маркер CD25) (рис. 9) и CD8+ Т-клеток (маркеры CD62L и CD44) (рис. 10). Однако, было обнаружено достоверное увеличение ( $p \leq 0,05$ ) относительного количества активированных В-клеток (B220+CD69+) под действием рЦфА (рис. 9).



**Рисунок 9** - Относительное количество активированных CD4+ Т-клеток (CD4+CD25+) и активированных В-клеток (B220+CD69+) в периферической крови мышей F1(СВА/Лас x C57BL/6) после курсового введения рЦфА. \*  $p \leq 0,05$



**Рисунок 10** - Относительное количество наивных клеток (CD62L+CD44+), эффекторов (CD62L-CD44+) и центральных клеток памяти (CD62L+CD44+) в популяции CD8+ Т-клеток периферической крови мышей F1(CBA/Lac x C57BL/6) после курсового введения рЦфА

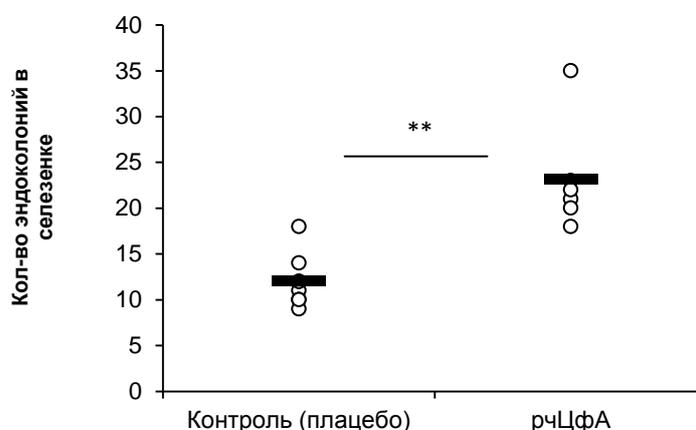
Таким образом, однократное и курсовое введение рЦфА не приводит к значительным нарушениям гомеостаза гемопоэтической системы организма. Курсовое введение исследуемого белка не оказывает влияния на активационный фенотип Т-лимфоцитов, но индуцирует активацию В-лимфоцитов периферической крови интактных мышей.

### 3.1.2. Влияние рЦфА на субпопуляционный состав органов кроветворной и иммунной систем мышей после облучения

#### 3.1.2.1. Влияние рЦфА на миграцию стволовых клеток костного мозга мыши

Влияние рЦфА на миграцию стволовых клеток костного мозга *in vivo* оценивали путем подсчета количества эндоколоний в селезенке сублетально облученных мышей линии C57BL/6 [115]. Было показано, что однократное внутривенное введение исследуемого белка в дозе 100,0 мкг/мышь приводит к достоверному увеличению количества эндоколоний по сравнению с контрольной группой облученных животных (плацебо) (рис. 11). Таким образом, данный

эффект рЧЦФА соответствует выявленной ранее специфической биологической активности нативного ЦФА мыши [37].



**Рисунок 11** - Количество эндоколоний в селезенке облученных мышей линии C57BL/6.  $**p \leq 0,01$

На следующем этапе работы исследовали процессы восстановления костного мозга, селезенки, тимуса и периферической крови облученных животных при курсовом введении рЧЦФА. Через 7, 14 и 21 день после облучения подсчитывали абсолютное количество лейкоцитов (табл. 8 и 9) и проводили анализ субпопуляционного состава клеток данных органов с использованием маркеров Sca-1, CD31, Gr-1, CD11b, CD3 (маркер Т-клеток) и B220 (маркер В-клеток).

Sca-1 (Stem cell antigen 1, Ly-6A/E) является маркером самообновляющихся гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и некоммитированных предшественников [116]. Sca-1<sup>+</sup> ГСК обнаруживаются в костном мозге, крови и селезенке взрослых мышей, а также в эмбриональной печени [117; 118].

CD31 (Platelet endothelial cell adhesion molecule- 1 (PECAM-1)) является маркером отдельных популяций ГСК [119; 120].

С помощью маркеров CD11b и Gr-1 можно охарактеризовать три различных популяции гранулоцитов: Gr-1<sup>int</sup>CD11b<sup>int</sup> клетки представляют собой митотически активные промиелоциты и миелоциты; Gr-1<sup>hi</sup>CD11b<sup>lo</sup> являются

неделяющимися незрелыми нейтрофилами, а Gr-1hiCD11bhi клетки - зрелыми нейтрофилами [121].

**Таблица 8** - Абсолютное количество клеток ( $\times 10^6$ ) в органах мышей линии C57BL/6 после сублетального облучения

Орган	Срок анализа, дни после облучения	Группа мышей		
		Интактные мыши	Облученные (плацебо)	Облученные + рЧЦФА
Костный мозг	7	29,9 ± 4,4	31,9 ± 2,6	24,7 ± 1,5
	14	31,7 ± 1,5	55,2 ± 9,8	64,4 ± 11,2
	21	27,5 ± 2,8	30,4 ± 2,8	30,1 ± 2,0
Тимус	7	92,9 ± 11,5	38,6 ± 5,9	29,0 ± 2,1
	14	102,0 ± 13,0	54,7 ± 8,7	61,6 ± 4,4
	21	86,4 ± 14,0	31,9 ± 3,3	43,0 ± 3,9*
Селезенка	7	104,1 ± 7,0	18,2 ± 1,4	21,4 ± 0,4
	14	124,1 ± 17,5	161,4 ± 21,1	136,1 ± 19,4
	21	129,2 ± 17,4	98,5 ± 8,0	96,7 ± 8,0

\* $p \leq 0,05$  при сравнении с группой облученных мышей (плацебо)

### ***3.1.2.2. Анализ субпопуляционного состава клеток периферической крови облученных мышей***

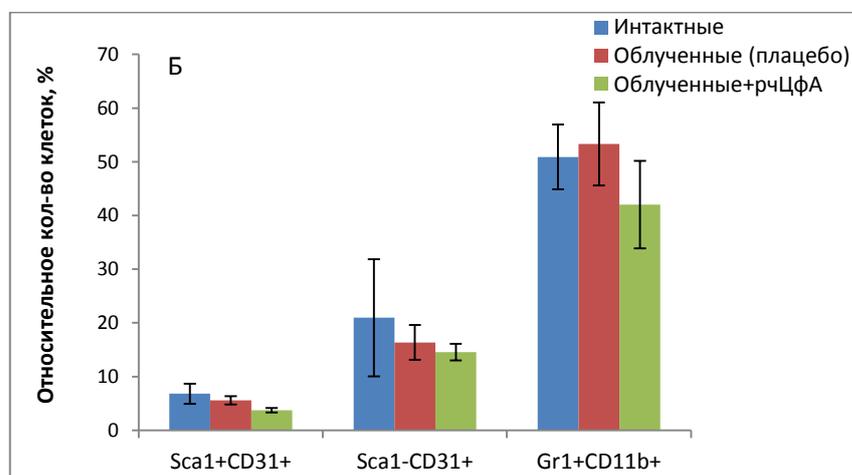
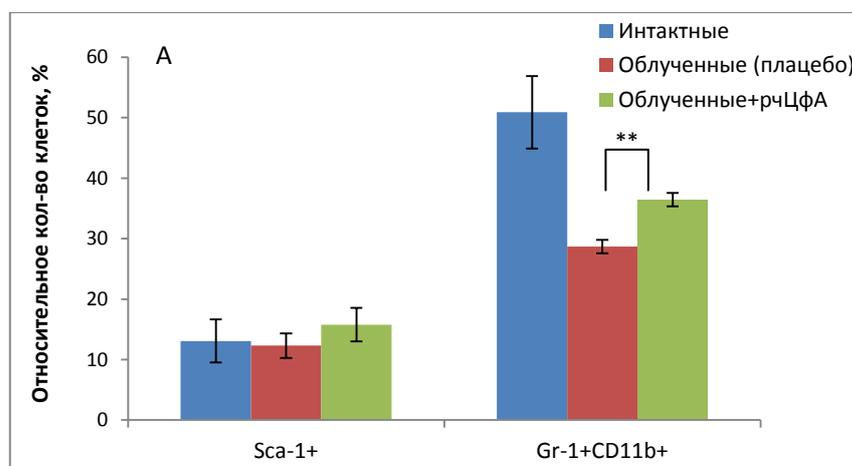
Под действием рЧЦФА наблюдалось достоверное увеличение количества лейкоцитов в крови животных через 1 неделю после облучения по сравнению с контрольной группой облученных мышей ( $p \leq 0,05$ , табл. 9). Анализ субпопуляций клеток крови показал, что на данном сроке под влиянием исследуемого белка происходит рост относительного количества зрелых гранулоцитов Gr1+CD11b+ ( $p \leq 0,01$ , рис. 12А) и снижение доли CD3+ Т-клеток ( $p \leq 0,01$ , рис. 13). Через 14 и 21 день после облучения данный эффект нивелировался, и абсолютное количество клеток, а также субпопуляционный состав клеток периферической крови мышей,

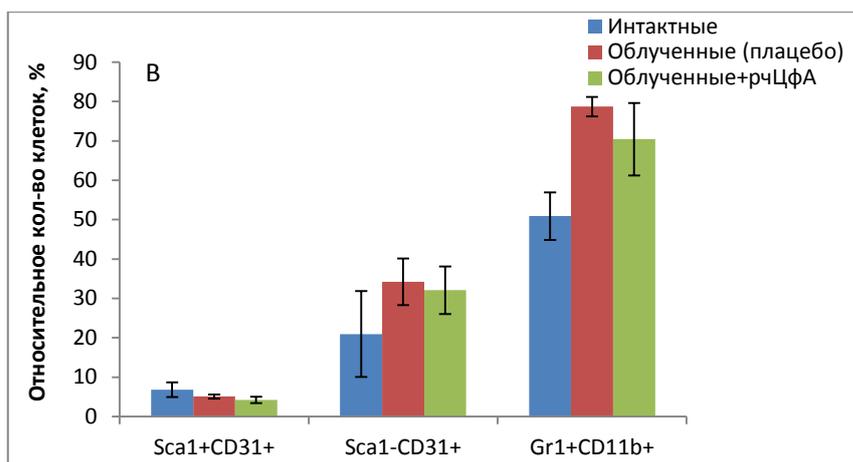
обработанных рчЦФА, не отличался от показателей в контрольной группе облученных животных (табл. 9, рис. 12Б, В). Исследуемый белок не оказал влияния на динамику восстановления В-клеток (B220+, рис. 13).

**Таблица 9** - Количество лейкоцитов ( $\times 10^6/\text{мл}$ ) в крови облученных мышей линии C57BL/6

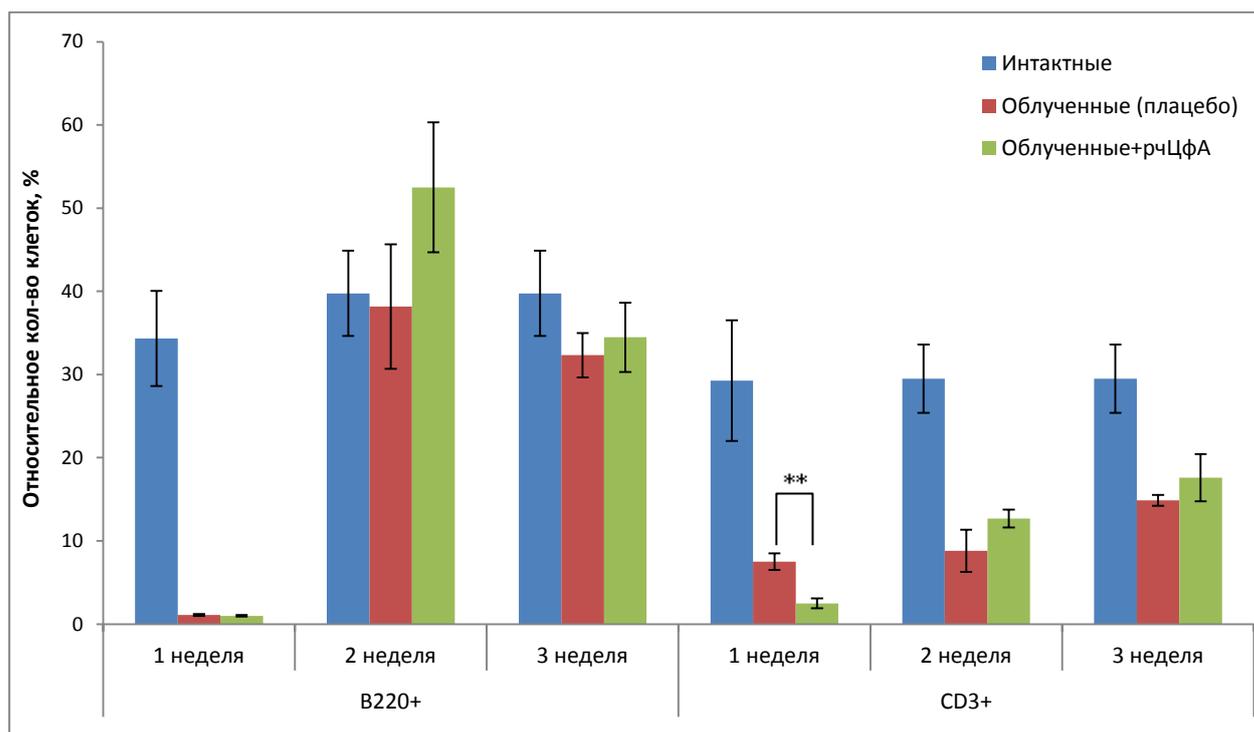
Срок анализа, дни после облучения	Интактные мыши	Облученные мыши (плацебо)	Облученные мыши + рчЦФА
7 день	11225,0 $\pm$ 780,6	1641,7 $\pm$ 259,7	2300,0 $\pm$ 262,1*
14 день	9912,0 $\pm$ 1354,4	2933,3 $\pm$ 265,2	3586,0 $\pm$ 497,7
21 день	12609,6 $\pm$ 1273,7	6225,0 $\pm$ 842,4	6083,3 $\pm$ 683,4

\* $p \leq 0,05$  при сравнении с группой облученных мышей (плацебо)





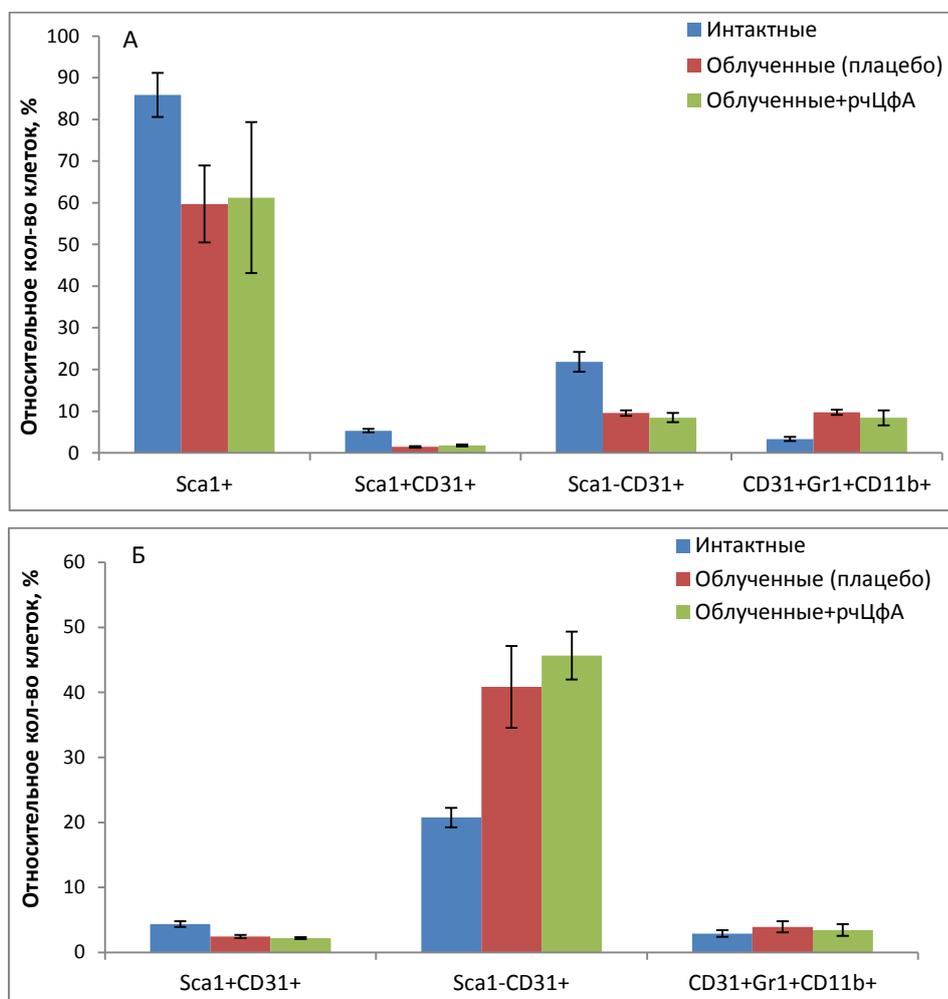
**Рисунок 12** - Динамика изменения относительного количества (%) клеток различных популяций в периферической крови мышей линии C57BL/6 под действием рЦФА через 7 (А), 14 (Б) и 21 (В) день после облучения.  $**p \leq 0,01$

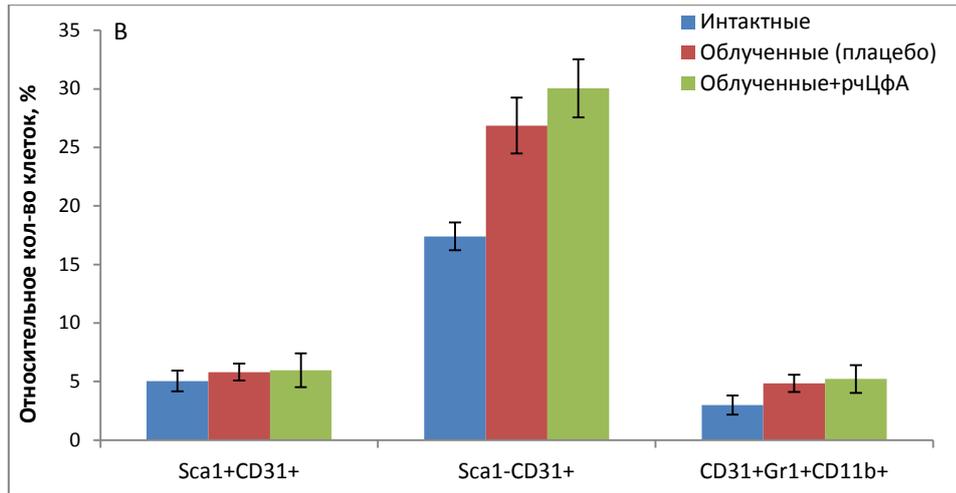


**Рисунок 13** - Динамика изменения относительного количества (%) В- (B220+) и Т-клеток (CD3+) в периферической крови мышей линии C57BL/6 под действием рЦФА.  $**p \leq 0,01$

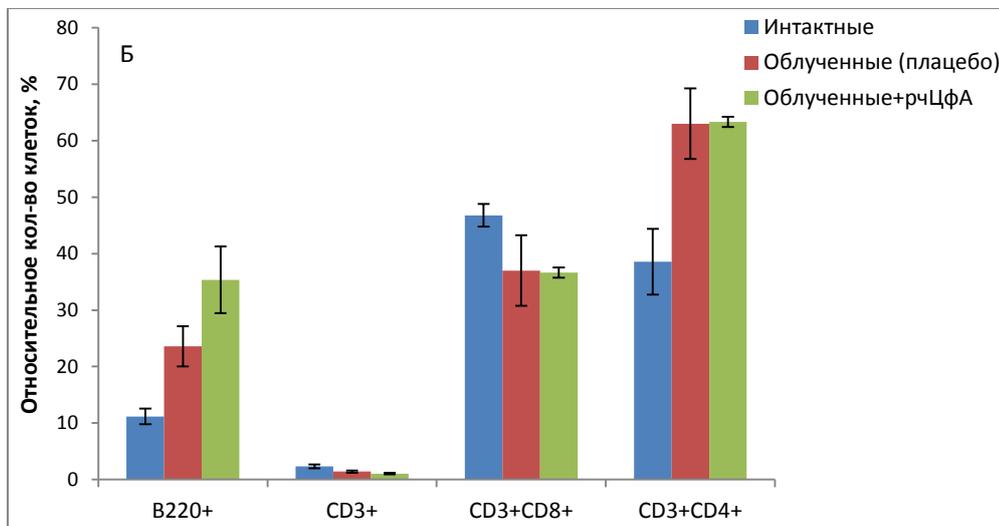
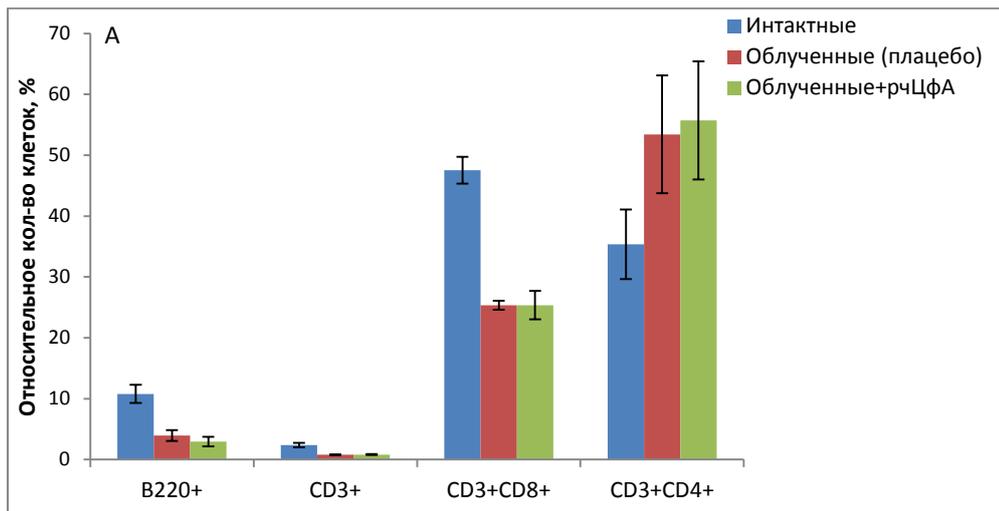
### 3.1.2.3. Анализ субпопуляционного состава клеток костного мозга облученных мышей

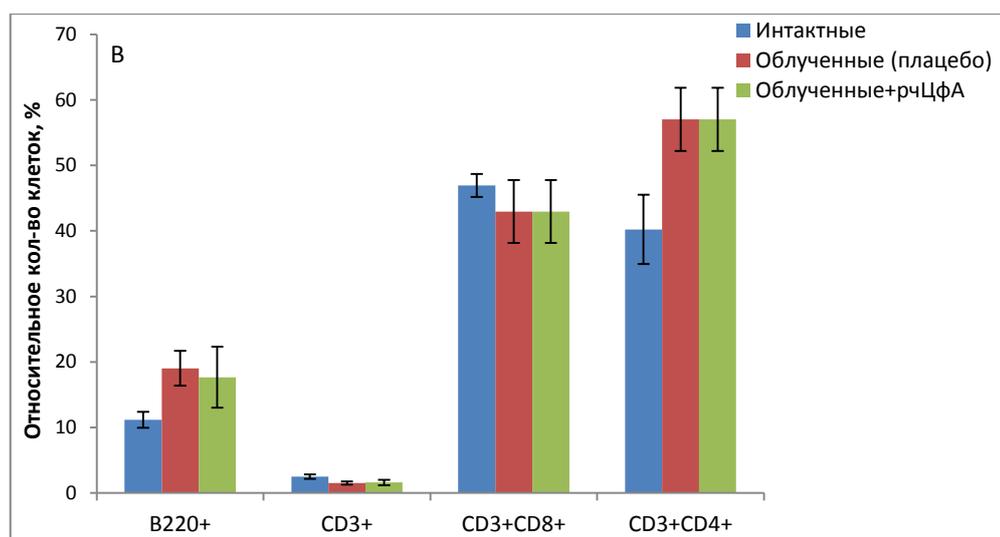
Было показано, что рЦФА не влияет на динамику восстановления абсолютного количества клеток костного мозга (табл. 8) и не изменяет соотношение субпопуляций клеток с фенотипом Sca-1+, Sca-1+CD31+, Sca-1-CD31+, CD31+Gr-1+CD11b+, представляющих собой предшественники различной степени зрелости (рис. 14). Кроме того, данный белок не участвует в восстановлении относительного количества В-клеток (B220+) и Т-клеток (CD3+) и не вызывает изменений в соотношении Т-хелперов (CD3+CD4+) и Т-киллеров (CD3+CD8+) в костном мозге облученных мышей (рис. 15).





**Рисунок 14 -** Динамика изменения относительного количества (%) клеток различных популяций в костном мозге мышей линии C57BL/6 под действием рчЦФА через 7 (А), 14 (Б) и 21 (В) день после облучения



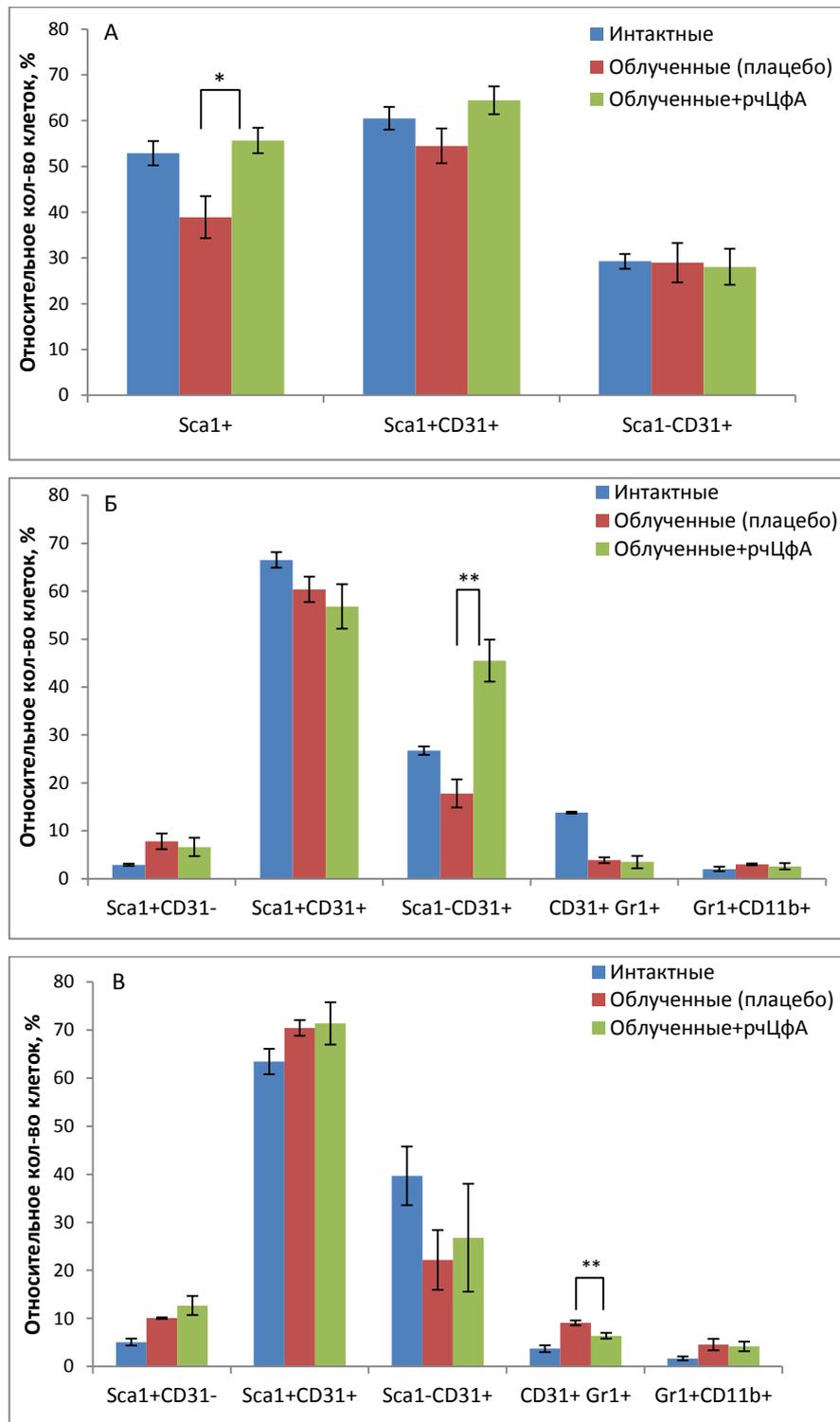


**Рисунок 15** - Динамика изменения относительного количества (%) В- (B220+) и Т-клеток (CD3+), в том числе Т-хелперов (CD3+CD4+) и Т-киллеров (CD3+CD8+) в костном мозге мышей линии C57BL/6 под действием рЦФА через 7 (А), 14 (Б) и 21(В) день после облучения

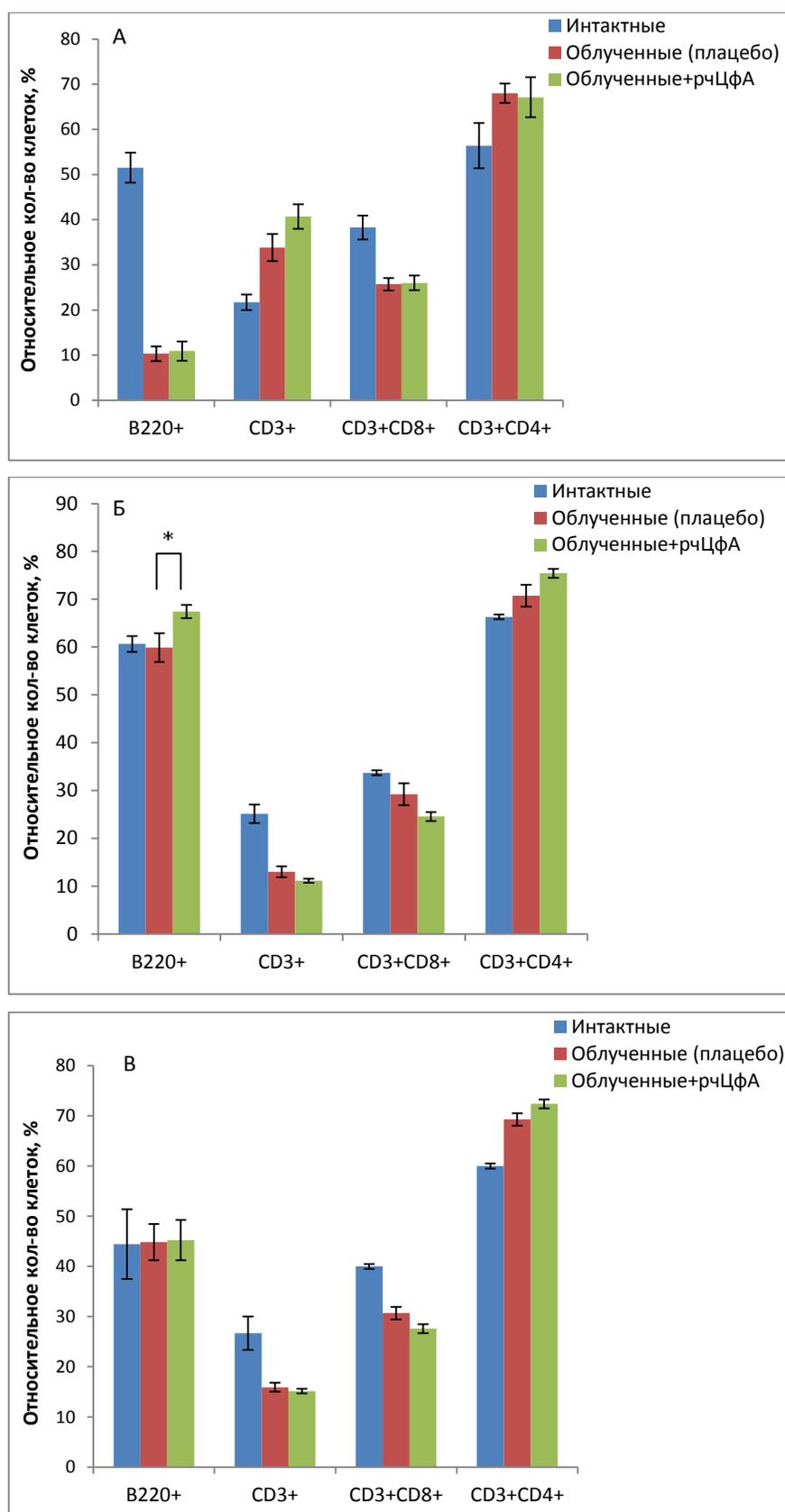
#### ***3.1.2.4. Анализ субпопуляционного состава клеток селезенки облученных мышей***

Анализ субпопуляций клеток селезенки показал, что в течение первой недели после облучения под действием рЦФА происходит восстановление пула Sca-1+ клеток до значений в группе необлученных мышей ( $p \leq 0,05$  при сравнении с облученными мышами, рис. 16). Через 14 дней после облучения наблюдалось достоверное увеличение пула более коммитированных предшественников Sca-1-CD31+ в селезенке животных, обработанных рЦФА, по сравнению с обеими контрольными группами ( $p \leq 0,01$ , рис. 16). К 3 неделе относительное количество клеток различных популяций в обеих группах облученных животных не имело существенных различий, за исключением незрелых гранулоцитов CD31+Gr1+, доля которых под действием рЦФА была снижена ( $p \leq 0,05$  при сравнении с облученными мышами, рис. 16). Кроме того, исследуемый белок стимулировал увеличение относительного количества В-клеток через 2 недели после облучения ( $p \leq 0,05$  при сравнении с обеими контрольными группами) с последующим

восстановлением до нормы (рис. 17), но не повлиял на динамику восстановления Т-клеток (рис. 17).



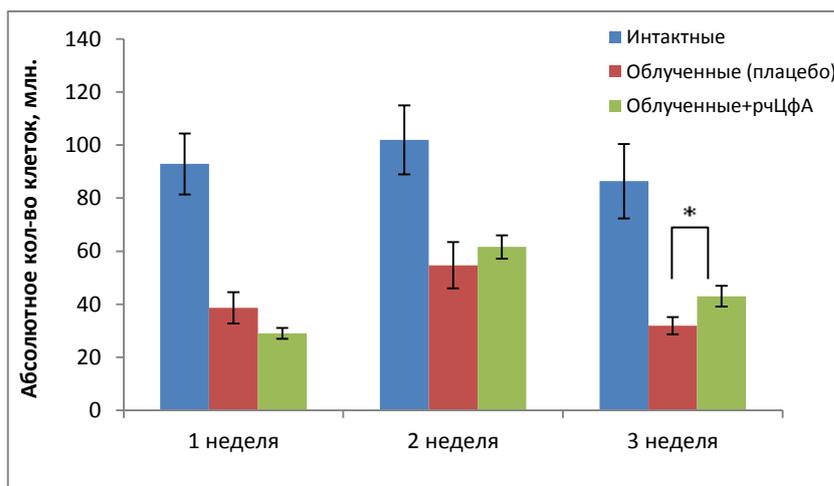
**Рисунок 16** - Динамика изменения относительного количества (%) клеток различных популяций в селезенке мышей линии C57BL/6 под действием рЦФА через 7 (А), 14 (Б) и 21 (В) день после облучения. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$



**Рисунок 17** - Динамика изменения относительного количества (%) В- (B220+) и Т-клеток (CD3+) в селезенке мышей линии C57BL/6 под действием рЦФА через 7 (А), 14 (Б) и 21 (В) день после облучения. \* $p \leq 0,05$

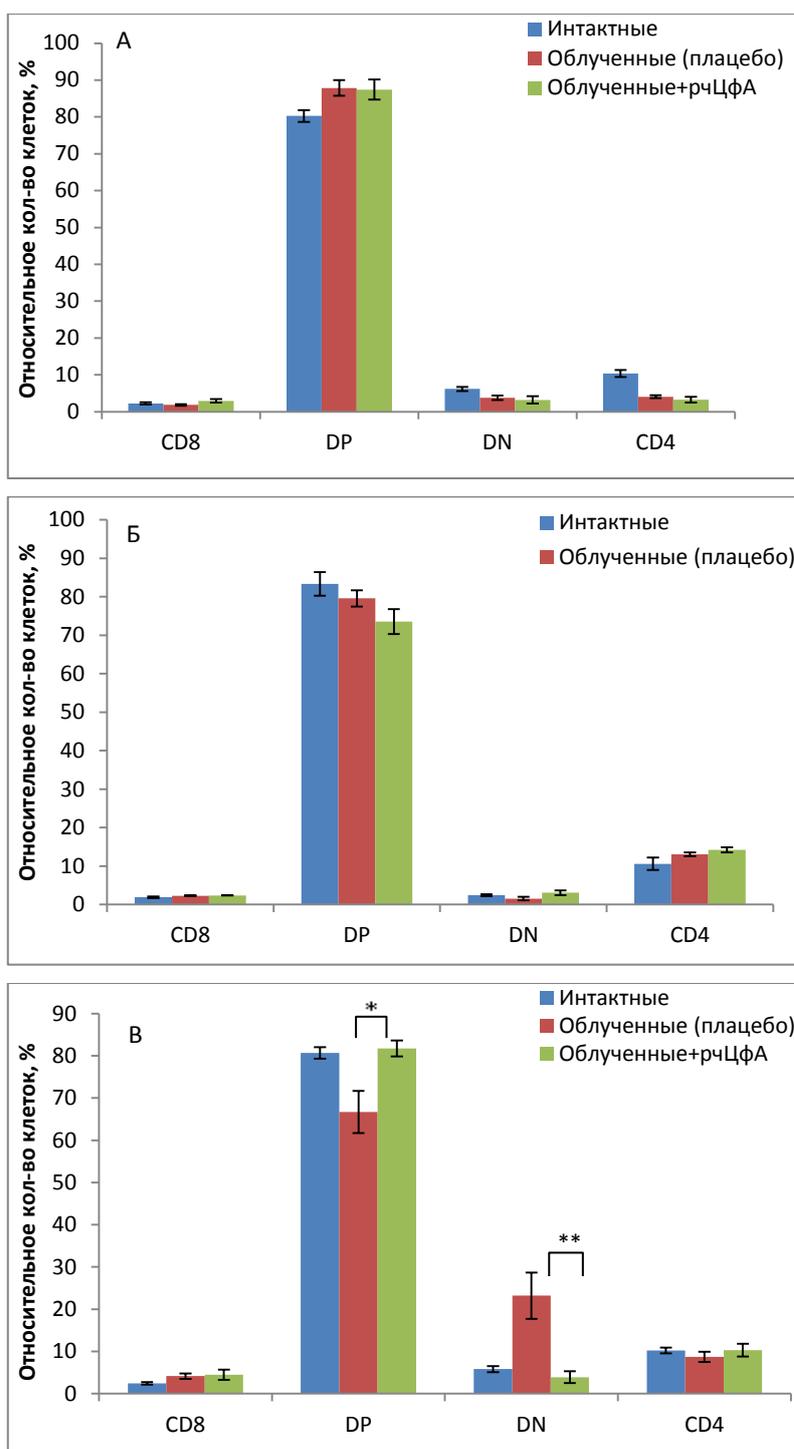
### 3.1.2.5. Анализ субпопуляционного состава клеток тимуса облученных мышей

Сублетальное облучение мышей сопровождается двумя пиками снижения абсолютного количества тимоцитов: на 7 и 21 день (рис. 18, табл. 8). При этом под действием рЧЦФА повторная лимфопения развивается в меньшей степени по сравнению с контрольной группой облученных мышей ( $p \leq 0,05$ ).



**Рисунок 18** - Динамика изменения абсолютного количества лимфоцитов ( $\times 10^6$ ) в тимусе мышей линии C57BL/6 на различные сроки после облучения.  $*p \leq 0,05$

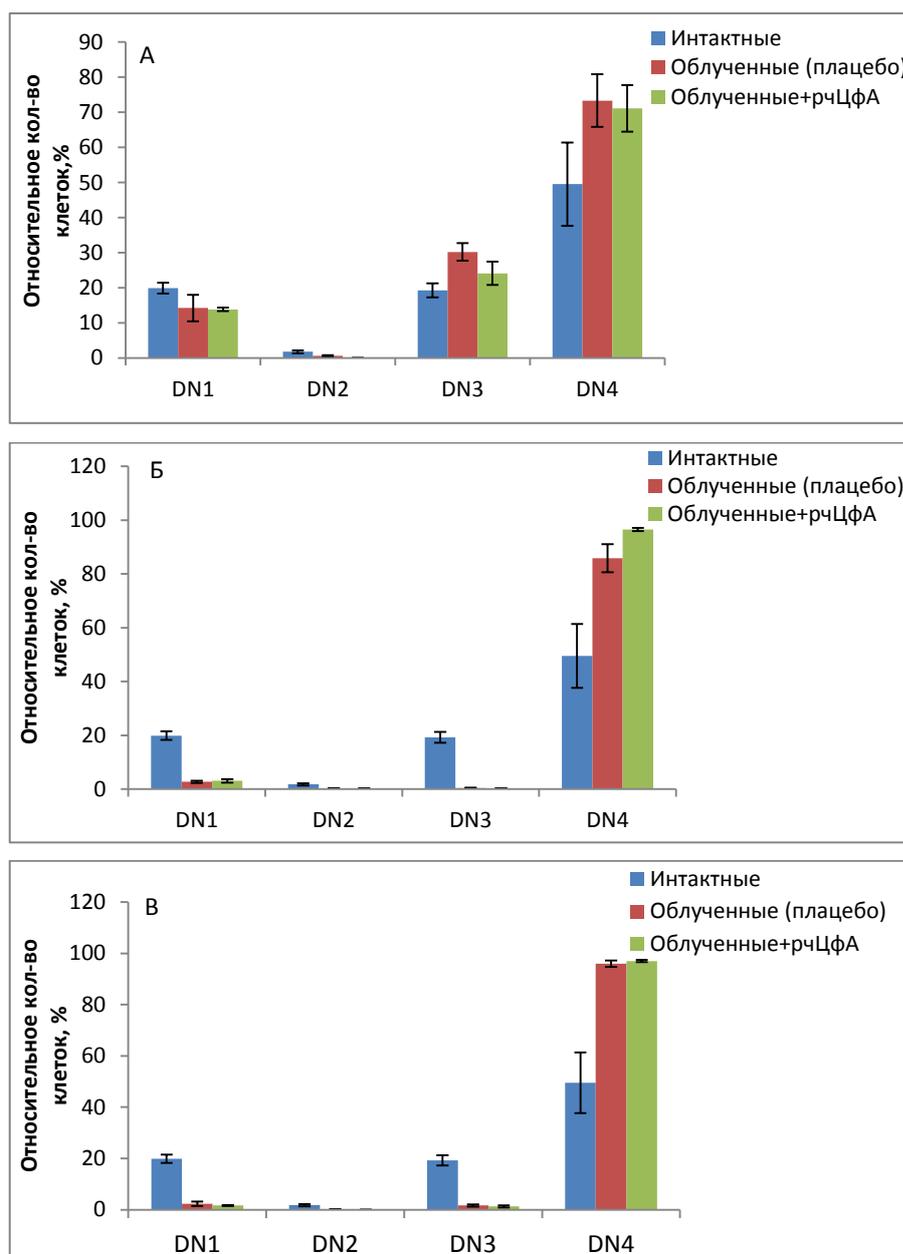
При анализе относительного количества двойных негативных CD8-CD4- (double negative, DN), двойных позитивных CD8+CD4+ (double positive, DP) и однопозитивных CD8+ и CD4+ тимоцитов было показано, что рЧЦФА не оказывал влияния на динамику восстановления данных субпопуляций клеток в течение 14 дней после облучения (рис. 19 А, Б). Однако к 3 неделе под действием исследуемого белка наблюдалось восстановление соотношения основных популяций тимоцитов до значений в группе необлученных животных (рис. 19 В).



**Рисунок 19** - Динамика изменения относительного количества (%) основных популяций клеток тимуса мышей линии C57BL/6 под действием рчЦФА через 7 (А), 14 (Б) и 21 (В) день после облучения. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$

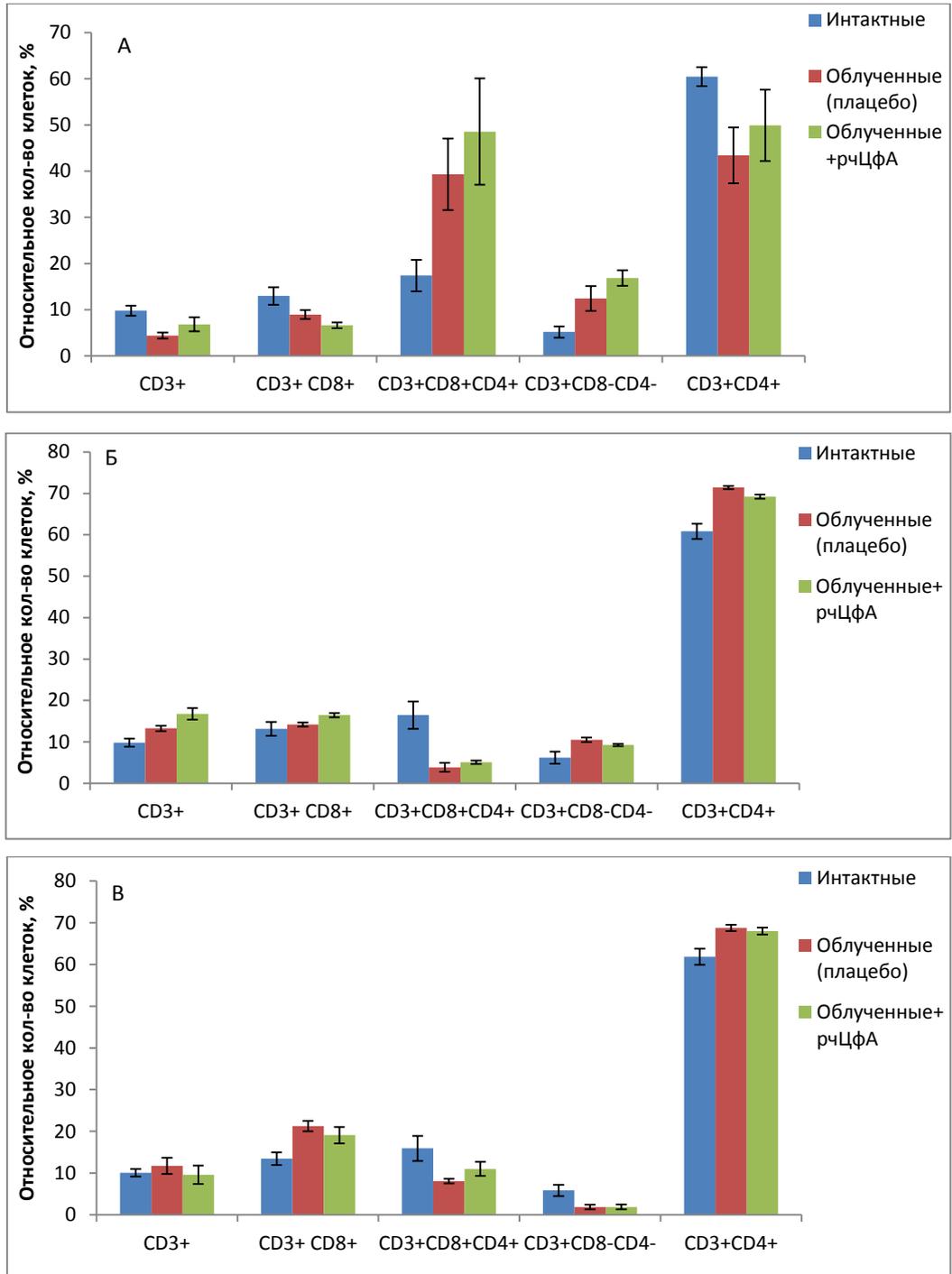
Менее зрелые DN тимоциты проходят 4 стадии развития, которые характеризуются изменением профиля экспрессии поверхностных маркеров CD25 и CD44: CD25-CD44<sup>+</sup> (DN1), CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> (DN2), CD25<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup> (DN3) и

CD25-CD44- (DN4). На всех сроках наблюдения после сублетального облучения было выявлено увеличение относительного количества наиболее зрелых DN тимоцитов (DN4) за счет снижения доли менее зрелых форм (DN1-3) (рис. 20). Это может быть обусловлено большей радиочувствительностью наименее зрелых тимоцитов. Введение рЦфА не оказало влияния на соотношение субпопуляций DN клеток в тимусе облученных мышей.



**Рисунок 20** - Динамика изменения относительного количества (%) DN тимоцитов на различных стадиях развития в тимусе мышей линии C57BL/6 под действием рЦфА через 7 (**А**), 14 (**Б**) и 21 (**В**) день после облучения

При анализе более зрелых тимоцитов, экспрессирующих маркер CD3, под действием рЧЦФА не было обнаружено изменение общего количества CD3+ клеток, а также соотношения основных популяций CD3+ клеток (однопозитивных CD8 и CD4, DP, DN) ни на одном из сроков наблюдения (рис. 21).



**Рисунок 21** - Динамика изменения относительного количества (%) CD3+

клеток в тимусе мышей линии C57BL/6 под действием рЧЦФА через 7 (А), 14 (Б) и 21 (В) день после облучения

**Таким образом, при сублетальном облучении рЧЦФА не влияет на процессы восстановления костного мозга, но усиливает миграцию ГСК в селезенку, способствуя регенерации гранулоцитопоза и В-лимфопоза в периферических органах. Курсовое введение исследуемого белка стимулирует восстановление тимуса облученных животных.**

### **3.1.3. Влияние рЧЦФА на субпопуляционный состав органов кроветворной и иммунной систем мышей после воздействия химиопрепарата**

В данном исследовании использовали 5-фторурацил (5ФУ) - антиметаболит группы структурных аналогов пиримидина. 5ФУ является классическим химиопрепаратом, который широко используют при терапии злокачественных новообразований различного гистогенеза. В данном исследовании 5ФУ вводили двукратно мышам внутрибрюшинно в дозе 40 мг/кг с интервалом 96 ч (суммарная доза препарата составила 80 мг/кг). Обработку животных рЧЦФА начинали через 3 часа после введения первой дозы 5ФУ и проводили в течение 7 дней; в день введения второй дозы 5ФУ рЧЦФА вводили через 3 часа после химиопрепарата. Через 24 ч, 3 и 7 дней после окончания введения 5ФУ подсчитывали абсолютное количество лейкоцитов в костном мозге, селезенке, тимусе и периферической крови мышей, а также проводили анализ субпопуляционного состава клеток данных органов.

#### ***3.1.3.1. Анализ субпопуляционного состава клеток периферической крови мышей после введения 5ФУ***

Поскольку рЧЦФА содержит незначительную примесь ЛПС штамма - продуцента *E. coli*, в данном исследовании в качестве контроля отдельной группе

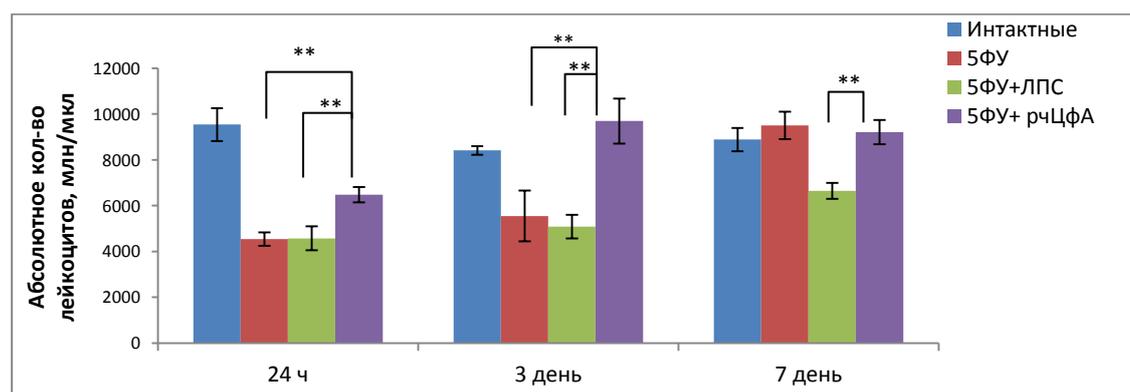
животных вводили ЛПС *E. coli* (Sigma, США) в дозе, эквивалентной его количеству в примеси исследуемого белка. В качестве плацебо мышам, обработанным 5ФУ, вводили PBS по схеме аналогичной введению рЦфА или ЛПС.

Анализ абсолютного количества лейкоцитов в периферической крови животных показал, что под действием рЦфА 5ФУ-индуцированная лейкопения развивается в меньшей степени, и при этом происходит ускоренное восстановление количества лейкоцитов до нормы к 3 дню по сравнению с 7 днем для группы контрольных мышей (5ФУ-плацебо) (табл. 10, рис. 22). Стоит особо отметить, что ЛПС в используемой дозе не только не участвует в восстановлении лейкоцитов в крови, но и замедляет этот процесс.

**Таблица 10** - Количество лейкоцитов ( $\times 10^6/\text{мл}$ ) в крови мышей линии C57BL/6 после обработки 5ФУ

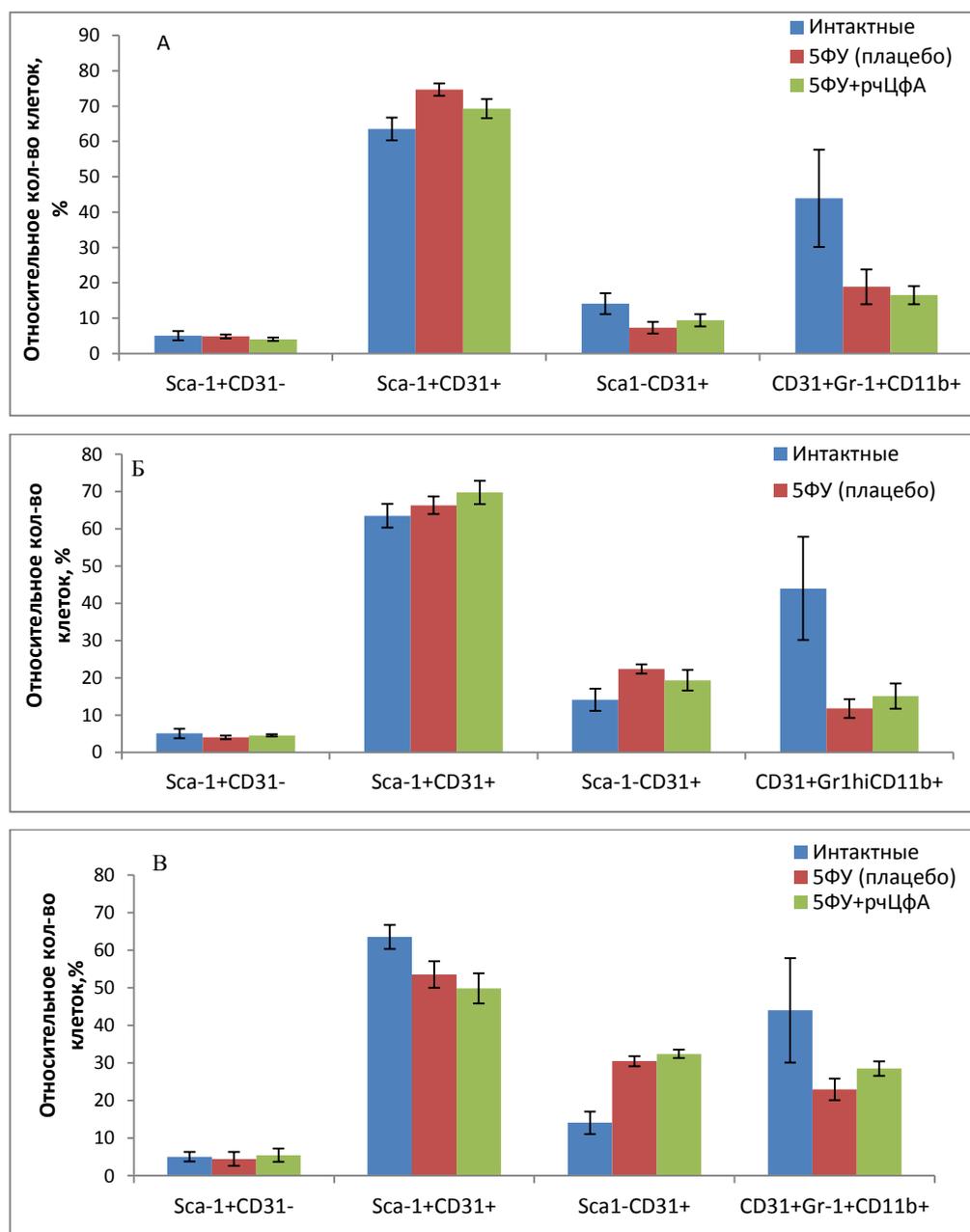
Группа	Срок анализа после введения 5ФУ		
	24 часа	3 день	7 день
Интактные мыши	9537,5 $\pm$ 717,2	8411,0 $\pm$ 190,0	8827,0 $\pm$ 520,5
5ФУ (плацебо)	4540,0 $\pm$ 286,8	5550 $\pm$ 1102,0	9500,0 $\pm$ 602,4
5ФУ+ ЛПС	4570,0 $\pm$ 521,4	5080,0 $\pm$ 514,9	6641,7 $\pm$ 347,0
5ФУ+ рЦфА	6480,0 $\pm$ 335,9**	9690 $\pm$ 987,0**	9212,5 $\pm$ 528,1***

\*\*  $p \leq 0,001$  по сравнению с группами 5ФУ и 5ФУ+ ЛПС; \*\*\* $p \leq 0,001$  по сравнению с группой 5ФУ+ ЛПС



**Рисунок 22** - Динамика восстановления абсолютного количества лейкоцитов в крови мышей линии C57BL/6 после обработки 5ФУ.  $**p \leq 0,001$

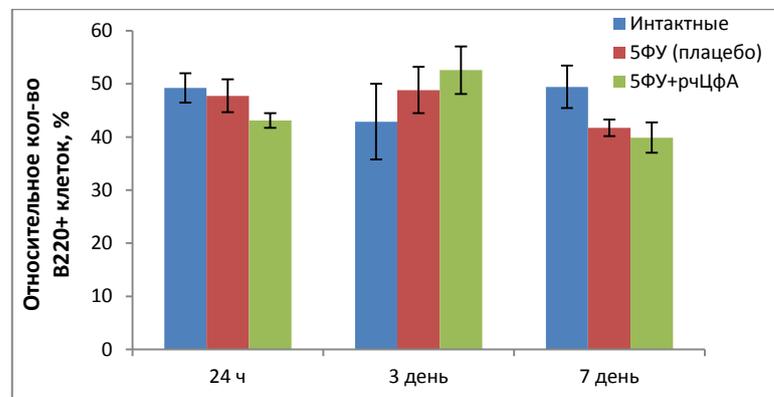
Далее проводили анализ субпопуляционного состава клеток крови экспериментальных животных по маркерам Sca-1, CD31, Gr-1, CD11b (рис. 23).



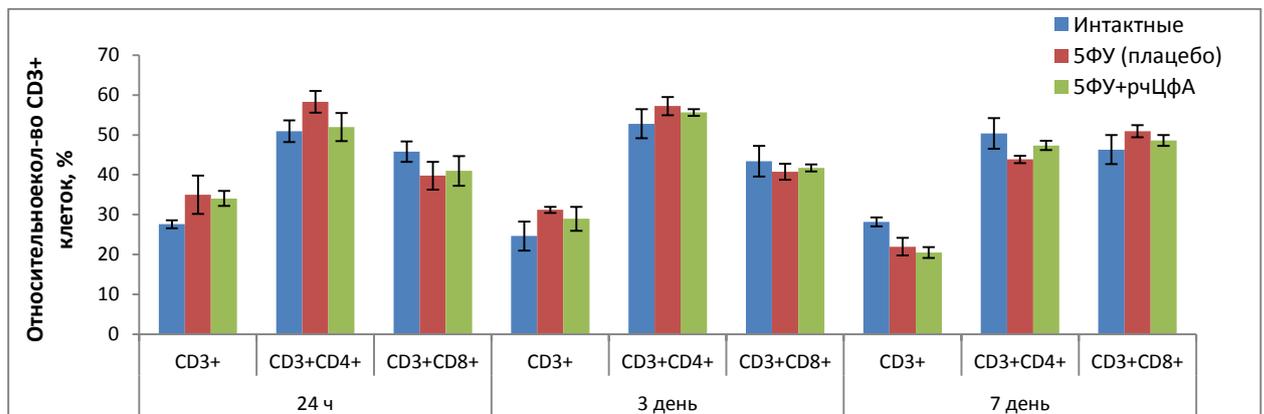
**Рисунок 23** - Динамика изменения относительного количества (%) клеток различных популяций в периферической крови мышей линии C57BL/6 под действием рЦФА через 24 ч (**А**), 3 дня (**Б**) и 7 дней (**В**) после введения 5ФУ.  $*p \leq 0,05$

Как видно из рисунка 23, введение рЦфА не влияет на динамику восстановления относительного количества стволовых клеток (Sca-1+), коммитированных предшественников (Sca-1-CD31+) и незрелых гранулоцитов (CD31+Gr-1+CD11b+) после введения 5ФУ. Исследуемый белок также не воздействует на процессы восстановления зрелых гранулоцитов в периферической крови экспериментальных животных.

Введение рЦфА мышам, обработанным 5ФУ, не приводит к изменению относительного количества В- и Т-клеток, а также соотношения Т-хелперов (CD3+CD4+) и Т-киллеров (CD3+CD8+) в их крови (рис. 24 и 25 соответственно).



**Рисунок 24** - Динамика изменения относительного количества (%) В-клеток в периферической крови мышей линии C57BL/6 под действием рЦфА после введения 5ФУ



**Рисунок 25** - Динамика изменения относительного количества (%) Т-клеток в периферической крови мышей линии C57BL/6 под действием рЦфА после введения 5ФУ

### 3.1.3.2. Анализ субпопуляционного состава клеток костного мозга мышей после введения 5ФУ

Через 3 дня после введения 5ФУ в костном мозге мышей развивается лейкопения. При этом введение рчЦФА приводит к еще большему снижению абсолютного количества лейкоцитов ( $p \leq 0,05$  по сравнению с группой 5ФУ-плацебо) (табл. 11). Вероятно, исследуемый белок стимулирует миграцию клеток костного мозга на периферию, за счет чего на данном сроке происходит полное восстановление количества лейкоцитов в периферической крови до нормы (см. выше, табл. 10, рис. 22). К 7 дню после введения 5ФУ под действием рчЦФА наблюдается восстановление клеточности костного мозга до показателей интактных животных, при этом в группе 5ФУ-плацебо данный показатель не достигает контрольных значений (табл. 11).

**Таблица 11** - Количество клеток ( $\times 10^6$ ) в костном мозге мышей линии C57BL/6 после обработки 5ФУ

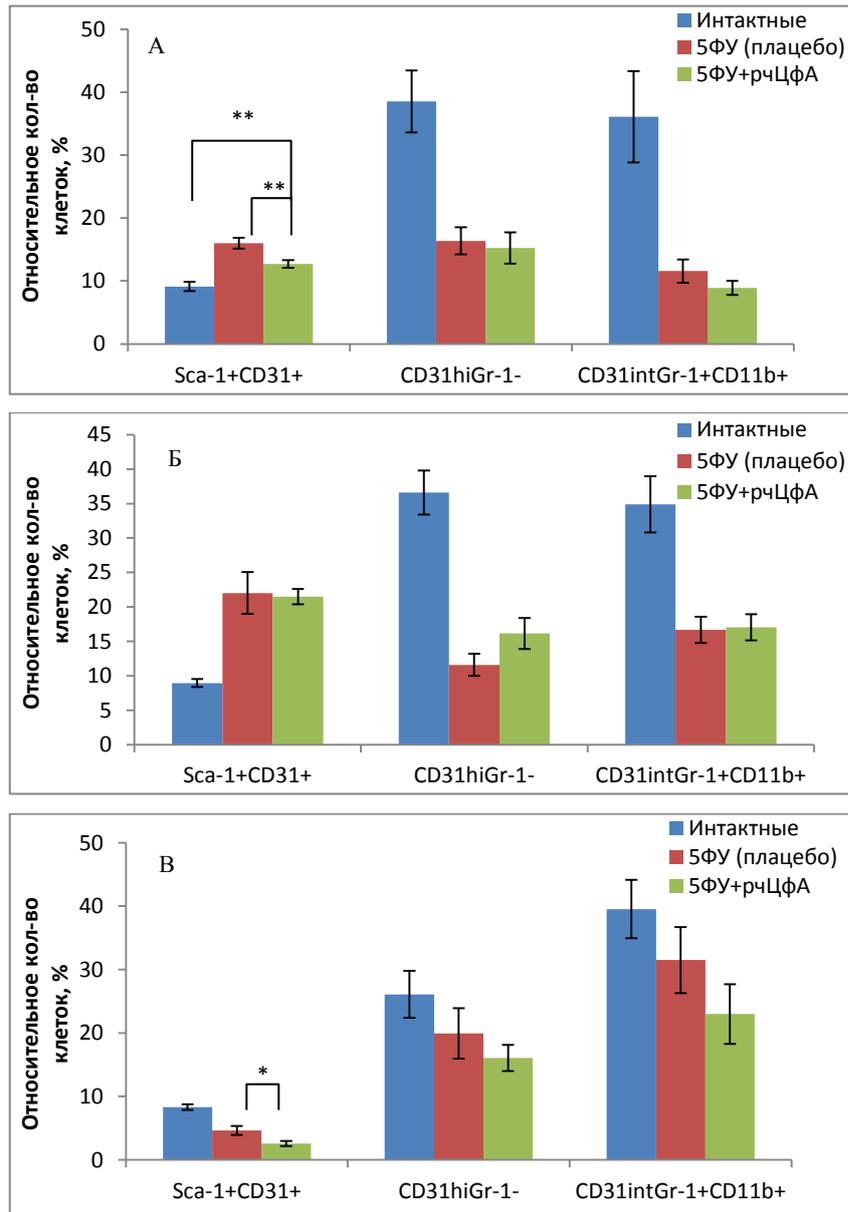
Группа	Срок анализа после введения 5ФУ		
	24 часа	3 день	7 день
Интактные мыши	22,6 ± 2,3	21,2 ± 2,3	22,2 ± 2,1
5ФУ (плацебо)	21,6 ± 1,5	10,2 ± 1,2	15,1 ± 1,1
5ФУ+ рчЦФА	18,8 ± 2,2	5,9 ± 0,9*	22,7 ± 2,5*

\* $p \leq 0,05$  по сравнению с группой 5ФУ-плацебо

При анализе субпопуляционного состава клеток костного мозга было показано, что под действием рчЦФА происходит плавное увеличение популяции ранних коммитированных предшественников Sca-1+CD31+: через 24 часа после введения 5ФУ относительное количество данных клеток ниже по сравнению с группой 5ФУ-плацебо ( $p \leq 0,01$ ), но, тем не менее, достоверно превышает значения в группе интактных мышей ( $p \leq 0,01$ ) (рис. 26А). К 3 дню данный эффект нивелируется, однако через 7 дней наблюдается значительное уменьшение относительного количества клеток Sca-1+CD31+ по сравнению с группой 5ФУ-плацебо ( $p \leq 0,05$ ). Такая динамика коммитированных предшественников

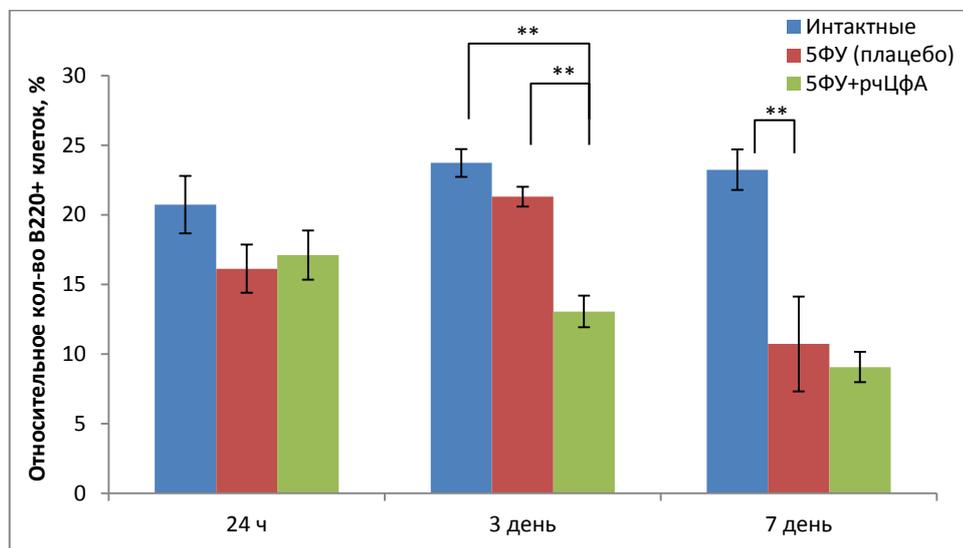
Sca1+CD31+ под влиянием рЦФА может быть обусловлена миграцией этих клеток из костного мозга и стимуляцией регенеративных процессов в периферических органах.

Исследуемый белок не оказал влияния на динамику восстановления незрелых гранулоцитов (CD31intGr-1+CD11b+) и клеток негранулоцитарного ряда (CD31hiGr-1-) в костном мозге (рис. 26).



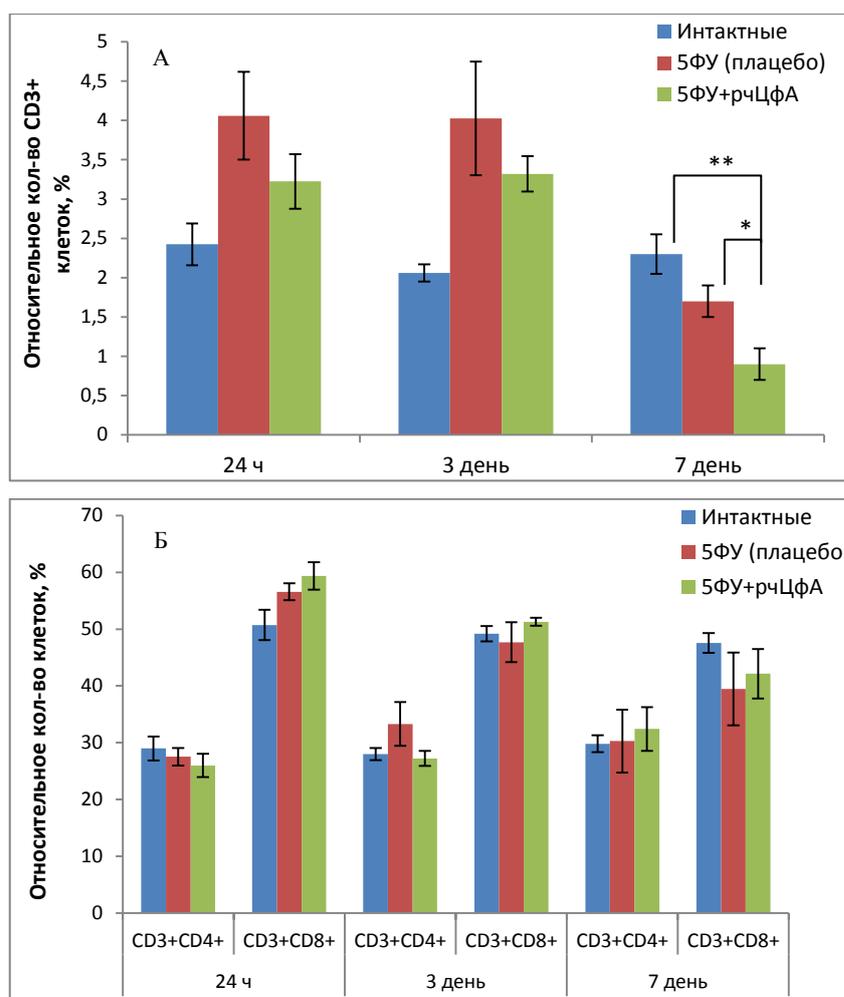
**Рисунок 26** - Динамика изменения относительного количества (%) клеток различных популяций в костном мозге мышей линии C57BL/6 под действием рЦФА через 24 ч (А), 3 дня (Б) и 7 дней (В) после введения 5ФУ. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$

Введение рчЦФА приводит к снижению относительного количества В-клеток в костном мозге ( $p \leq 0,01$  по сравнению с контрольными группами) через 3 дня после обработки мышей 5ФУ. При этом под действием самого химиопрепарата уменьшение пула В220+ происходит только к 7 дню (рис. 27).



**Рисунок 27** - Динамика изменения относительного количества В-клеток (%) в костном мозге мышей линии C57BL/6 под действием рчЦФА после введения 5ФУ. \*\*  $p \leq 0,01$

Введение рчЦФА не вызывает изменения пула Т-клеток в костном мозге мышей в течение первых 3 дней после обработки животных 5ФУ, но приводит к достоверному снижению относительного количества данных клеток к 7 дню ( $p \leq 0,05$  по сравнению с группой 5ФУ-плацебо;  $p \leq 0,01$  по сравнению с группой интактных мышей) (рис. 28А). При этом ни на одном из сроков наблюдения не отмечалось изменение соотношения Т-хелперов (CD3+CD4+) и Т-киллеров (CD3+CD8+) (рис. 28Б).



**Рисунок 28** - Влияние рцЦФА на динамику изменения относительного количества **А)** Т- клеток (%) и **Б)** Т-хелперов (CD3+CD4+) и Т-киллеров (CD3+CD8+) в костном мозге мышей линии C57BL/6 после введения 5ФУ. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

### **3.1.3.3 Анализ субпопуляционного состава клеток селезенки мышей после введения 5ФУ**

Подсчет абсолютного количества спленоцитов показал, что рцЦФА препятствует развитию лейкопении, которая наблюдается в селезенке мышей через 24 ч после введения 5ФУ (табл. 12).

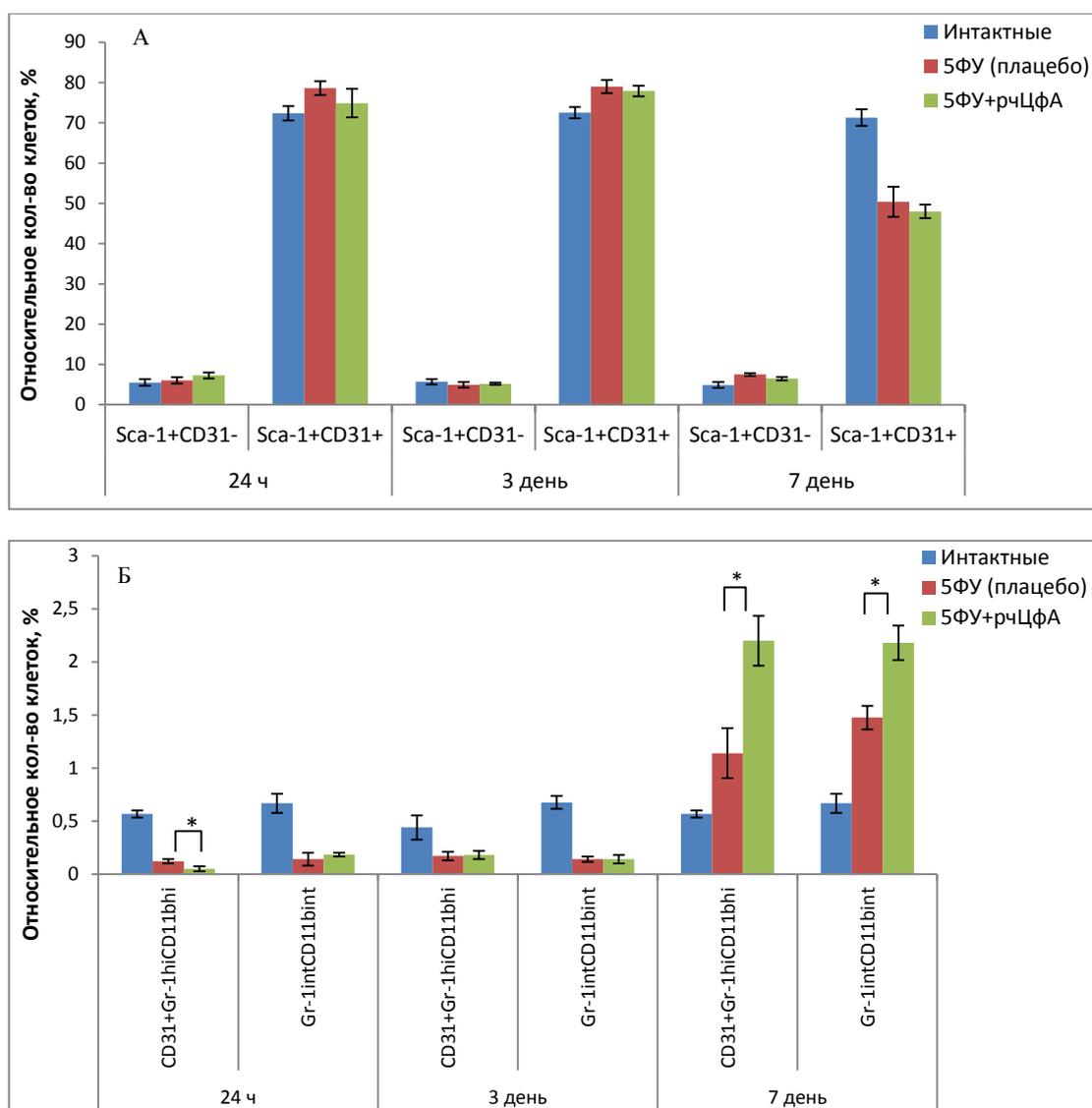
**Таблица 12** - Количество лейкоцитов ( $\times 10^6$ ) в селезенке мышей линии C57BL/6 после обработки 5ФУ

Группа	Срок анализа после введения 5ФУ		
	24 часа	3 день	7 день
Интактные мыши	125,6 ± 7,6	129,0 ± 15,2	119,3 ± 6,0
5ФУ (плацебо)	84,8 ± 3,4	96,7 ± 7,3	153,3 ± 11,4
5ФУ+ рчЦфА	99,5 ± 4,4*	99,4 ± 3,4	146,3 ± 17,5

\* $p \leq 0,05$  по сравнению с группой 5ФУ-плацебо

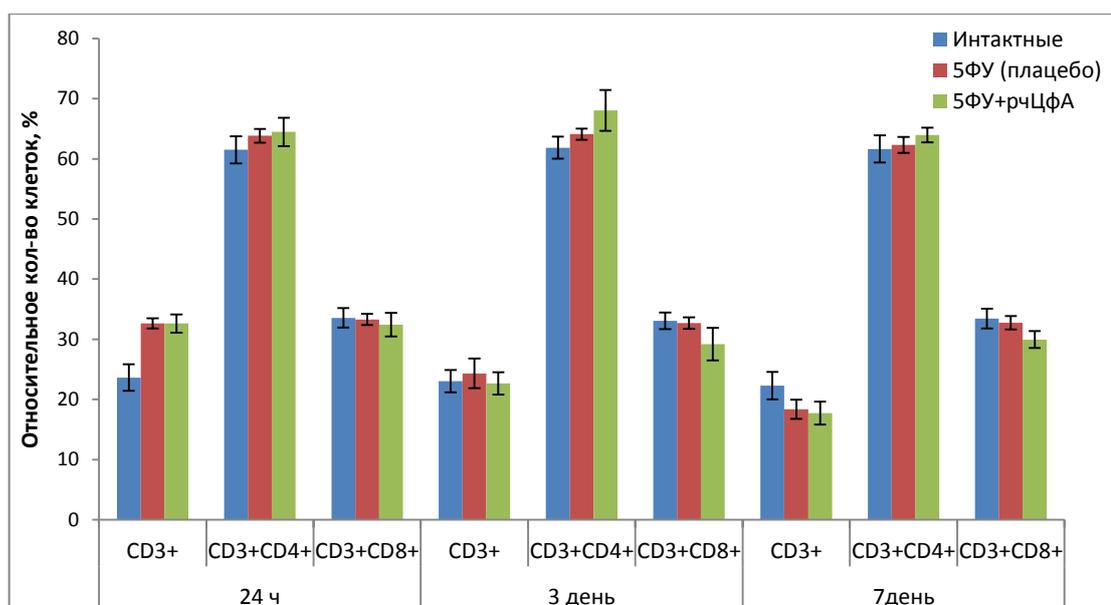
При анализе субпопуляционного состава клеток селезенки оценивали относительное количество незрелых клеток, несущих маркер стволовых клеток (Sca-1+CD31-), коммитированных предшественников (Sca-1+CD31+), незрелых гранулоцитов (CD31+Gr-1hiCD11bhi) и промиелоцитов и миелоцитов (Gr-1intCD11bint) (рис. 29). Было показано, что популяция клеток Sca-1+CD31- не подвергается изменению под действием химиопрепарата и рчЦфА. Популяция Sca-1+CD31+ клеток сокращается к 7 дню после введения 5ФУ, при этом рчЦфА не оказывает влияния на восстановление пула данных клеток (рис. 29А).

Введение рчЦфА приводит к снижению количества незрелых гранулоцитов (CD31+Gr-1hiCD11bhi) через 24 ч после введения 5ФУ ( $p \leq 0,05$  по сравнению с группой 5ФУ-плацебо), однако к 3 дню данный эффект нивелируется (рис. 29Б). К 7 дню под действием исследуемого белка наблюдается достоверный рост пула незрелых гранулоцитов и промиелоцитов и миелоцитов ( $p \leq 0,01$  сравнению с группой 5ФУ-плацебо; рис. 29Б), что может свидетельствовать о более активном процессе восстановления гранулоцитопоэза.

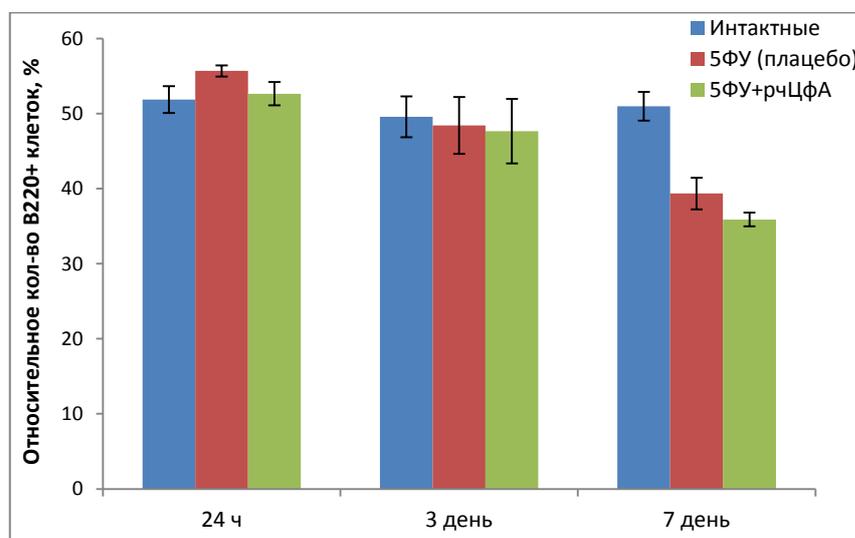


**Рисунок 29** - Динамика изменения относительного количества (%) **А)** стволовых клеток (Sca-1+CD31-) и коммитированных предшественников (Sca-1+CD31+) и **Б)** незрелых гранулоцитов (CD31+Gr-1hiCD11bhi) и промиелоцитов и миелоцитов (Gr-1intCD11bint) в селезенке мышей линии C57BL/6 под действием рцЦФА через 24 ч, 3 дня и 7 дней после введения 5ФУ. \*  $p \leq 0,05$

Введение рцЦФА мышам, обработанным 5ФУ, не оказало влияния на относительное количество Т- и В-клеток в селезенке (рис. 30 и 31).



**Рисунок 30** - Динамика изменения относительного количества (%) Т-клеток, в том числе Т-хелперов (CD3+CD4+) и Т-киллеров (CD3+CD8+) в селезенке мышей линии C57BL/6 под действием рCpA через 24 ч, 3 дня и 7 дней после введения 5FU



**Рисунок 31** - Динамика изменения относительного количества (%) В-клеток в селезенке мышей линии C57BL/6 под действием рCpA через 24 ч, 3 дня и 7 дней после введения 5FU

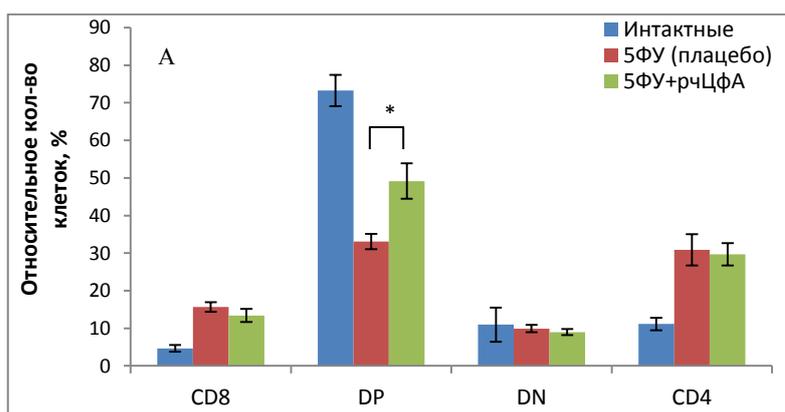
### 3.1.3.4. Анализ субпопуляционного состава клеток тимуса мышей после введения 5ФУ

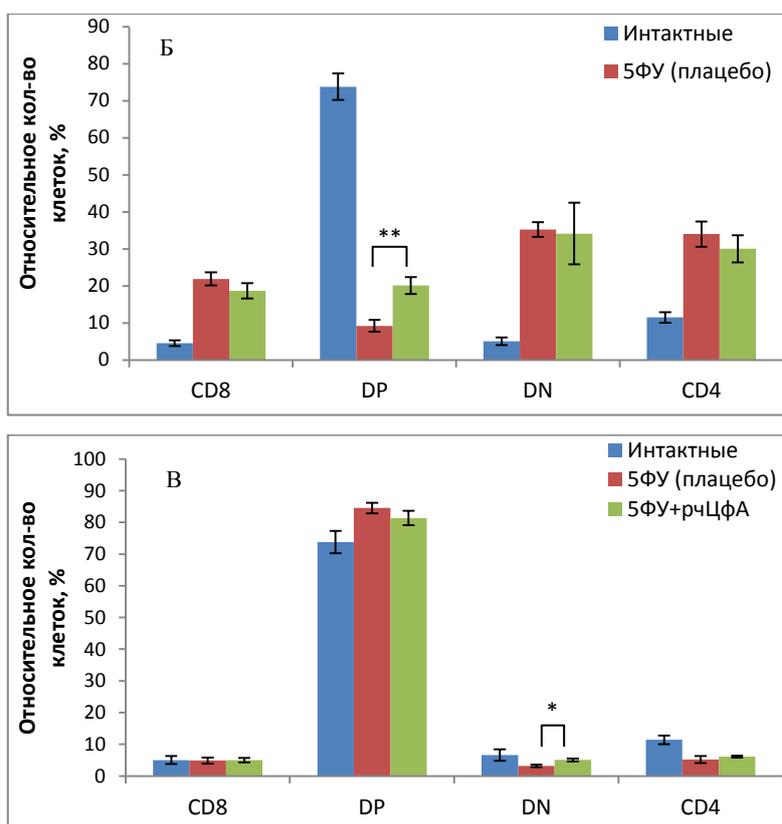
Введение рчЦФА не оказало влияния на процесс восстановления клеточности тимуса животных после воздействия химиопрепарата (табл. 13).

**Таблица 13** - Количество лейкоцитов ( $\times 10^6$ ) в тимусе мышей линии С57BL/6 после обработки 5ФУ

Группа	Срок анализа после введения 5ФУ		
	24 часа	3 день	7 день
Интактные мыши	119,4 ± 9,0	119,8 ± 11,5	110,5 ± 6,5
5ФУ (плацебо)	21,3 ± 2,7	10,6 ± 1,9	51,4 ± 10,0
5ФУ+ рчЦФА	18,5 ± 2,6	7,3 ± 1,2	52,3 ± 5,0

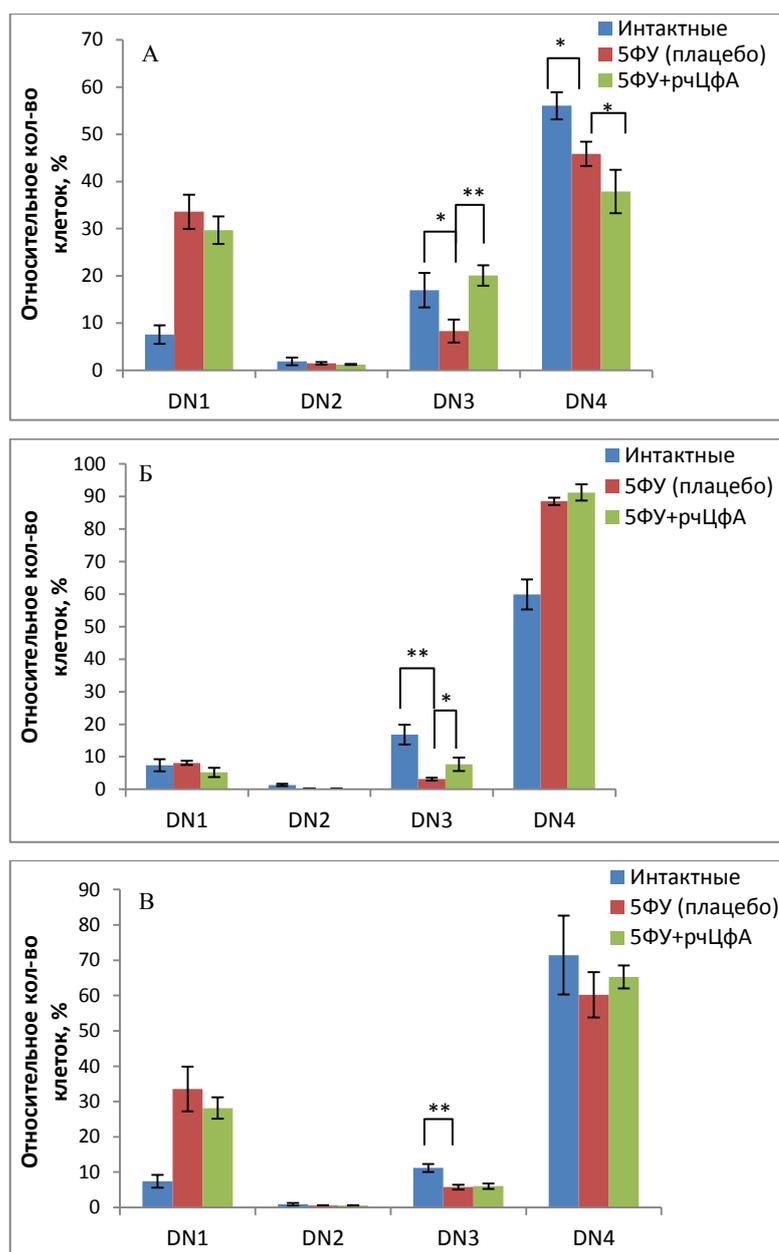
В течение первых 3 дней после введения 5ФУ рчЦФА способствует поддержанию пула DP тимоцитов (рис. 32 А,Б) и стимулирует восстановление пула DN клеток до значений в контрольной группе интактных животных к 7 дню ( $p \leq 0,05$  по сравнению с 5ФУ-плацебо; рис. 32В).





**Рисунок 32** - Динамика изменения относительного количества (%) клеток основных популяций тимуса мышей линии C57BL/6 под действием рчЦфА через 24 ч (А), 3 дня (Б) и 7 дней (В) после введения 5ФУ. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

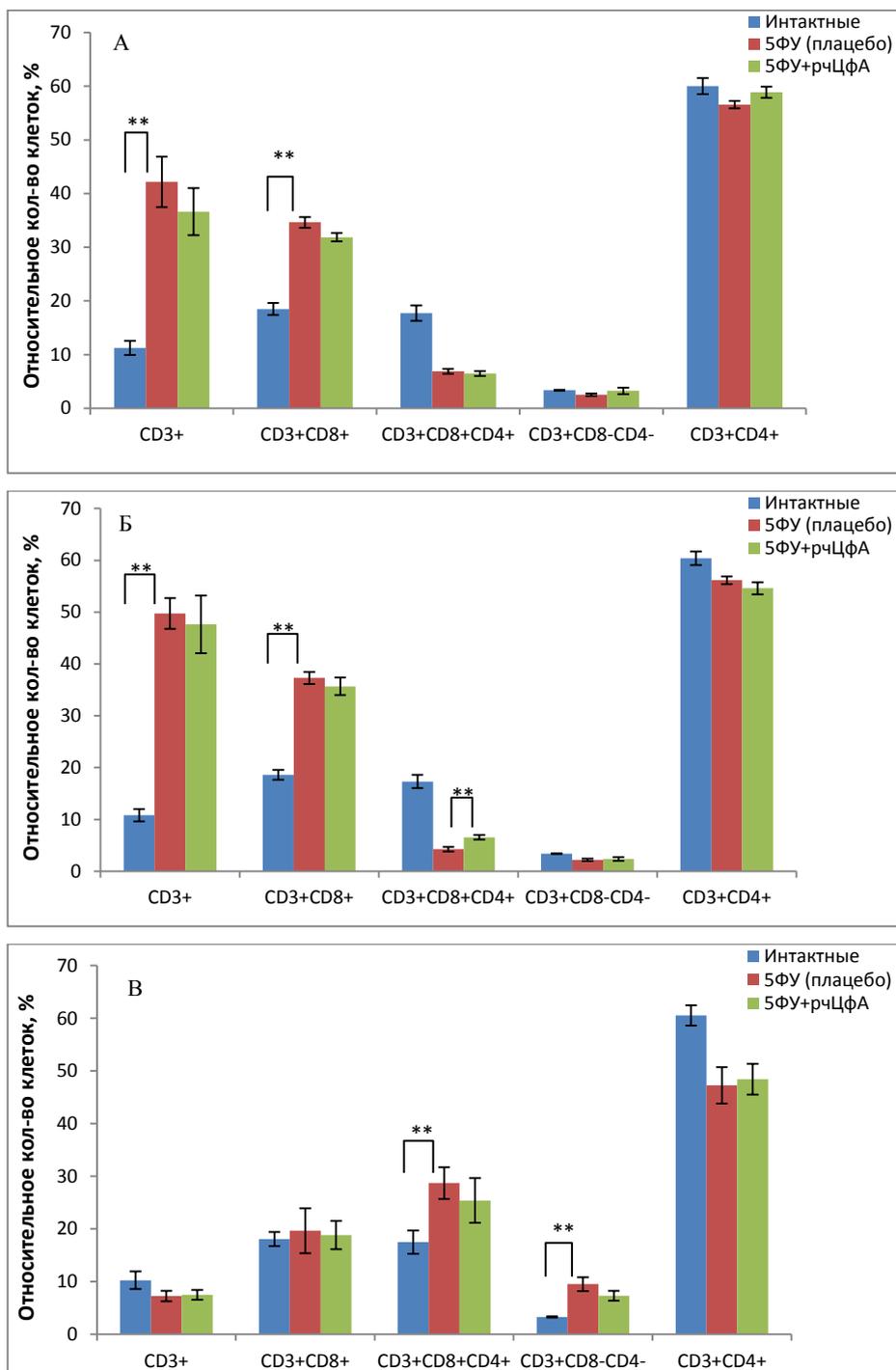
При анализе DN тимоцитов на разных стадиях развития было показано, субпопуляция DN3 клеток является наиболее чувствительной к воздействию 5ФУ: снижение относительного количества данных клеток наблюдалось на всех сроках анализа (рис. 33). Обработка экспериментальных животных рчЦфА способствовала поддержанию пула DN3 тимоцитов в течение первых 3 дней после введения химиопрепарата (рис. 33 А, Б).



**Рисунок 33** - Динамика изменения относительного количества (%) DN тимоцитов на различных стадиях развития в тимусе мышей линии C57BL/6 под действием рЦФА через 24 ч (**А**), 3 дня (**Б**) и 7 дней (**В**) после введения 5ФУ. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

В течение первых 3 дней после введения 5ФУ наблюдается увеличение доли тимоцитов, экспрессирующих маркер CD3. При этом происходит рост относительного количества клеток CD3+CD8+ за счет уменьшения популяции DP (CD3+CD8+CD4+) (рис. 34 А, Б). К 7 дню происходит восстановление количества CD3+ клеток в тимусе до нормы, однако остается измененным соотношение их

субпопуляций: доля DN и DP увеличена за счет однопозитивных CD3+CD4+ клеток (рис. 34В). На фоне воздействия химиопрепарата рЦфА не вносит существенного вклада в процесс восстановления зрелых CD3+ тимоцитов и их субпопуляций.



**Рисунок 34** - Динамика изменения относительного количества (%) CD3+ клеток в тимусе мышей линии C57BL/6 под действием рЦфА через 24 ч (А), 3 дня (Б) и 7 дней (В) после введения 5ФУ. \*\*  $p \leq 0,01$

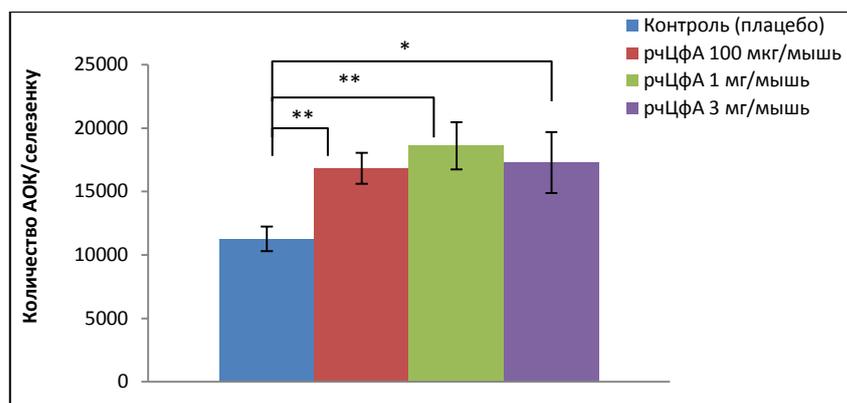
Таким образом, рчЦФА стимулирует ускоренное восстановление клеточности гемопоэтических органов после введения 5ФУ. Под действием исследуемого белка наблюдается регенерация гранулоцитопоза и лимфопоза на периферии, что сопровождается активной миграцией коммитированных предшественников Sca-1+CD31+, Т- и В-клеток из костного мозга. РчЦФА способствует восстановлению субпопуляций DN и DP тимоцитов, наиболее чувствительных к воздействию 5ФУ.

### **3.2. Оценка влияния рчЦФА на развитие иммунного ответа у интактных животных и у животных, подвергнутых воздействию высоких доз цитостатика или облучения**

#### **3.2.1. Оценка влияния рчЦФА на развитие иммунного ответа интактных мышей**

##### ***3.2.1.1. Изучение влияния рчЦФА на развитие гуморального иммунного ответа***

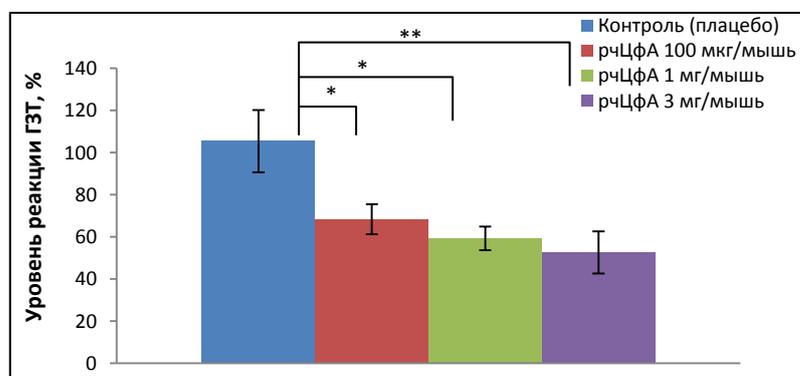
В данном исследовании использовали три дозы рчЦФА: 0,1; 1,0 и 3,0 мг/мышь (5,0; 50,0 и 150,0 мг/кг). По окончании 7-дневного введения белка мышей F1(СВА/Лас х С57BL/6) иммунизировали ЭБ для оценки количества антителообразующих клеток (АОК) (рис. 35). При всех исследуемых дозах рчЦФА обнаружено достоверное усиление гуморального иммунного ответа животных, что могло быть связано с активацией В - лимфоцитов, выявленной при курсовом введении белка (рис. 9).



**Рисунок 35** - Количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей, обработанных рЧЦФА. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,007$  (дисперсионный анализ ANOVA)

### 3.2.1.2. Изучение влияния рЧЦФА на развитие клеточного иммунного ответа

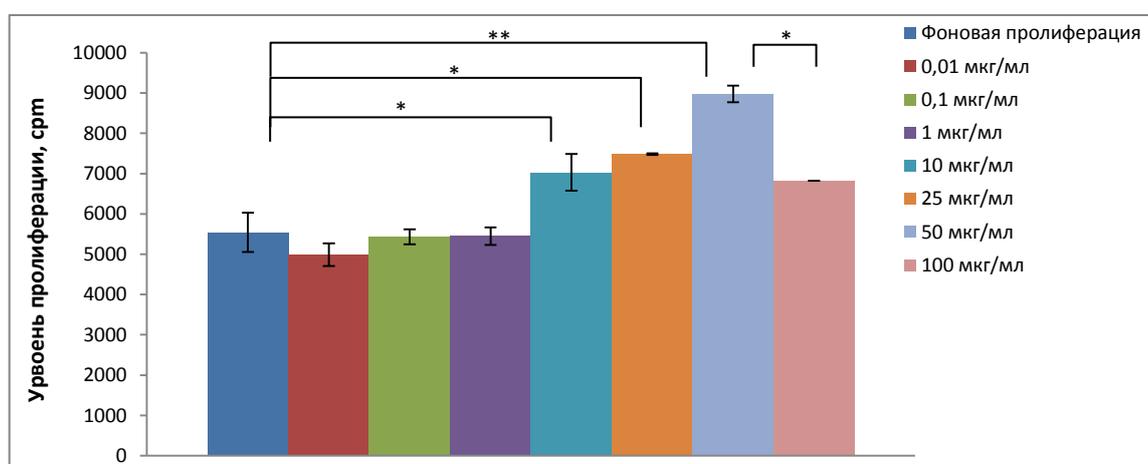
Для индукции реакции ГЗТ после 7-дневного курсового введения рЧЦФА мышей F1(СВА/Лас x С57BL/6) обрабатывали тринитробензосульфоновой кислотой (ТНБС). Это позволило не только изучить влияние исследуемого белка на развитие клеточного иммунного ответа, но и охарактеризовать риск изменения аллергостатуса животных, т.к. механизм индукции ГЗТ при введении ТНБС подобен развитию контактной аллергии ко многим химическим и лекарственным веществам, образующим комплексы с белками организма [44]. Было показано, что рЧЦФА во всех исследуемых дозах вызывает подавление реакции ГЗТ в данной экспериментальной системе (рис. 36).



**Рисунок 36** - Уровень реакции ГЗТ после курсового введения рЧЦФА. \* $p \leq 0,04$ ; \*\* $p \leq 0,002$  (дисперсионный анализ ANOVA)

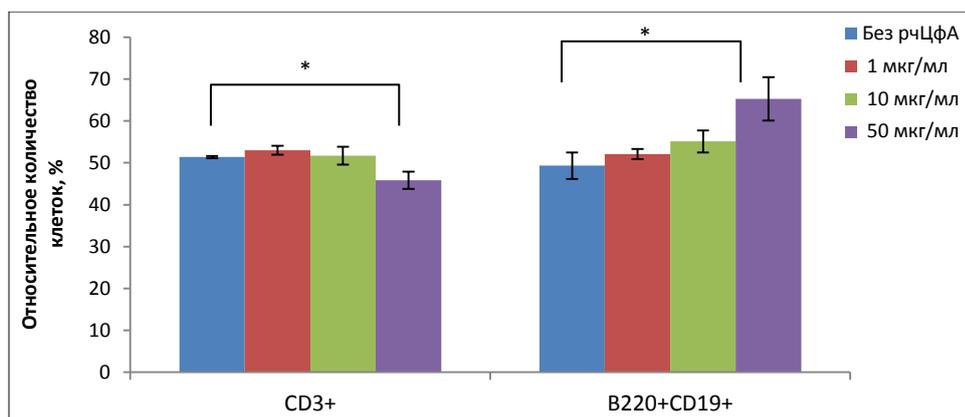
### 3.2.1.3. Оценка митогенных свойств рЦфА

Митогенные свойства рЦфА оценивали *in vitro* на клетках селезенки интактных мышей F1(СВА/Лас x С57BL/6). Внесение в культуру спленоцитов рЦфА в концентрациях 0,01 - 1,0 мкг/мл не приводило к изменению уровня пролиферации клеток относительно фоновых значений по истечении 48 ч инкубации (рис. 37). При дозах исследуемого белка 10,0 - 25,0 мкг/мл наблюдалась достоверная стимуляция клеточной пролиферации (в 1,3 раза по сравнению с фоновой пролиферацией,  $p \leq 0,02$ ). Дальнейшее усиление пролиферации (в 1,6 раза по сравнению с фоновой пролиферацией,  $p \leq 0,0001$ ) отмечалось в культуре спленоцитов с 50,0 мкг/мл рЦфА (рис. 37). Однако при максимальной концентрации рЦфА 100,0 мкг/мл наблюдалось достоверное подавление клеточной пролиферации в 1,3 раза по сравнению с предыдущей дозой данного белка (50,0 мкг/мл).



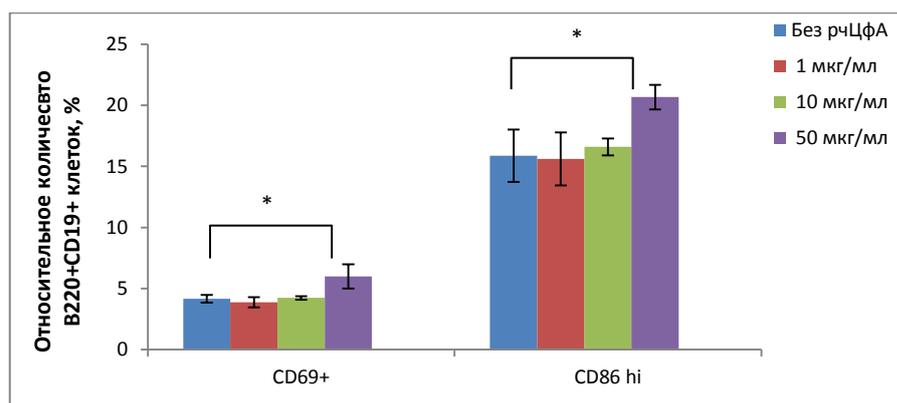
**Рисунок 37** - Уровень пролиферации клеток селезенки интактных мышей *in vitro* под влиянием рЦфА. \* $p \leq 0,02$ , \*\* $p \leq 0,0001$  (дисперсионный анализ ANOVA)

Анализ субпопуляций клеток селезенки через 48 ч культивирования *in vitro* показал, что при обработке спленоцитов 50,0 мкг/мл рЦфА происходит достоверное увеличение относительного количества В - клеток (В220+CD19+) и снижение доли Т-клеток (CD3+) (рис. 38). При более низких дозах исследуемого белка (1,0 и 10,0 мкг/мл) данный эффект не наблюдали.



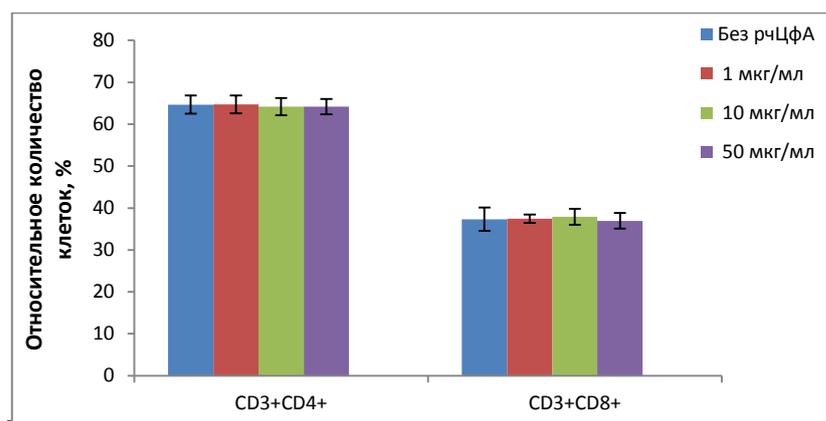
**Рисунок 38** - Относительное количество (%) Т - клеток (CD3+) и В - клеток (B200+CD19+) в культуре *in vitro* спленоцитов инактивных мышей F1(СВА/Лас х С57BL/6) после 48 ч обработки рЦФА. \*  $p \leq 0,05$

Далее провели цитофлуориметрический анализ активационного фенотипа В - клеток (рис. 39) и Т - клеток (рис. 40, рис. 41) в культуре спленоцитов через 48 ч обработки рЦФА. Было показано, что при 50,0 мкг/мл рЦФА происходит достоверное увеличение относительного количества активированных В - клеток (B220+CD19+CD69+ и B220+CD19+CD86hi) (рис. 39). Внесение в культуру спленоцитов интактных мышей меньших доз исследуемого белка не вызывало данного эффекта (рис. 39).

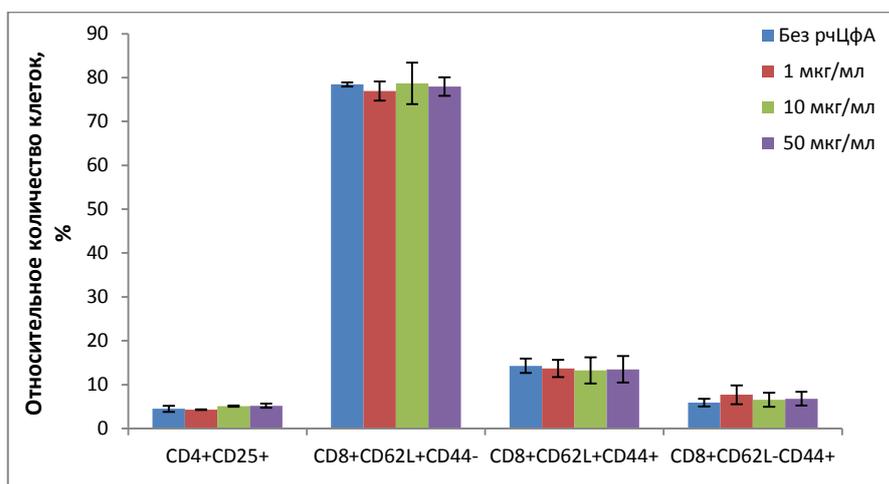


**Рисунок 39** - Относительное количество активированных В - клеток (B220+CD19+) в культуре *in vitro* спленоцитов инактивных мышей F1(СВА/Лас х С57BL/6) после 48 ч обработки рЦФА. \*  $p \leq 0,05$

Культивирование спленоцитов интактных мышей с рЦФА в концентрациях 1,0 - 50,0 мкг/мл не привело к изменению соотношения CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т - клеток (рис. 40). Относительное количество активированных Т - хелперов (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) и основных субпопуляций цитотоксических Т - лимфоцитов (наивные клетки CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>, центральные клетки памяти CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, эффекторы CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) также было без изменений (рис. 41).



**Рисунок 40** - Относительное количество (%) Т - хелперов (CD3+CD4<sup>+</sup>) и цитотоксических Т - лимфоцитов (CD3+CD8<sup>+</sup>) в культуре *in vitro* спленоцитов интактных мышей F1(СВА/Лас х С57BL/6) после 48 ч обработки рЦФА

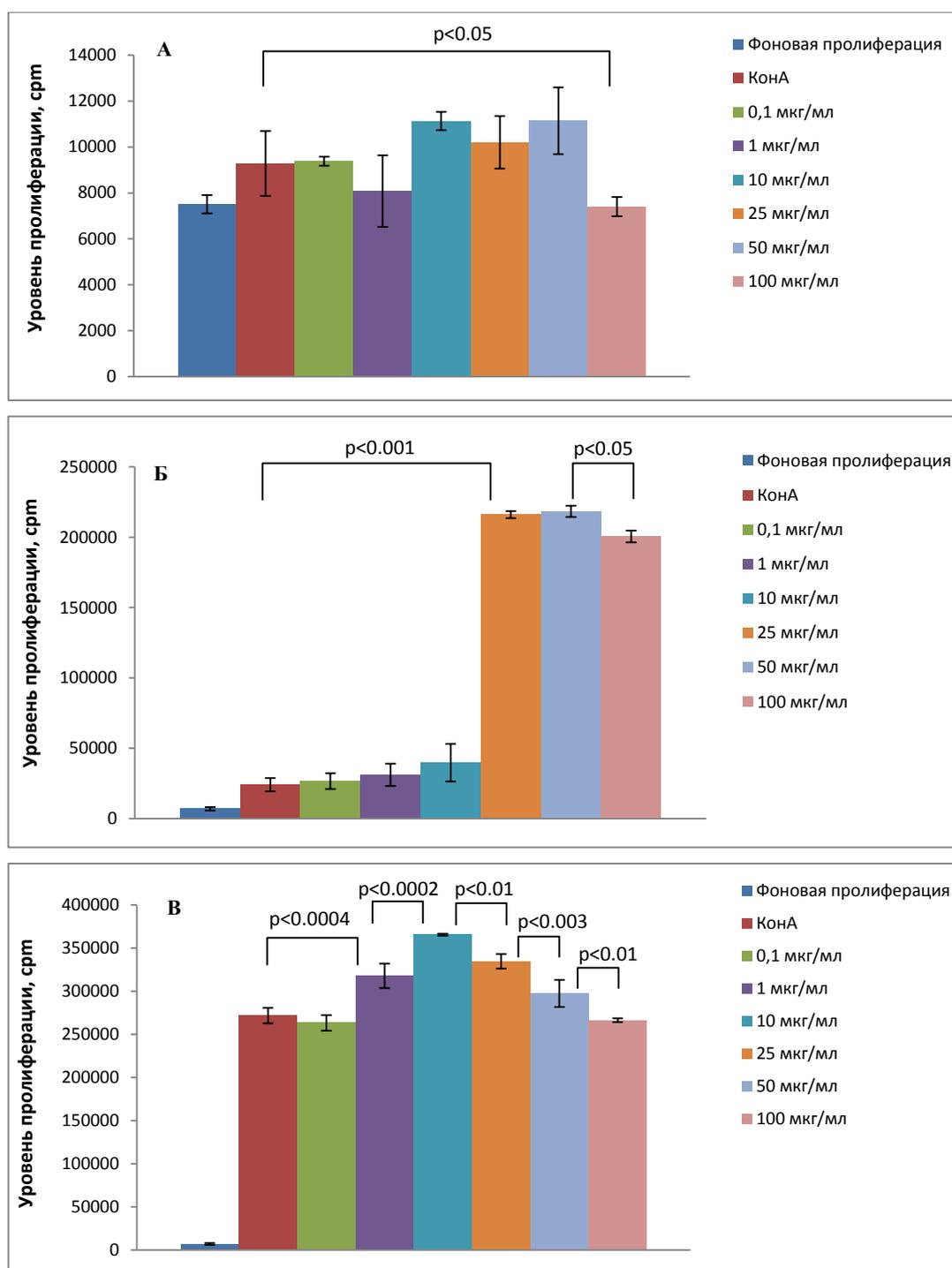


**Рисунок 41** - Относительное количество (%) активированных Т - хелперов (CD3+CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) и основных субпопуляций цитотоксических Т - лимфоцитов (CD3+CD8<sup>+</sup>) в культуре *in vitro* спленоцитов интактных мышей F1(СВА/Лас х С57BL/6) после 48 ч обработки рЦФА

Таким образом, эксперименты *in vitro* показали, что рчЦфА в высоких концентрациях способен индуцировать активацию и пролиферацию В - клеток интактных мышей. Эти результаты согласуются с данными, полученными в системе *in vivo* после курсового введения рчЦфА (рис. 9).

Для оценки влияния рчЦфА на пролиферативную активность активированных лимфоцитов клетки селезенки интактных мышей F1(СВА/Лас х С57BL/6) предварительно обрабатывали в течение 2 ч Т-клеточным митогеном конканавалином А (Кон А) в концентрации 1,5 мкг/мл (субмитогенная доза), 4,0 мкг/мл (митогенная доза) или 12,0 мкг/мл (супра-митогенная доза). По истечении времени пре-активации из культуры удаляли митоген и вносили рчЦфА в дозах 0,1 - 100,0 мкг/мл.

Анализ уровня пролиферации клеток через 48 ч культивирования показал, что рчЦфА в концентрациях 0,1 - 50,0 мкг/мл не оказал влияния на пролиферативную активность спленоцитов, предварительно активированных субмитогенной дозой Кон А (рис. 42А). При максимальной концентрации исследуемого белка наблюдалось достоверное подавление пролиферации лимфоцитов ( $p \leq 0,05$  по сравнению с Кон А-индуцированной пролиферацией).



**Рисунок 42** - Уровень пролиферации клеток селезенки интактных мышей, предварительно активированных (А) 1,5 мкг/мл Кон А; (Б) 4,0 мкг/мл Кон А; (В) 12,0 мкг/мл Кон А под действием рЦфА. Дисперсионный анализ ANOVA

Обработка спленоцитов 4,0 мкг/мл Кон А привела к повышению чувствительности клеток к митогенному действию рЦфА: при дозах 25,0 - 50,0 мкг/мл исследуемого белка наблюдалось достоверное усиление клеточной

пролиферации (рис. 42Б;  $p \leq 0,001$  по сравнению с Кон А - индуцированной пролиферацией). Увеличение концентрации рчЦфА до 100,0 мкг/мл привело к подавлению пролиферации лимфоцитов ( $p \leq 0,05$  по сравнению с 50,0 мкг/мл рчЦфА).

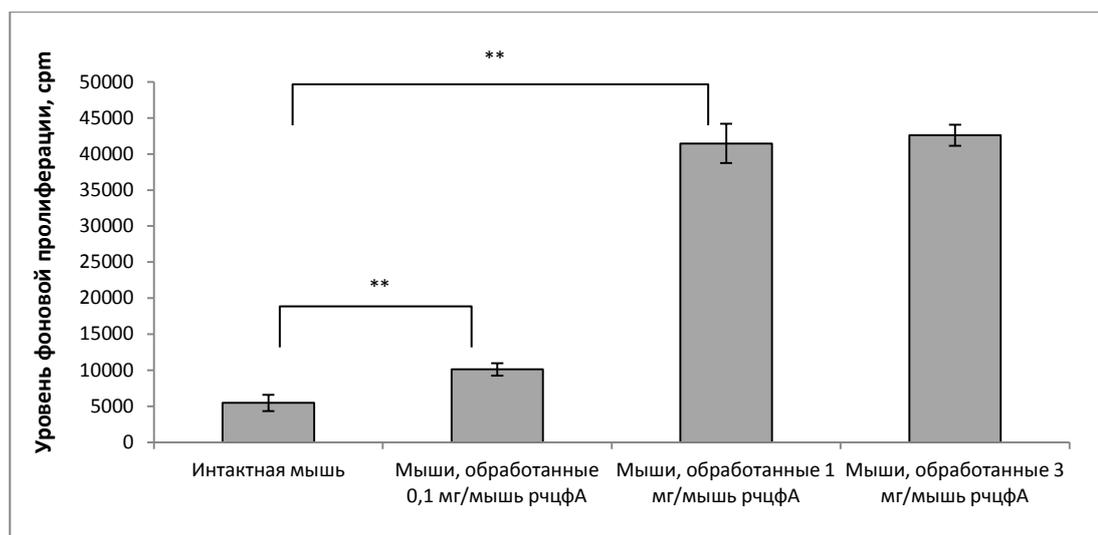
Клетки селезенки, предварительно активированные максимальной дозой Кон А (12,0 мкг/мл), проявили наибольшую чувствительность к митогенному действию рчЦфА: дозозависимое усиление пролиферации клеток наблюдалось при концентрациях 1,0 и 10,0 мкг/кг (рис. 42В). Дальнейшее увеличение концентрации рчЦфА привело к дозозависимому подавлению пролиферативной активности лимфоцитов, что, вероятно, обусловлено избыточной активацией клеток.

**Таким образом, рчЦфА обладает комитогенной активностью в отношении активированных Т-лимфоцитов, при этом чувствительность Т-клеток к действию исследуемого белка прямо коррелирует со степенью их активации.**

#### **3.2.1.4. Оценка сенсibilизирующих свойств рчЦфА**

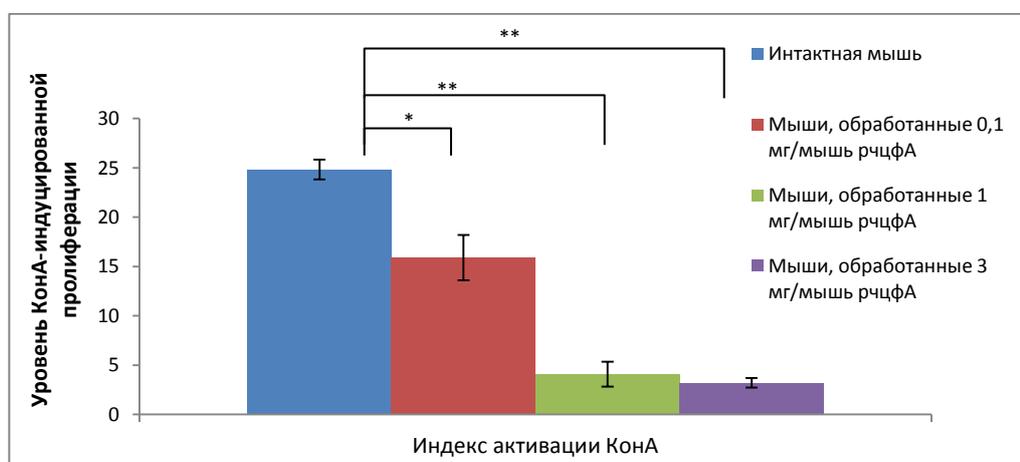
Для оценки сенсibilизации организма к рчЦфА мышам F1(СВА/Лас х С57BL/6) вводили 0,1; 1,0 и 3,0 мг/мышь белка в течение 7 дней, после чего клетки селезенки опытных животных помещали в культуру *in vitro*, в которую вносили рчЦфА в концентрациях от 10,0 мкг/мл до 100,0 мкг/мл.

Курсовое введение рчЦфА привело к дозозависимому усилению спонтанной пролиферации спленоцитов *ex vivo* (рис. 43).



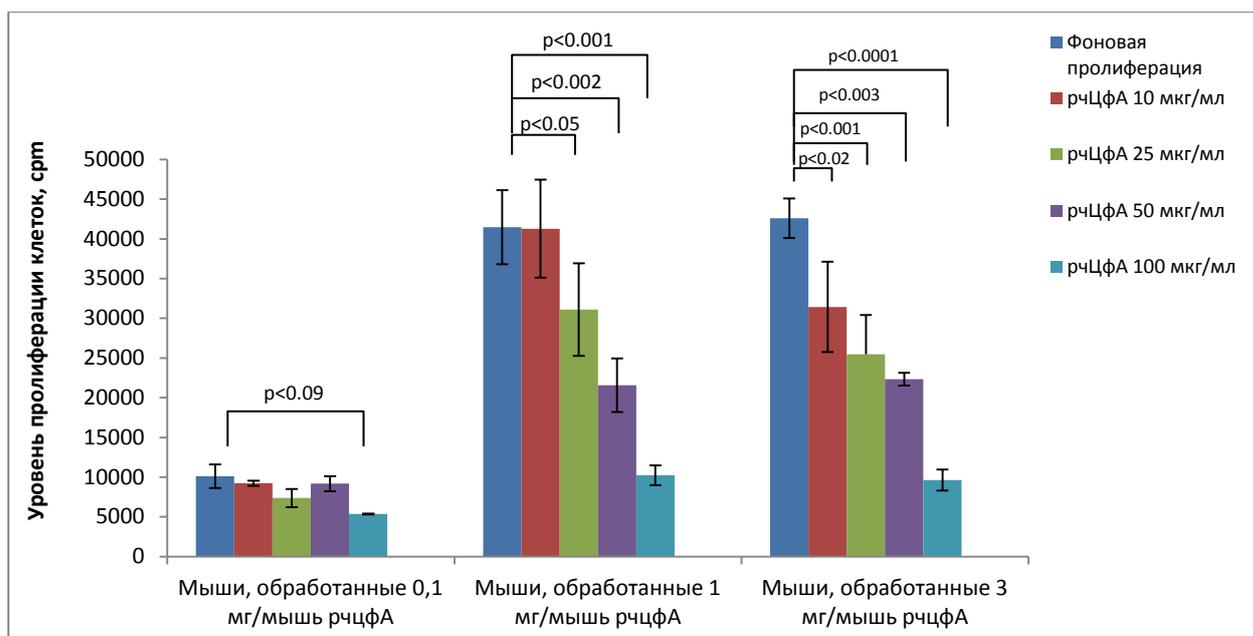
**Рисунок 43** - Уровень фоновой *ex vivo* пролиферации спленоцитов мышей, обработанных рЦфА. \*\* $p \leq 0,01$

Внесение в культуру митогенной дозы КонаА (4,0 мкг/мл) привело к подавлению пролиферации спленоцитов мышей, обработанных рЦфА (рис. 44).



**Рисунок 44** - Индексы митоген-индуцированной пролиферации спленоцитов мышей, обработанных рЦфА. Уровень соответствующей фоновой пролиферации принят за единицу. \* $p \leq 0,008$ ; \*\* $p \leq 0,003$  (дисперсионный анализ ANOVA)

При добавлении рЦфА в культуру спленоцитов мышей, обработанных высокими дозами белка (1,0 и 3,0 мг/мышь), наблюдали дозозависимое подавление клеточной пролиферации (рис. 45).



**Рисунок 45** - Влияние рцЦфА на уровень пролиферации спленоцитов мышей, обработанных рцЦфА. Дисперсионный анализ ANOVA

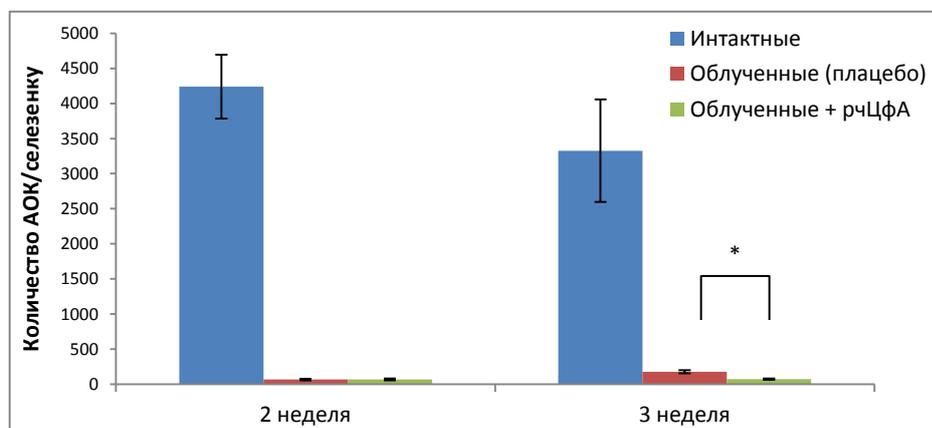
Полученные результаты подтверждают способность рцЦфА активировать лимфоциты *in vivo* (рис. 9), при этом степень активации клеток прямо коррелирует с дозой введенного белка. Дополнительная стимуляция спленоцитов рцЦфА или КонА *ex vivo* приводит к подавлению их пролиферативной активности, что может быть обусловлено избыточной активацией клеток.

**Таким образом, рцЦфА является митогеном для В-лимфоцитов и активированных Т-клеток. Курсовое введение высоких доз исследуемого белка индуцирует активацию лимфоцитов *in vivo* и приводит к сенсibilизации клеток к дополнительным активационным стимулам.**

### **3.2.2. Оценка влияния рцЦфА на развитие иммунного ответа облученных мышей**

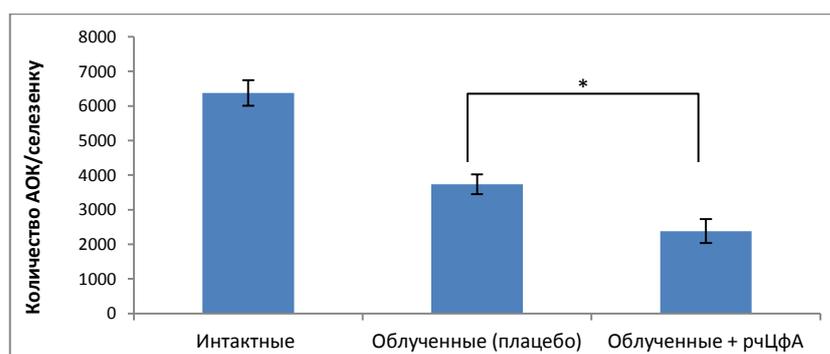
Для оценки развития гуморального иммунного ответа мышей линии СВА/Лас облучали в дозе 6,5 Гр, вводили рцЦфА в течение 7 дней после

облучения и иммунизировали ЭБ через 2 и 3 недели после облучения. Было показано, что обработка животных рЦфА привела к достоверному снижению количества АОК в селезенке через 21 день после облучения ( $p \leq 0,05$  по сравнению с группой облученных мышей - плацебо; рис. 46).



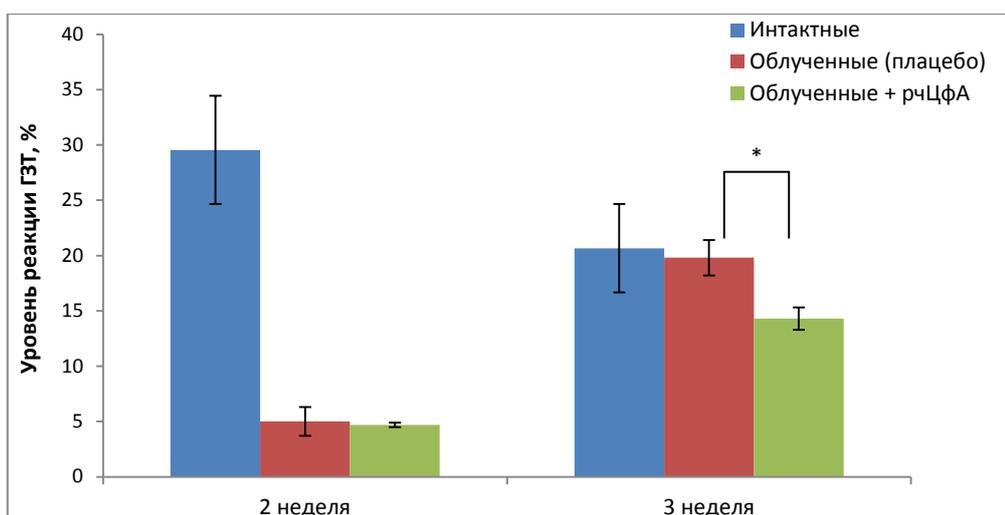
**Рисунок 46** - Количество АОК в селезенке мышей линии СВА/Лас, облученных дозой 6,5 Гр. \* $p \leq 0,05$

При снижении дозы облучения до 2,5 Гр наблюдали аналогичный эффект подавления гуморального ответа под действием изучаемого белка через 3 недели после облучения по сравнению с контрольной группой плацебо (рис. 47).



**Рисунок 47** - Количество АОК в селезенке мышей линии СВА/Лас, облученных дозой 2,5 Гр. \* $p \leq 0,05$

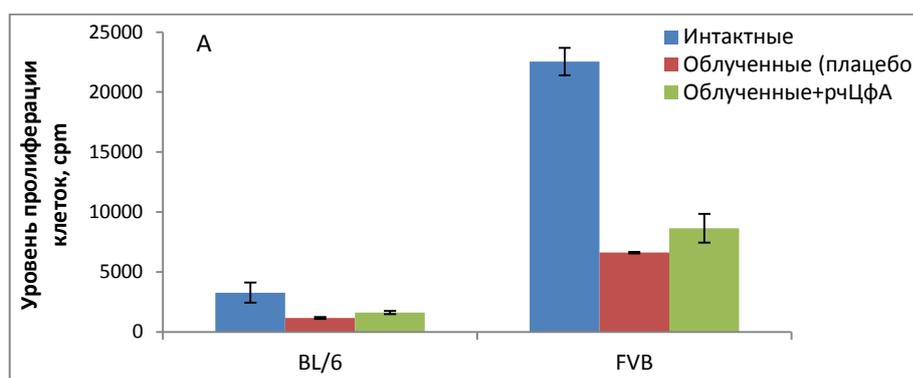
При оценке развития клеточного иммунного ответа у мышей линии СВА/Лас, облученных в дозе 6,5 Гр, было также обнаружено подавление реакции ГЗТ под влиянием рЦфА через 3 недели после облучения (рис. 48).

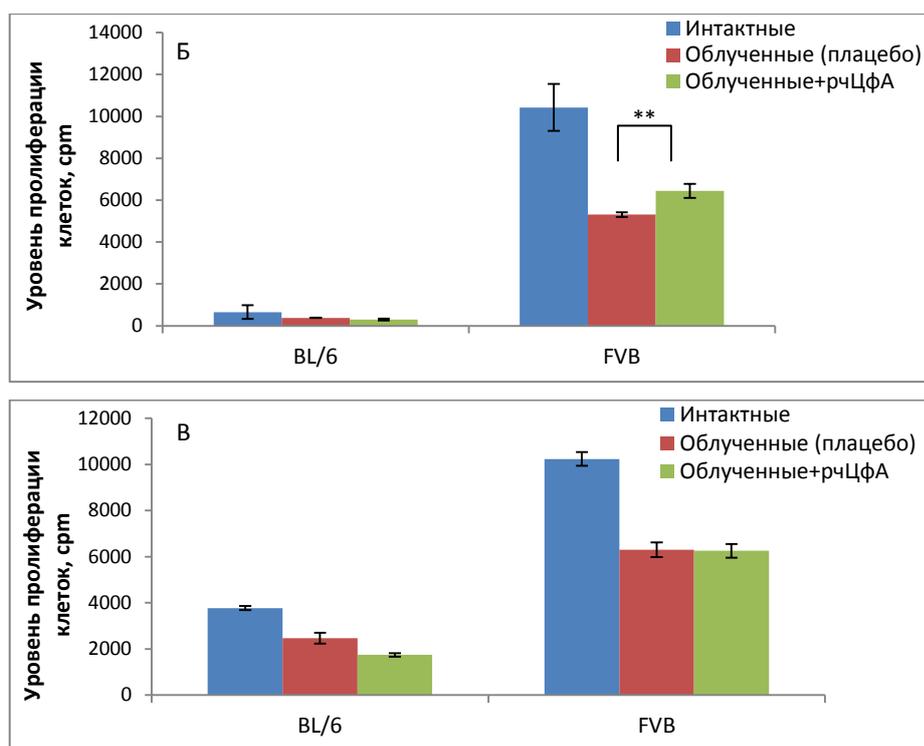


**Рисунок 48** - Уровень реакции ГЗТ мышей линии CBA/Lac, облученных дозой 6,5 Гр. \* $p \leq 0,05$

Далее оценивали функциональную активность лимфоцитов облученных мышей по способности пролиферировать в ответ на аллогенные стимуляторы в MLR. Для этого мышей линии C57BL/6 ( $K^bI-A^bD^b$ ) облучали дозой 4,5 Гр, вводили подкожно рЦфА в течение 7 дней и через 1, 2 и 3 недели после облучения оценивали пролиферацию клеток селезенки в присутствии спленоцитов мышей линии C57BL/6 (сингенные стимуляторы) и линии FVB ( $K^qI-E^qD^q$ , аллогенные стимуляторы).

Анализ MLR показал, что через 2 недели после облучения под действием рЦфА уровень аллогенного ответа достоверно превышал значения в контрольной группе плацебо ( $p \leq 0,01$ ; рис. 47Б). Через 7 и 21 день после облучения данный эффект исследуемого белка не наблюдали (рис. 49).





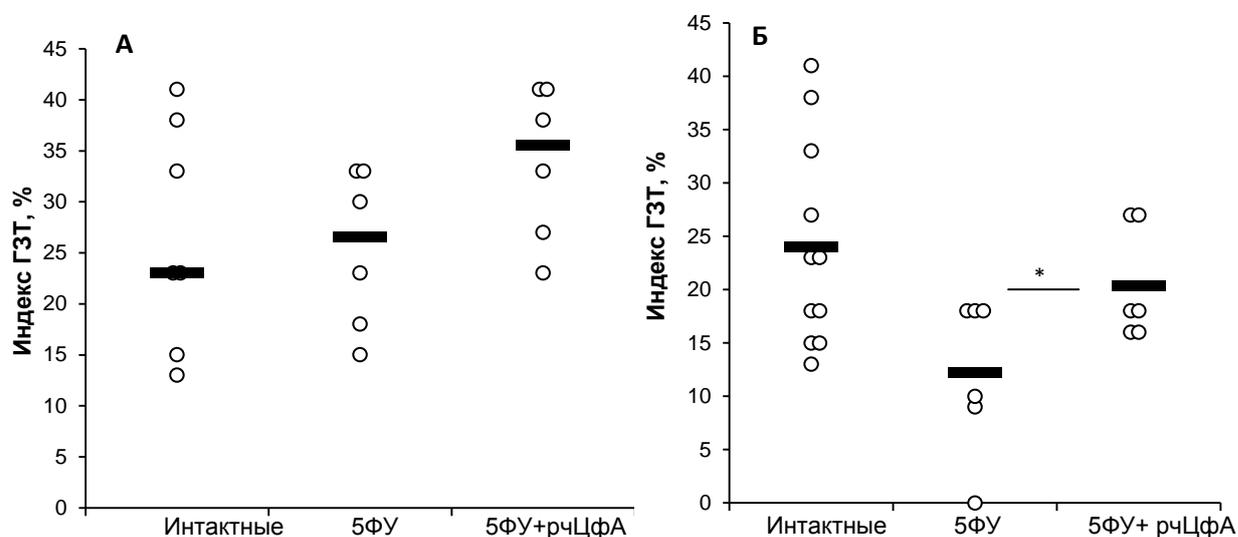
**Рисунок 49** - Уровень пролиферации (срм) клеток селезенки облученных мышей линии C57BL/6 в присутствии сингенных (BL/6) и аллогенных (FVB) стимуляторов через 1 неделю (А), 2 недели (Б) и 3 недели (В) после облучения. \*\* $p \leq 0,01$

Таким образом, курсовое введение рчЦфА сублетально облученным мышам приводит к стимуляции функциональной активности лимфоцитов *in vitro* к 14 дню после облучения. Тем не менее, через 3 недели после облучения у экспериментальных животных, обработанных исследуемым белком, наблюдается подавление гуморального и клеточного иммунного ответа *in vivo*.

### 3.2.3. Оценка влияния рчЦфА на развитие иммунного ответа мышей после воздействия 5ФУ

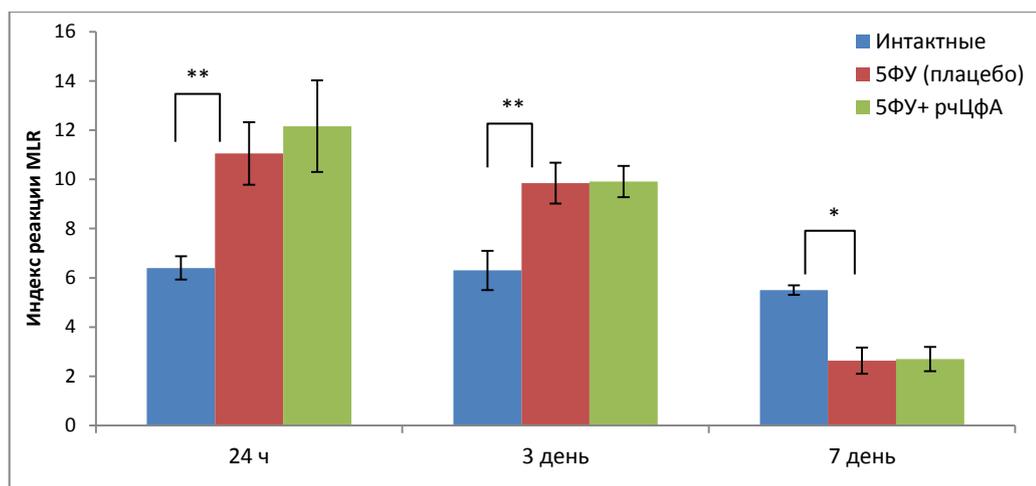
К 3 дню после введения 5ФУ не наблюдалось изменение уровня ГЗТ мышей линии CBA/Lac, иммунизированных ЭБ. Подавление клеточного иммунного ответа на данный модельный антиген было обнаружено только к 7 дню (рис. 50А). Было показано, что рчЦфА не оказал влияния на уровень ГЗТ через 3 дня по окончании введения химиопрепарата, но стимулировал развитие клеточного

иммунного ответа на 7 день ( $p \leq 0,05$  при сравнении с контрольной группой 5ФУ-плацебо, рис. 50Б).



**Рисунок 50** - Уровень реакции ГЗТ через 3 дня (А) и 7 дней (Б) после введения 5ФУ.\* $p \leq 0,05$

Далее проводили анализ функциональной активности спленоцитов мышей линии C57BL/6 после обработки 5ФУ по способности развивать ответ на аллоантиген в реакции MLR. Данное исследование показало, что в течение 3 дней после введения химиопрепарата наблюдается усиленный аллогенный ответ спленоцитов ( $p \leq 0,01$  при сравнении с группой интактных животных), а к 7 дню происходит подавление аллогенной иммунной реакции ( $p \leq 0,05$  при сравнении с группой интактных животных). При этом обработка животных рЦфА не оказала влияния на развитие аллогенного иммунного ответа в данной модели (рис. 51).



**Рисунок 51** - Относительный уровень аллогенного иммунного ответа мышей линии C57BL/6 на различные сроки после введения 5FU. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$

**Таким образом, курсовое введение рЦФА на фоне воздействия 5FU способствует поддержанию клеточного иммунного ответа *in vivo* на уровне интактных животных.**

### **3.3. Оценка влияния рЦФА на рост перевиваемых опухолевых штаммов различного гистогенеза *in vivo***

В рамках настоящей работы показано, что рЦФА участвует в процессе восстановления гомеостаза и функциональной активности кроветворной и иммунной систем организма после воздействия цитостатика и облучения (Глава 3, разделы 3.1.2., 3.1.3., 3.2.2.. 3.2.3.). Это создает предпосылки для разработки лекарственных средств на основе исследуемого белка, направленных на устранение побочных действий традиционных подходов терапии злокачественных новообразований. Между тем, ряд исследований указывает на участие ЦФА в канцерогенезе (см. Обзор литературы, раздел 1.3.3.). Традиционно ЦФА рассматривают как проонкогенный фактор или маркер, но прямых доказательств этого не получено. По этой причине представлялось крайне важным оценить влияние рЦФА на рост опухолей *in vivo*.

С этой целью было проведено исследование с использованием перевиваемых опухолевых штаммов различного гистогенеза: рака шейки матки РШМ-5, меланомы В16, аденокарциномы молочной железы Са755, карциномы легкого Льюис (LLC). Рак шейки матки РШМ-5 представляет собой высокодифференцированную опухоль, для которой характерен медленный рост *in vivo*; меланома В16 метастазирует в легкие и обладает умеренной чувствительностью к известным противоопухолевым препаратам; аденокарцинома молочной железы Са755 является гормонозависимой неметастазирующей опухолью и характеризуется наибольшей скоростью роста из всех перевиваемых солидных опухолей мышей; карцинома легкого Льюис (LLC) - это быстро растущая, метастазирующая в легкие опухоль, обладающая избирательной чувствительностью к противоопухолевым препаратам [44].

В рамках данной работы рчЦфА вводили мышам подкожно в дозе 100,0 мкг/мышь по двум схемам: 1) в течение 7 дней до и 7 дней после прививки опухолевого штамма; и 2) в течение 7 дней после прививки опухолевого штамма.

### 3.3.1. Оценка влияния рчЦфА на рост меланомы В16

При прививке мышам линии С57BL/6 меланомы В16 в количестве  $\sim 5,0 \times 10^6$  кл/мышь было выявлено подавление роста опухоли на 17 день только при введении рчЦфА в течение 14 дней (табл. 14). Однако показатель торможения роста опухоли (ТРО) составил 33,3%, что оказалось ниже установленного критерия эффективности (ТРО  $\geq 50-70\%$ ). Обработка животных исследуемым белком в течение 7 дней после прививки привела к стимуляции роста опухоли на 31,5% к 17 дню после прививки. На 21 день после прививки данные эффекты рчЦфА не наблюдались (табл. 14).

**Таблица 14** - Влияние рчЦфА на динамику роста В16

Группа животных	Объем опухоли (M $\pm$ SEM, мм <sup>3</sup> )
-----------------	---

	День после прививки	
	17	21
Контроль (плацебо)	692,0± 40,8	1160,0 ± 122,2
Введение рчЦфА до и после прививки	461,2 ± 90,7*	1012,0 ± 163,9
Введение рчЦфА после прививки	910,5 ± 95,6*	1275,0 ± 138,1

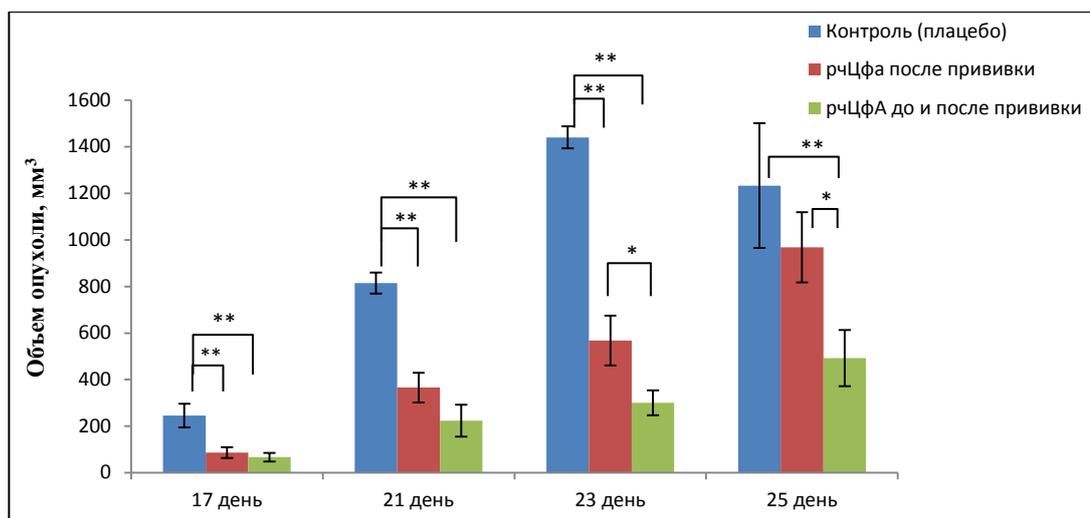
\*  $p \leq 0,05$  при сравнении с контрольной группой (плацебо)

На следующем этапе работы прививаемая доза опухолевых клеток меланомы В16 была снижена до  $3,0 \times 10^5$  кл/мышь, что позволило выявить противоопухолевое действие рчЦфА (табл. 15, рис. 52).

**Таблица 15** - Влияние рчЦфА на динамику роста В16 при прививочной дозе  $3,0 \times 10^5$  кл/мышь

Группа животных	Объем опухоли (М ± SEM, мм <sup>3</sup> )			
	Дни после прививки			
	17	21	23	25
Контроль (плацебо)	245,8± 50,7	814,5 ± 44,7	1440,0 ± 47,3	1233,0 ± 268,3
Введение рчЦфА после прививки	86,8 ± 23,0*	365,7 ± 63,3**	568,0 ± 106,7**	968,0 ± 268,3
Введение рчЦфА до и после прививки	67,2 ± 18,6*	223,7 ± 69,0**	300,0 ± 53,4**	492,5 ± 121,2**

\*\*  $p \leq 0,01$  при сравнении с контрольной группой (плацебо)



**Рисунок 52** - Влияние рчЦФА на динамику роста меланомы В16, привитой в дозе  $3,0 \times 10^5$  кл/мышь ( $M \pm SEM$ ,  $mm^3$ ). \* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

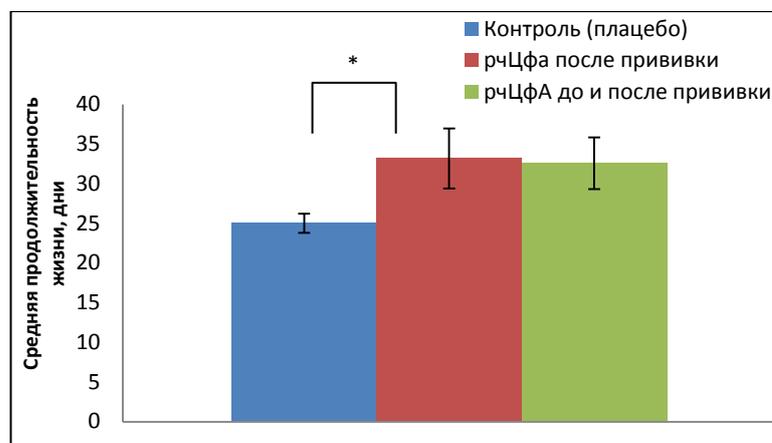
Наибольший противоопухолевый эффект наблюдали при введении рчЦФА в течение 14 дней (7 дней до и 7 дней после прививки опухоли): ТРО составило 60 - 80% и сохранялось до 25 дня после прививки (табл. 16). Введение белка только в течение 7 дней после прививки привело также к достоверному подавлению роста меланомы В16: показатели ТРО сохранялись на уровне 55 - 65% до 23 дня после прививки (табл. 16).

**Таблица 16** - Влияние рчЦФА на динамику торможения роста опухоли меланомы В16 (ТРО, %)

Группа животных	День после прививки			
	17	21	23	25
Введение рчЦФА после прививки	64,7	55,1	60,6	21,5
Введение рчЦФА до и после прививки	72,7	72,5	79,1	60,0

Кроме ТРО было выявлено увеличение продолжительности жизни (УПЖ) мышей, обработанных рчЦФА. Средняя продолжительность жизни животных контрольной группы составила  $25,0 \pm 1,2$  дней, в группе животных, получавших рчЦФА 7 дней до и 7 дней после прививки, -  $32,6 \pm 3,0$  дней; в группе животных, которых обрабатывали рчЦФА 7 дней после прививки опухоли, -  $33,2 \pm 3,5$  дней

(рис. 53). УПЖ в опытных группах составило 30,4% и 35,2% соответственно, что является достоверным по сравнению с контролем.



**Рисунок 53** - Средняя продолжительность жизни мышей линии C57BL/6 с привитой меланомой B16 ( $3,0 \times 10^5$  кл/мышь). \* $p \leq 0,05$

### 3.3.2. Оценка влияния рЧЦФА на рост карциномы легкого Льюис (LLC)

Под действием рЧЦФА было обнаружено значительное подавление роста опухоли LLC (табл. 17, рис. 53): ТРО при обеих схемах введения белка наблюдалось до 14 дня после прививки опухоли и составило 56 - 92% (табл. 18). Продолжительность жизни животных в опытных группах не отличалась от продолжительности жизни мышей в контрольной группе.

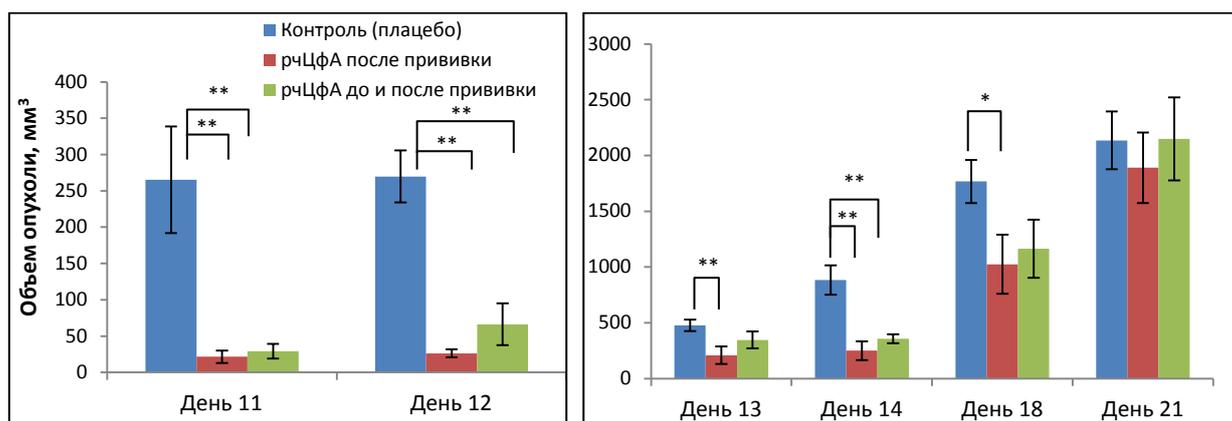
**Таблица 17** - Влияние рЧЦФА на динамику роста LLC

Группа	Объем опухоли (M $\pm$ SEM, мм <sup>3</sup> )					
	Дни после прививки					
	11	12	13	14	18	21
Контроль (плацебо)	265,2 $\pm$ 73,5	269,9 $\pm$ 36,0	477,3 $\pm$ 52,0	882,7 $\pm$ 131,5	1767,2 $\pm$ 192,9	2135,5 $\pm$ 259,9
Введение рЧЦФА после прививки	21,5 $\pm$ 8,4**	26,3 $\pm$ 5,5**	208,4 $\pm$ 78,6**	249,5 $\pm$ 85,2**	1024,7 $\pm$ 265,7*	1890,2 $\pm$ 317,0
Введение рЧЦФА до и после прививки	29,2 $\pm$ 10,2**	66,3 $\pm$ 28,8**	346,7 $\pm$ 75,0	356,7 $\pm$ 40,7**	1163,4 $\pm$ 261,1	2148,2 $\pm$ 371,5

\* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  при сравнении с контрольной группой (плацебо)

**Таблица 18** - Влияние рчЦфА на динамику торможения роста опухоли LLC (ТРО,%)

Группа	Дни после прививки				
	11	12	13	14	18
рчЦфА после прививки	91,9	90,3	56,3	71,7	42,0
рчЦфА до и после прививки	89,0	75,4	х	59,6	34,2



**Рисунок 54** - Влияние рчЦфА на динамику роста LLC ( $M \pm SEM$ , мм<sup>3</sup>).

\* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

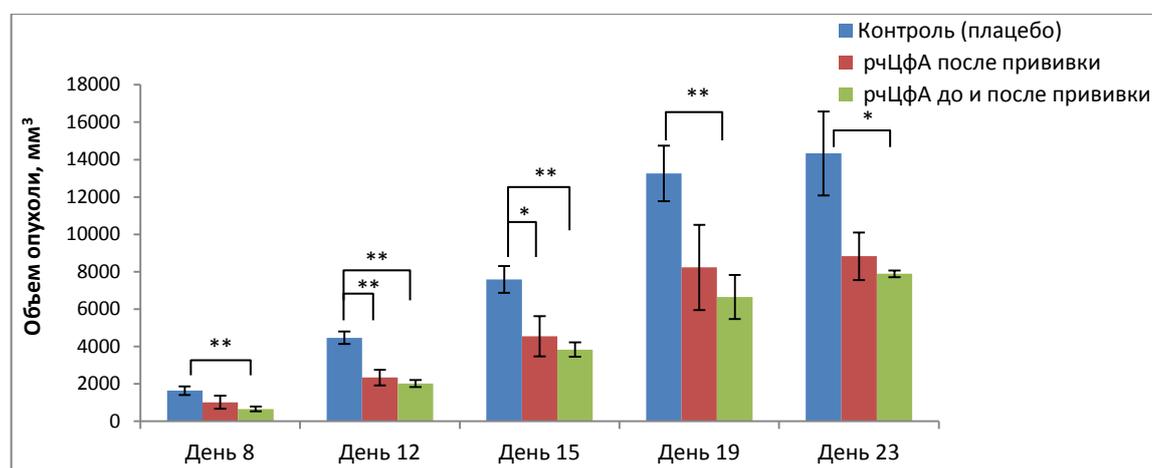
### 3.3.3 Оценка влияния рчЦфА на рост аденокарциномы Са 755

Введение рчЦфА в течение 7 дней после прививки привело к торможению роста аденокарциномы Са 755 (табл. 19, рис. 54), однако показатели ТРО оказались ниже установленного критерия эффективности ( $\geq 50 - 70\%$ ). При второй схеме введения рчЦфА (7 дней до и 7 дней после прививки опухоли) наблюдали значительное подавление роста данной опухоли с показателями ТРО 50 - 60 % до 19 дня после прививки опухоли (табл. 19 и 20, рис. 55). Продолжительность жизни животных в экспериментальных группах не отличалась от продолжительности жизни мышей в контрольной группе.

**Таблица 19** - Влияние рЧЦФА на динамику роста аденокарциномы Ca755

Группа	Объем опухоли (M ± SEM, мм <sup>3</sup> )				
	Дни после прививки				
	8	12	15	19	23
Контроль (плацебо)	1644,0 ± 231,0	4467,0 ± 336,0	7591,0 ± 720,0	13257,0 ± 1490,0	14329,0 ± 2248,0
Введение рЧЦФА после прививки	1020,0 ± 343,0	2342,0 ± 421,0**	4544,0 ± 1077,0*	8230,0 ± 2279,0	8830,0 ± 1277,0
Введение рЧЦФА до и после прививки	662,3 ± 132,0**	2022,0 ± 192,0**	3838,0 ± 386,0**	6651,0 ± 1180,0**	7889,0 ± 175,0*

\* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  при сравнении с контрольной группой (плацебо)



**Рисунок 55** - Влияние рЧЦФА на динамику роста аденокарциномы Ca755 (M ± SEM, мм<sup>3</sup>). \* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

**Таблица 20** - Влияние рЧЦФА на динамику торможения роста опухоли Ca755 (ТРО, %)

Группа	Дни после прививки				
	8	12	15	19	23
рЧЦФА после прививки	37,9	47,5	40,1	37,9	38,4
рЧЦФА до и после прививки	59,7	54,7	49,4	49,8	44,9

### 3.3.4. Оценка влияния рчЦфА на рост рака шейки матки РШМ-5

Для оценки влияния рчЦфА на рост РШМ-5 белок вводили в дозе 100,0 мкг/мышь в течение 7 дней после прививки мышам линии СВА/Лас. Было выявлено торможение роста опухоли на уровне 50 - 74%, которое сохранялось до 26 дня после прививки (табл. 21, рис. 56). Стоит особо отметить, что противоопухолевый эффект рчЦфА был сопоставим с действием 5ФУ, который в данном исследовании вводили мышам двукратно на 2 и 7 сутки после прививки РШМ-5 в дозе 20 мг/кг (табл. 21 и 22, рис. 56). Продолжительность жизни мышей, обработанных рчЦфА или 5ФУ, не отличалась от контроля (плацебо).

На следующем этапе работы оценивали влияние рчЦфА на рост РШМ-5 на фоне введения 5ФУ. При одновременной обработке животных рчЦфА и 5ФУ наблюдалось 70% подавление роста опухоли на 26 день после прививки РШМ-5 по сравнению с 58% и 45% ТРО при монотерапии рчЦфА и 5ФУ соответственно (табл. 21, 22). Кроме того, сочетанное противоопухолевое действие рчЦфА и 5ФУ сохранялось до 36 дня после прививки РШМ-5, составив 50%, тогда как эффект индивидуально рчЦфА или 5ФУ на данном сроке уже отсутствовал (табл. 21, 22).

**Полученные данные демонстрируют аддитивное действие рчЦфА и 5ФУ при терапии рака шейки матки РШМ-5, которое проявляется в достоверно более сильном и пролонгированном эффекте подавления роста опухоли. Увеличение продолжительности жизни мышей - опухоленосителей при сочетанном действии рчЦфА и 5ФУ не было выявлено.**

**Таблица 21 - Влияние рчЦфА на динамику роста РШМ-5**

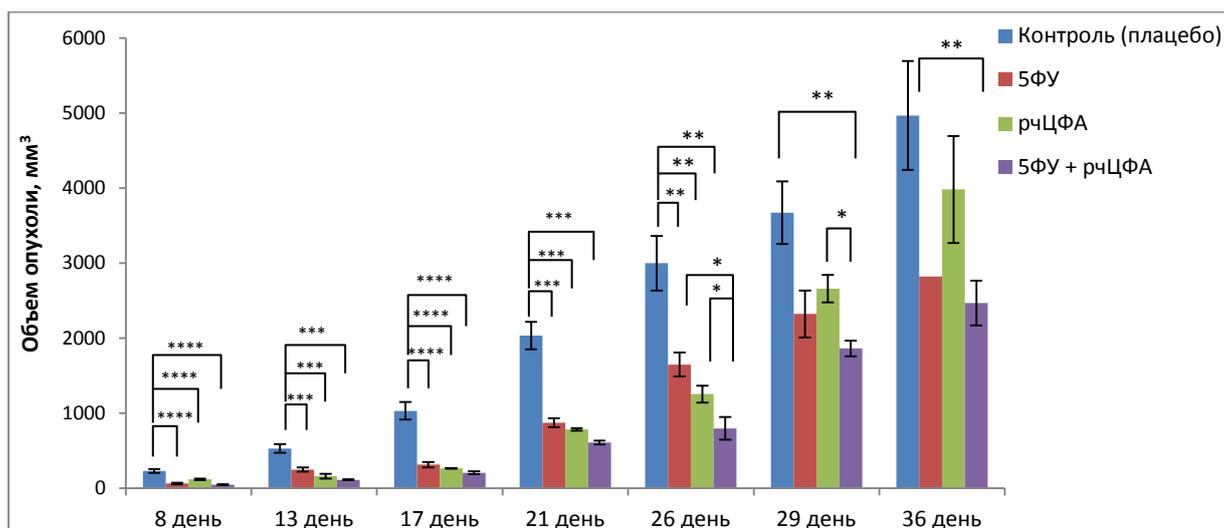
Группа	Объем опухоли (M ± SEM, мм <sup>3</sup> )						
	Дни после прививки						
	8	13	17	21	26	29	36
Контроль (плацебо)	228,7 ± 24,7	528,0 ± 56,9	1029,8 ± 117,5	2033,4 ± 183,1	2998,0 ± 363,9	3671,7± 417,8	4968,8 ± 726,5
рчЦфА	116,5 ± 9,8****	159,0 ± 33,3***	263,2 ± 3,7****	781,7 ± 16,3***	1252,5 ± 113,7**	2660,5 ± 182,5	3981,8 ± 713,7
5ФУ	60,8 ± 12,3****	246,0 ± 27,3***	312,2 ± 37,7****	873,2± 59,2***	1646,8 ± 159,4**	2321,4 ± 314,7	x

5ФУ	+	44,8 ±	110,2 ±	203,7 ±	606,8 ±	796,7 ±	1861,3 ±	2469,6 ±
рчЦФА		4,7****	6,5****	619,0****	26,5****	150,0**	104,6**	298,0**

\*\* $p \leq 0,007$ , \*\*\* $p \leq 0,0002$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  при сравнении с контрольной группой (плацебо) (дисперсионный анализ ANOVA)

**Таблица 22** - Влияние рчЦФА на динамику торможения роста опухоли РШМ-5 (ТРО,%)

Группа	Дни после прививки						
	8	13	17	21	26	29	36
рчЦФА	49,0	69,9	74,4	61,6	58,2	27,5	x
5ФУ	73,4	53,4	69,7	57,0	45,0	36,8	x
5ФУ + рчЦФА	80,4	79,1	80,2	70,1	73,4	49,3	50,3



**Рисунок 56** - Влияние рчЦФА на динамику роста РШМ-5 ( $M \pm SEM$ ,  $mm^3$ ). \* $p \leq 0,01$ , \*\* $p \leq 0,007$ , \*\*\* $p \leq 0,0002$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  (дисперсионный анализ ANOVA)

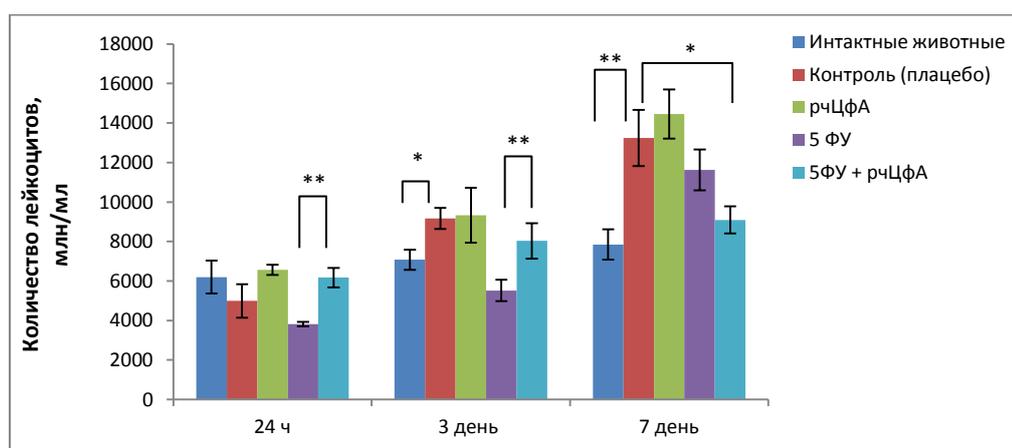
Стоит отметить, что рост опухоли РШМ-5 ассоциирован с развитием лейкоцитоза в крови экспериментальных животных (табл. 23, рис. 56). При этом введение рчЦФА не оказывает влияния на уровень лейкоцитов в крови мышей - опухоленосителей (табл. 23). Обработка животных 5ФУ вызывает лейкопению, которая наблюдается в течение 3 дней и нивелируется к 7 дню по окончании химиотерапии. Введение рчЦФА на фоне 5ФУ предотвращает развитие

лейкопении, нормализуя и поддерживая количество лейкоцитов в крови на уровне интактных мышей без опухоли (табл. 23, рис. 57). Эти данные согласуются с результатами, полученными при исследовании мышей со вторичным 5ФУ-индуцированным иммунодефицитом (см. раздел 3.1.3.1., табл. 10, рис. 22).

**Таблица 23** - Влияние рЦфА на динамику изменения количества лейкоцитов ( $\times 10^6/\text{мл}$ ) в крови мышей линии СВА/Лас после прививки РШМ-5

Срок исследования после введения 5ФУ	День после прививки опухоли	Интактные животные	Животные - опухоленосители			
			Контроль (плацебо)	Введение рЦфА	Химиотерапия	
					5ФУ	5ФУ + рЦфА
24 ч	8	6200,0 ± 835,0	5744,4 ± 441,8	6570,0 ± 257,9	3820,0 ± 109,7	6170,0 ± 496,8**
3 день	10	7075,7 ± 513,5	9165,0 ± 530,8	9325,0 ± 1392,6	5518,7 ± 545,5	9262,5 ± 622,3**
7 день	14	7850,0 ± 770,0	13241,7 ± 1415,7	14450,0 ± 1245,1	11625,0 ± 1029,4	9091,7 ± 683,2*

\*\*  $p \leq 0,01$  при сравнении с контрольной группой 5ФУ, \* $p \leq 0,05$  при сравнении с контрольной группой плацебо



**Рисунок 57** - Влияние рЦфА на динамику изменения количества лейкоцитов в периферической крови мышей линии СВА/Лас с перевиваемой опухолью РШМ-5

На следующем этапе работы оценивали влияние рчЦФА на рост сформированного опухолевого узла РШМ-5. Для этого мышей обрабатывали исследуемым белком в течение 7 дней, начиная с 8 дня после прививки опухоли. Средний объем опухолевого узла в экспериментальных группах к началу обработки рчЦФА был одинаковым и составлял  $\sim 300 \text{ мм}^3$ . В качестве положительного контроля использовали 5ФУ, который вводили двукратно на 8 и 12 день после прививки РШМ-5. Для изучения сочетанного действия рчЦФА и 5ФУ данные вещества вводили одновременно в аналогичных режимах. Измерение объема опухолевых узлов начинали через 24 ч после окончания введения 5ФУ (на 13 день после прививки).

Было показано, что рчЦФА способен подавлять дальнейший рост уже развившегося опухолевого узла РШМ-5 (табл. 24 и 25, рис. 58). Уровень ТРО составил 55 - 68%, и подавление роста опухоли наблюдалось до 29 дня после прививки. Данные показатели соответствовали противоопухолевому действию 5ФУ (табл. 24 и 25, рис. 58). Однако при сочетанной терапии развившегося опухолевого узла не было выявлено усиления противоопухолевого эффекта по сравнению с монотерапией рчЦФА или 5ФУ. Исследуемый белок не оказал влияния на динамику восстановления лейкоцитов в крови мышей - опухоленосителей на фоне химиотерапии. Продолжительность жизни животных во всех экспериментальных группах не отличалась от контроля (плацебо).

**Таблица 24** - Влияние рчЦФА на динамику роста развившегося опухолевого узла РШМ-5

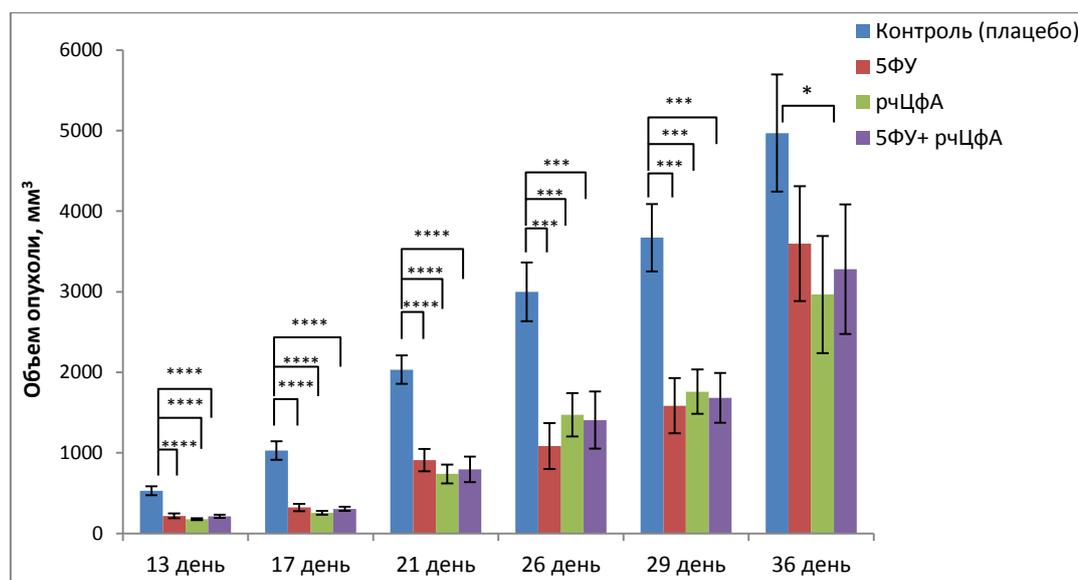
Группа	Объем опухоли ( $M \pm SEM$ , $\text{мм}^3$ )					
	Дни после прививки					
	13	17	21	26	29	36
Контроль (плацебо)	528,2 $\pm$ 55,2	1029,8 $\pm$ 113,9	2033,4 $\pm$ 177,5	2998,0 $\pm$ 363,9	3671,7 $\pm$ 417,8	4968,8 $\pm$ 726,5
рчЦФА	218,2 $\pm$ 29,2****	322,8 $\pm$ 45,8****	910,8 $\pm$ 138,7****	1086,0 $\pm$ 285,3***	1585,7 $\pm$ 342,1***	3280,5 $\pm$ 804,7

5ФУ	177,3 ± 12,6****	256,3 ± 23,9****	738,3 ± 116,1****	1474,0 ± 269,9***	1759,4 ± 276,6***	3597,0 ± 712,6
5ФУ + рчЦфА	212,7 ± 20,2****	305,7 ± 25,1****	795,0 ± 158,7****	1406,0 ± 354,8***	1682,2 ± 307,8***	2965,2 ± 726,0*

\* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  при сравнении с контрольной группой (плацебо) (дисперсионный анализ ANOVA)

**Таблица 25** - Влияние рчЦфА на динамику торможения роста развившегося опухолевого узла РШМ-5 (ТРО,%)

Группа	Дни после прививки					
	13	17	21	26	29	36
рчЦфА	58,7	68,7	55,2	63,8	56,8	40,3
5ФУ	66,4	75,1	63,7	50,8	52,1	27,6
5ФУ + рчЦфА	59,7	70,3	60,9	53,1	54,2	34,0



**Рисунок 58** - Влияние рчЦфА на динамику роста развившегося опухолевого узла РШМ-5 ( $M \pm SEM$ ,  $mm^3$ ). \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  (дисперсионный анализ ANOVA)

**Таким образом, рчЦфА обладает ярко выраженным противоопухолевым действием в отношении перевиваемых штаммов различного гистогенеза. На модели перевиваемого рака шейки матки**

показано, что противоопухолевый эффект рчЦфА сопоставим с действием 5ФУ. Также выявлен аддитивный эффект рчЦфА и 5ФУ при комплексной терапии развивающегося опухолевого узла РШМ-5. Кроме того, показано, что рчЦфА предотвращает развитие лейкопении у животных-опухоленосителей на фоне химиотерапии.

### 3.3.5. Оценка влияния рчЦфА на метастазирование LLC

В данном исследовании оценивали влияние рчЦфА на формирование метастазов и на рост уже существующих метастазов LLC в модели постоперационного метастазирования [44].

Для выявления антиметастатического действия рчЦфА вводили мышам линии C57BL/6 в течение 7 дней после прививки опухоли. Для оценки активности исследуемого белка в отношении уже сформировавшихся метастазов курсовое введение рчЦфА (в течение 7 дней) начинали через 24 ч после хирургического удаления опухолевого узла.

Поскольку в работе использовали рекомбинантный белок, который содержит незначительную примесь ЛПС штамма - продуцента *E. coli*, в качестве контроля отдельным группам животных вводили ЛПС *E. coli* (Sigma, США) в дозе, эквивалентной его количеству в примеси рчЦфА. Схемы введения ЛПС были аналогичны схемам введения рчЦфА.

На 8 день после прививки опухолевых клеток проводили удаление подкожного узла LLC хирургическим способом. Средняя масса опухолевой ткани у мышей, обработанных рчЦфА, была на 72% меньше массы опухоли в контрольной группе (плацебо) (табл. 26), что согласуется с полученными ранее результатами (см. раздел 3.3.3.). Под действием ЛПС не наблюдалось подавления роста опухоли (табл. 26).

**Таблица 26** - Масса опухолевых узлов LLC после хирургического удаления (M ± SEM), мг

Контроль (плацебо)	Введение рЧЦФА	Введение ЛПС
275,0 ± 13,2	78,0 ± 20,4**	192,0 ± 35,6

\*\*p ≤ 0,01 при сравнении с контрольной группой (плацебо)

Для определения интенсивности метастазирования LLC экспериментальных животных умерщвляли через 21 день после хирургического удаления опухолевого узла и определяли степень поражения легких (согласно Tarin and Price, 1979, см. табл. 5, Глава 2, раздел 2.17.), а также индекс торможения метастазирования (ТМ, %) (табл. 27).

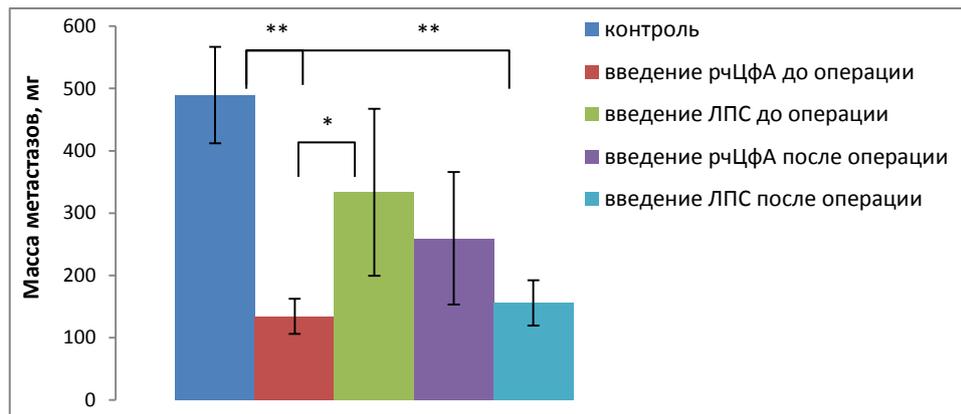
**Таблица 27** - Оценка антиметастатической активности рЧЦФА

Группа	Степень поражения легкого	Масса легких, мг (M ± SEM)	Масса метастазов, мг (M ± SEM)	Торможение метастазирования, %
Интактные мыши	х	170,7 ± 2,9	х	х
Контроль (плацебо)	5	660,1 ± 77,3	489,4 ± 77,3	х
Введение рЧЦФА до операции	2	304,8 ± 28,1**	134,2 ± 28,1**	72,6
Введение ЛПС до операции	4	504,0 ± 134,3	333,3 ± 134,3	31,9
Введение рЧЦФА после операции	2	430,3 ± 106,5	259,6 ± 106,5	46,9
Введение ЛПС после операции	2-3	326,5 ± 36,5**	155,8 ± 36,5**	68,1

\*\*p ≤ 0,01 при сравнении с контрольной группой (плацебо)

Как видно из таблицы 27, введение рЧЦФА в течение 7 дней до хирургического удаления первичного узла привело к значительному торможению

метастазирования LLC: степень поражения легких соответствовала 2 [44], и показатель торможения метастазирования (ТМ) составил 72,6%. Масса метастазов в данной группе была также достоверно ниже контроля (рис. 59). При этом введение ЛПС привело к незначительному подавлению развития метастазов: наблюдалась 4 степень поражения легких у мышей данной группы, и индекс ТМ составил 32% (табл. 26, рис. 59).



**Рисунок 59** - Масса метастазов у животных контрольной и опытных групп после хирургического удаления опухолевого узла LLC. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$

Введение рЧЦФА после удаления первичного узла позволило оценить противоопухолевую активность данного белка в отношении сформированных метастазов. Результаты показали, что такой активностью рЧЦФА не обладает: ТМ составило 46,9%, и достоверных различий в массе метастазов по сравнению с контролем (плацебо) не было выявлено (рис. 59). Напротив, ЛПС проявил четко выраженную противоопухолевую активность в отношении сформированных метастазов. Торможение метастазирования составило 68% (табл. 26).

**Таким образом, рЧЦФА проявляет ярко выраженное профилактическое антиметастатическое действие, но не обладает противоопухолевой активностью в отношении уже сформированных метастазов.**

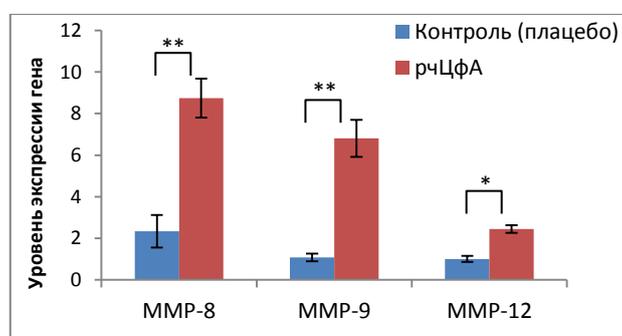
### 3.4. Изучение механизмов противоопухолевого действия рчЦфА

Поскольку в ходе настоящей работы был обнаружен яркий противоопухолевый эффект рчЦфА в отношении перевиваемых опухолей различного гистогенеза, на следующем этапе исследовали возможные механизмы его действия.

#### 3.4.1. Влияние рчЦфА на экспрессию генов ММР

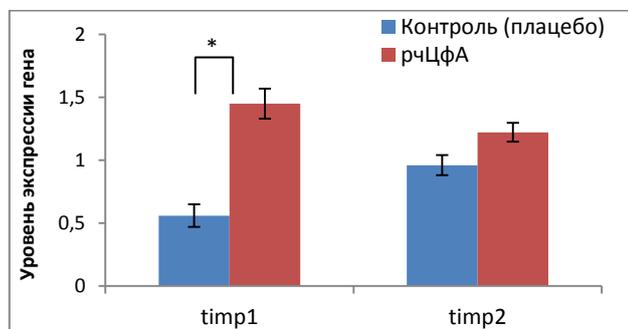
В данном исследовании проводили оценку влияния рчЦфА на уровень экспрессии генов ряда ММР в перевиваемой меланоме В16. Мышам линии С57ВL/6 прививали подкожно  $3,0 \times 10^5$  опухолевых клеток и часть животных обрабатывали рчЦфА в дозе 100,0 мкг/мышь в течение 7 дней. Из развившейся на 14 день первичной опухоли (уровень ТРО под действием рчЦфА составили 50,1%) выделяли мРНК с последующим синтезом кДНК. Методом ПЦР в реальном времени в полученных образцах определяли уровень мРНК следующих ММР: мембраносвязанной матриксной металлопротеиназы (МТ-1-ММР), ММР2, ММР3, ММР8, ММР9, ММР12. В качестве генов домашнего хозяйства использовали ген гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (*hprt*) и ТАТА-связывающего белка (*tbp*).

Было показано, что под действием рчЦфА достоверно усиливается экспрессия генов *mmp8*, *mmp9* и *mmp12* (рис. 60). Уровень мРНК других вышеуказанных ММР оставался без изменения.



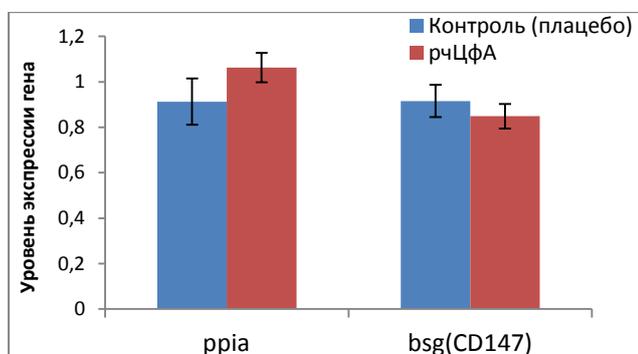
**Рисунок 60** - Уровень экспрессии ряда генов матриксных металлопротеиназ в перевиваемой меланоме В16. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$

Помимо экспрессии генов ММР в меланоме В16 определяли уровень мРНК тканевых ингибиторов металлопротеиназ (Timp-1 и Timp-2), и обнаружили, что рчЦфА вызывает достоверное усиление экспрессии гена *timp-1* (рис. 61).



**Рисунок 61** - Уровень экспрессии генов *timp-1* и *timp-2* в перевиваемой меланоме В16. \* $p \leq 0,05$

Стоит особо отметить, что введение рчЦфА не оказывало влияния на экспрессию гена собственного (эндогенного) ЦфА (*ppia*), а также гена его основного рецептора CD147 (*bsg*) в меланоме В16 (рис. 62).



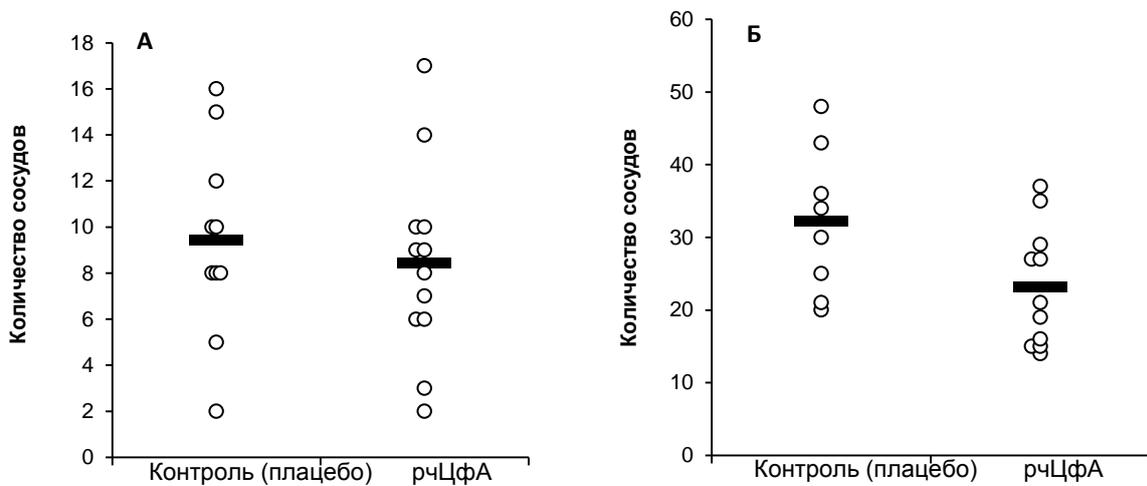
**Рисунок 62** - Уровень экспрессии генов *ppia* и *bsg* в перевиваемой меланоме В16

Таким образом, рчЦфА не влияет на экспрессию в тканях первичной меланомы В16 генов ряда ММР 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

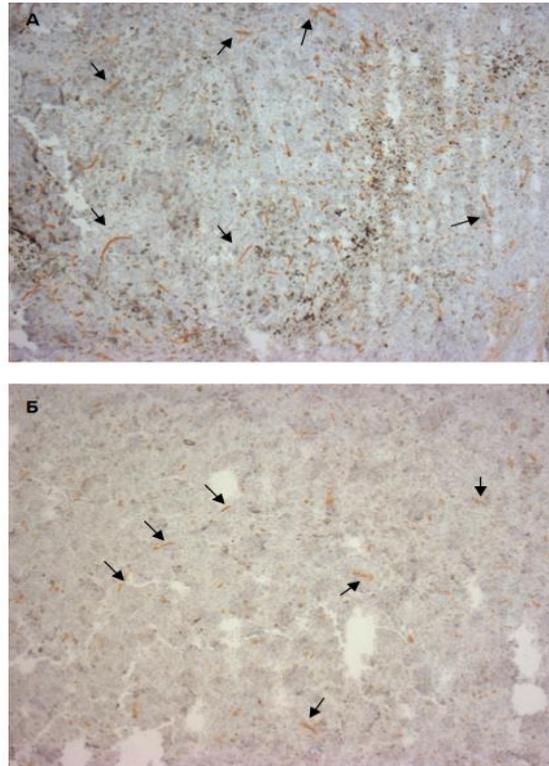
модели рЧЦФА не выступает в качестве фактора опухолевой прогрессии. Более того, рЧЦФА повышает экспрессию генов MMP8, 9 и 12 и тканевого ингибитора металлопротеиназ Timр-1, способных проявлять противоопухолевую активность на разных стадиях канцерогенеза.

### 3.4.2. Влияние рЧЦФА на формирование сосудов в опухоли

Для изучения влияния рЧЦФА на процесс ангиогенеза опухоли использовали модель перевиваемой меланомы В16. На 10 день в первичных опухолевых узлах В16 методом иммуногистохимии определяли количество сосудов длиной 100 мкм и сосудов с просветами (рис. 63, 64). При этом показатель ТРО под действием рЧЦФА составил 64,8%. Данное исследование показало, что рЧЦФА не оказывает влияния на формирование сосудов при росте меланомы В16.

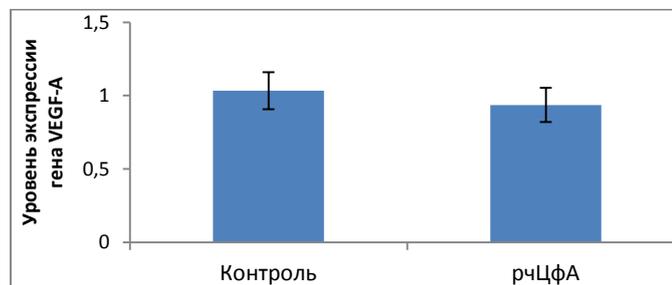


**Рисунок 63** - Анализ количества сосудов длиной 100 мкм (А) и сосудов с просветами (Б) в первичных опухолевых узлах меланомы В16



**Рисунок 64** - Репрезентативные гистологические срезы первичных опухолевых узлов меланомы B16 в **А)** контрольной группе мышей (плацебо) и **Б)** в группе мышей, обработанных рчЦфА. Увеличение x100. Стрелками показаны отдельные сосуды

Методом количественной ПЦР был также определен уровень экспрессии гена фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) в первичной опухолевой ткани меланомы B16 на 14 день после прививки. Введение рчЦфА не привело к изменению уровня экспрессии данного гена (рис. 65).



**Рисунок 65** - Уровень экспрессии гена *vegfa* в перевиваемой меланоме B16

**Таким образом, в используемой модели рчЦфА не влияет на процессы ангиогенеза меланомы B16 *in vivo*.**

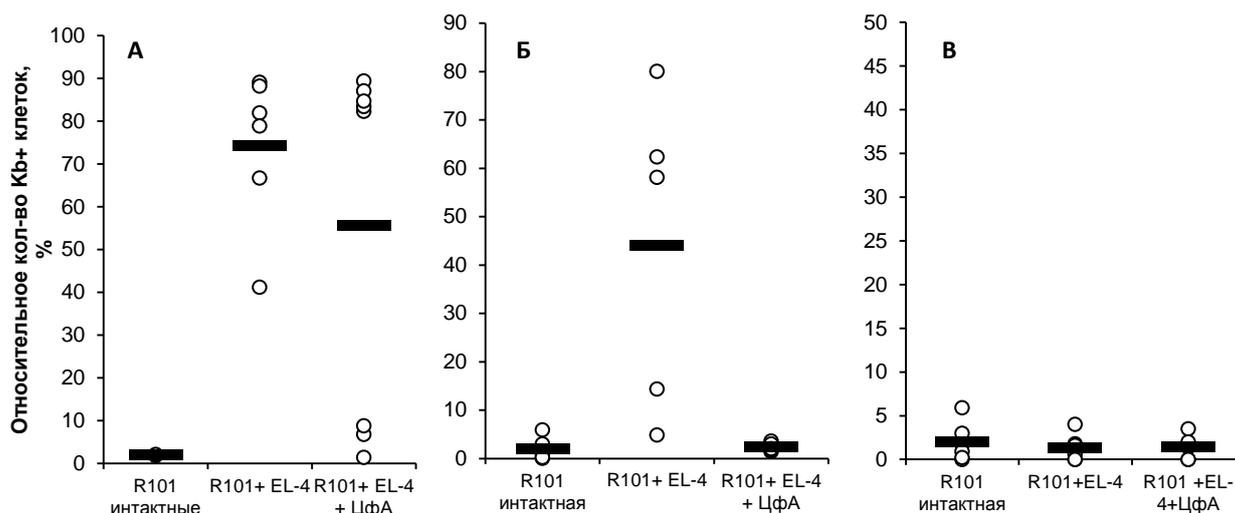
### ***3.4.3. Роль рчЦфА в развитии противоопухолевого иммунного ответа***

Как было сказано ранее, секреторный ЦфА является провоспалительным фактором, участвующим в формировании очага воспаления при инфицировании и в ходе патогенеза различных заболеваний. Принимая во внимание хемоаттрактивные свойства исследуемого белка в отношении клеток гемопоэтической и иммунной систем организма, в рамках настоящей работы было решено изучить роль рчЦфА в развитии противоопухолевого иммунного ответа.

#### ***3.4.3.1 Оценка влияния рчЦфА на динамику отторжения клеток лимфомы EL-4 в мышцах линии B10.D2(R101)***

Данное исследование проводили на мышах линии B10.D2(R101) ( $K^dI-A^dI-E^dD^b$ ), которым внутрибрюшинно вводили клетки опухоли EL-4 ( $K^bD^b$ ). Часть животных в течение 3 дней обрабатывали рчЦфА в дозе 100,0 мкг/мышь путем внутрибрюшинной инъекции. Через 6, 9 и 12 дней после иммунизации проводили оценку динамики элиминации опухолевых клеток по маркеру Kb и анализировали субпопуляционный состав клеток в месте локализации опухоли (в брюшной полости мышей). Кроме того, определяли количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток и соотношение субпопуляций наивных клеток CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>, центральных клеток памяти CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> и эффекторов CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> в селезенке иммунизированных животных.

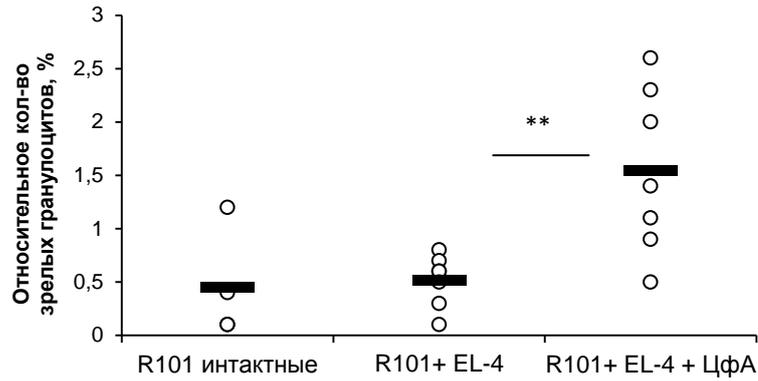
Анализ динамики отторжения клеток EL-4 показал, что под действием рчЦфА полная элиминация опухолевых клеток происходит к 9 дню после иммунизации (рис. 66Б), тогда как в норме мыши линии B10.D2(R101) отторгают EL-4 на 12 день (рис. 66В).



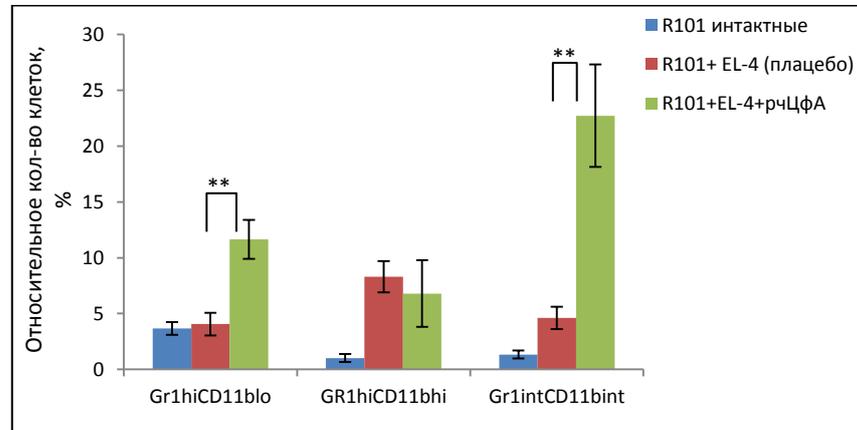
**Рисунок 66** - Влияние рчЦфА на динамику элиминации клеток лимфомы EL-4 из брюшной полости мышей линии B10.D2(R101). **А)** 6 день, **Б)** 9 день, **В)** 12 день после иммунизации.

На 6 день после иммунизации в брюшной полости мышей, обработанных рчЦфА, наблюдалось накопление зрелых гранулоцитов (Gr-1hiCD11bhi) (рис. 67). В отсутствие рчЦфА увеличение пула данных клеток происходит только к 9 дню (рис. 68). Стоит отметить, что рчЦфА также стимулировал накопление незрелых нейтрофилов (Gr-1hiCD11blo) и промиелоцитов и миелоцитов на 9 день после введения клеток лимфомы (рис. 68). К 12 дню в обеих опытных группах сохранялось повышенное относительное количество незрелых нейтрофилов в лаваже, тогда как содержание клеток двух других субпопуляций восстанавливалось до уровня интактных (неиммунизированных) животных (рис. 69).

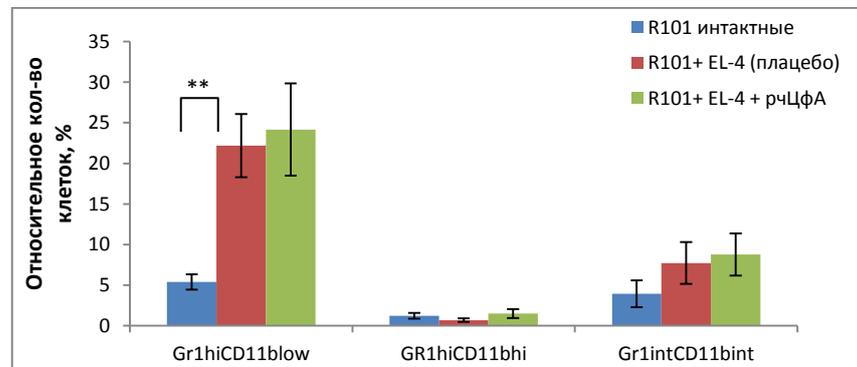
**Таким образом, ускоренное привлечение гранулоцитов в сайт локализации клеток - мишеней может быть первой фазой модуляции иммунного ответа под действием рчЦфА.**



**Рисунок 67** - Относительное количество Gr-1hiCD11bhi клеток в брюшной полости мышей линии B10.D2(R101) на 6 день после введения лимфомы EL-4. \*\*  $p \leq 0,01$

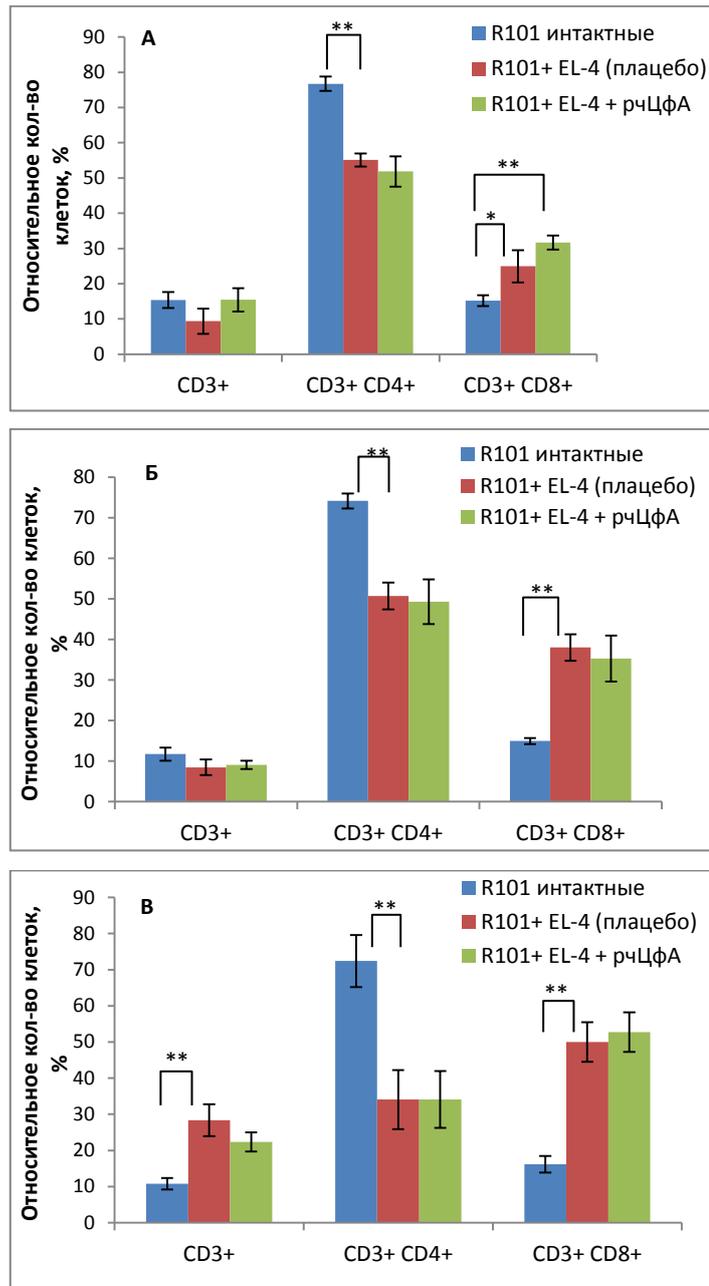


**Рисунок 68** - Относительное количество различных субпопуляций гранулоцитов в брюшной полости мышей линии B10.D2(R101) на 9 день после введения лимфомы EL-4. \*\*  $p \leq 0,01$



**Рисунок 69** - Относительное количество различных субпопуляций гранулоцитов в брюшной полости мышей линии B10.D2(R101) на 12 день после введения лимфомы EL-4. \*\*  $p \leq 0,01$

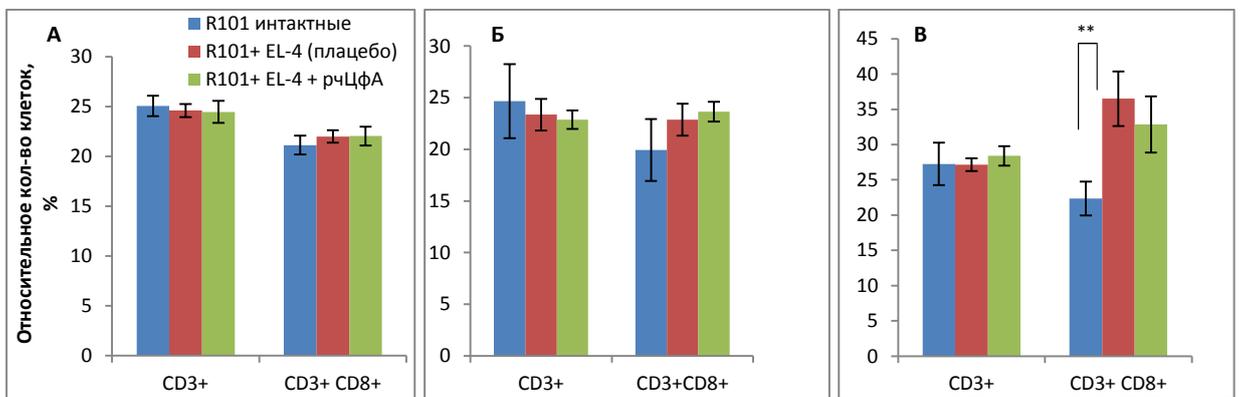
Иммунизация мышей линии В10.Д2(Р101) клетками EL-4 сопровождается накоплением Т-клеток (CD3+) в брюшной полости, т.е. в сайте локализации клеток-мишени (рис. 70В). При этом, начиная с 6 дня после введения опухолевых клеток, происходит увеличение относительного количества CD8+ Т-лимфоцитов (рис. 70). На изученных сроках не было выявлено влияние рЦФА на динамику CD3+ клеток в брюшной полости иммунизированных животных.



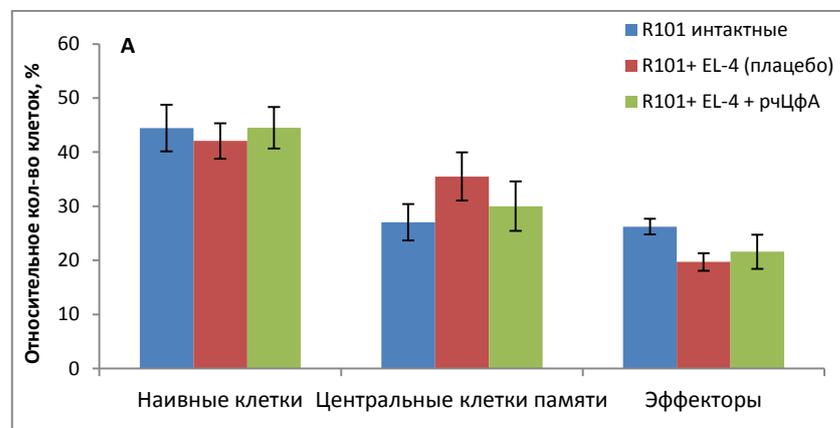
**Рисунок 70** - Относительное количество Т-клеток и соотношение Т-хелперов (CD3+CD4+) и Т-киллеров (CD3+CD8+) в брюшной полости мышей

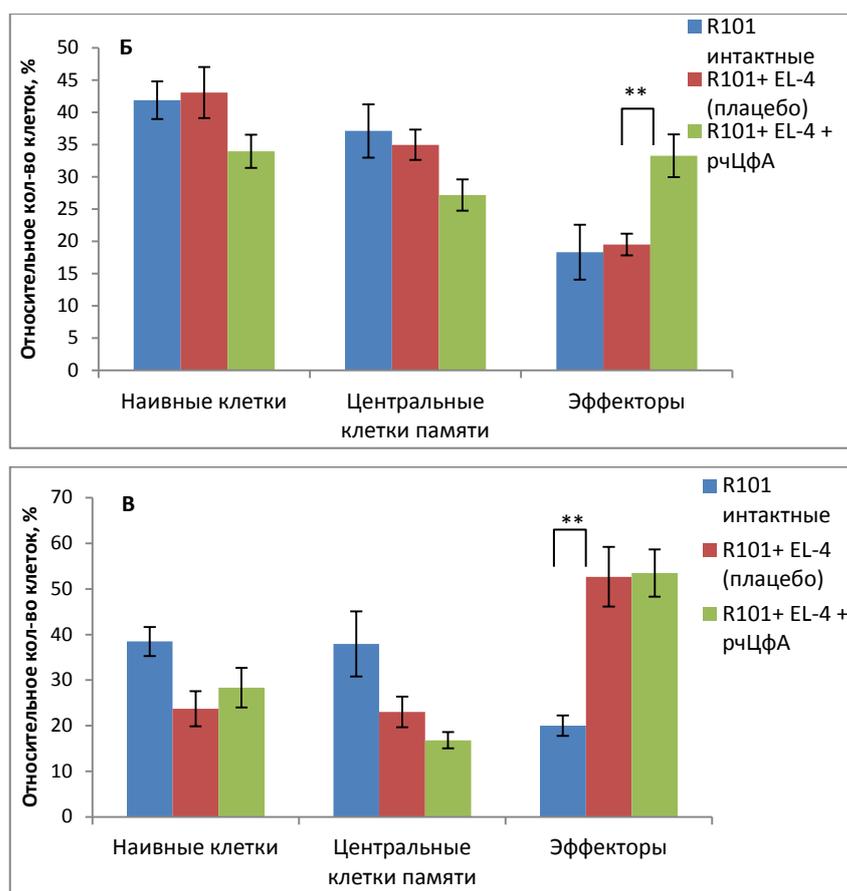
линии B10.D2(R101) на 6 день (А), 9 день (Б) и 12 день (В) после введения лимфомы EL-4. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

Помимо увеличения пула  $CD8^+$  Т-клеток в брюшной полости накопление Т-киллеров происходит в селезенке мышей на 12 день после трансплантации клеток EL-4 (рис. 71В). На этом же сроке наблюдается рост относительного количества эффекторных  $CD8^+$  Т-лимфоцитов (рис. 72В). При этом введение рЦФА иммунизированным животным приводит к ускоренному накоплению эффекторов к 9 дню (рис. 72Б, В), что коррелирует с динамикой отторжения опухолевых клеток (рис. 66).



**Рисунок 71** - Относительное количество Т-клеток ( $CD3^+$ ) и Т-киллеров ( $CD3^+CD8^+$ ) в селезенке мышей линии B10.D2(R101) на 6 день (А), 9 день (Б) и 12 день (В) после введения лимфомы EL-4. \*\*  $p \leq 0,01$





**Рисунок 72** - Относительное количество основных популяций CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке мышей линии B10.D2(R101) на 6 день (А), 9 день (Б) и 12 день (В) после введения лимфомы EL-4. \*\* $p \leq 0,01$

Полученные данные демонстрируют роль рЧЦФА в формировании адаптивного противоопухолевого иммунного ответа на лимфому EL-4.

### 3.4.3.2. Оценка влияния рЧЦФА на динамику отторжения клеток лимфомы EL-4 в мышах трансгенной линии 1D1b

Описанная выше модель представляет собой аллогенную систему, в которой отторжение опухолевых клеток происходит в силу различий по одной молекуле главного комплекса гистосовместимости (МНС, от англ. major histocompatibility complex) I класса. Для того чтобы сделать экспериментальную систему более адекватной клинической практике мы использовали созданную ранее в нашей лаборатории трансгенную линию мышей 1D1b.

Данные трансгенные животные, выведенные на генетической основе линии мышей B10.D2(R101 (K<sup>d</sup>I-A<sup>d</sup>I-E<sup>d</sup>D<sup>b</sup>), характеризуются экспрессией в Т-лимфоцитах β-цепи Т-клеточного рецептора (ТКР) клеток памяти, специфичных к молекуле МНС I класса H-2K<sup>b</sup> [122]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что у данных мышей не развивается полноценный иммунный ответ на клетки EL-4, несущие специфический антиген H-2K<sup>b</sup>. Вследствие этого происходит иммуноредактирование (потеря специфического антигена) опухоли и избегание иммунологического надзора клетками лимфомы, что часто наблюдается в клинической практике. В результате 90% мышей 1D1b погибают в течение 80 дней после введения лимфомы [122].

Для того, чтобы оценить влияние рчЦФА на формирование пула эффекторных Т-клеток у мышей трансгенной линии 1D1b животных иммунизировали клетками лимфомы EL-4 и обрабатывали рчЦФА в течение 7 дней. Через 12 дней после иммунизации анализировали различные субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в селезенке мышей (табл. 28).

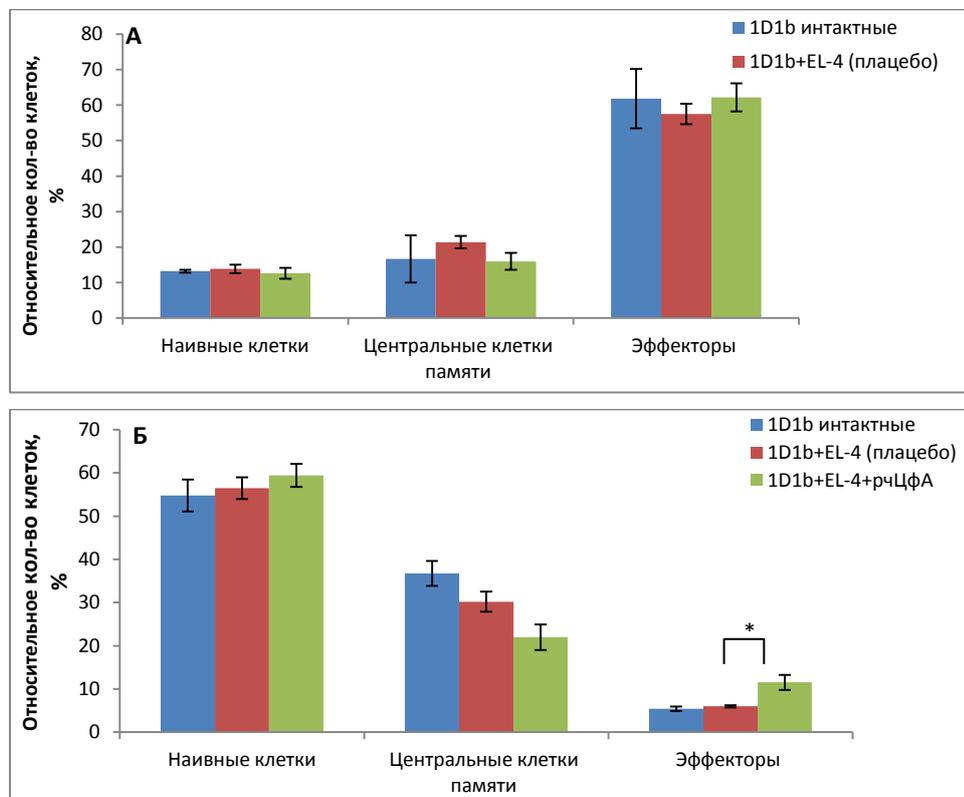
**Таблица 28** - Относительное количество различных субпопуляций CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке мышей линии 1D1b

Группа	Т-клетки с эндогенными β-цепями			Т-клетки с трансгенной β-цепью		
	Наивные клетки	Центральные Т-клетки памяти	Эффекторные клетки	Наивные клетки	Центральные Т-клетки памяти	Эффекторные клетки
1D1b интактные	7,8 ± 0,3	16,7 ± 6,6	61,8 ± 8,4	54,8 ± 3,7	36,7 ± 2,9	5,4 ± 0,5
1D1b+EL-4	13,8 ± 1,2	21,4 ± 1,7	57,5 ± 2,9	56,5 ± 2,5	30,2 ± 2,3	6,0 ± 0,3
1D1b + EL-4 + рчЦФА	12,6 ± 1,5	16,0 ± 2,3	62,2 ± 3,9	59,4 ± 2,6	21,9 ± 2,9	11,5 ± 2,0*

\* p ≤ 0,05 при сравнении с контрольной группой 1D1b + EL-4

Как было показано ранее [122], большая доля Т-лимфоцитов интактных мышей 1D1b, экспрессирующих эндогенные  $\beta$ -цепи ТКР, имеет фенотип эффекторных клеток. Иммунизация трансгенных животных клетками лимфомы EL-4 не приводит к увеличению данной субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. При этом Т-лимфоциты, несущие трансгенную  $\beta$ -цепь ТКР, не способны приобретать фенотип активированных клеток (CD62L-CD44<sup>+</sup>) в присутствии специфического антигена (H-2K<sup>b</sup>) [122] (табл. 28, рис. 73А).

В ходе настоящего исследования обнаружено, что введение рчЦФА трансгенным мышам на фоне иммунизации клетками лимфомы EL-4 (H-2K<sup>b</sup>) не вызывало изменения относительного количества активированных клеток (CD62L-CD44<sup>+</sup>) среди Т-лимфоцитов с эндогенными  $\beta$ -цепями ТКР (табл. 27, рис. 73А). Однако, в популяции Т-лимфоцитов с трансгенной  $\beta$ -цепью ТКР наблюдалось достоверное увеличение пула эффекторных клеток под действием исследуемого белка (табл. 28, рис. 73Б).



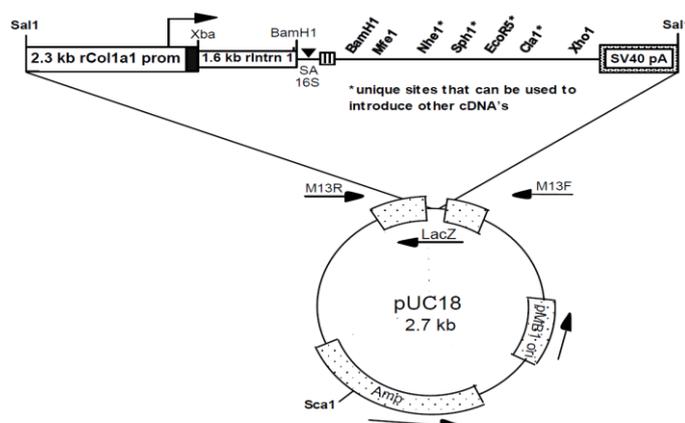
**Рисунок 73** - Субпопуляционный состав CD8<sup>+</sup> Т-клеток мышей трансгенной линии 1D1b. А) Т-лимфоциты, экспрессирующие эндогенные  $\beta$ -цепи

Т-клеточного рецептора; Б) Т-лимфоциты, экспрессирующие трансгенную  $\beta$ -цепь Т-клеточного рецептора. \*  $p \leq 0,05$

**Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что рчЦФА играет роль в стимуляции противоопухолевого иммунного ответа даже в условиях сокращенного репертуара ТКР у мышей трансгенной линии 1D1b.**

### **3.5. Создание модели для оценки роли ЦФА как фактора микроокружения костного мозга, участвующего в дифференцировке стволовых клеток**

Для изучения роли ЦФА как фактора микроокружения гемопоэтических клеток костного мозга была разработана модель трансгенных мышей с повышенной экспрессией данного белка в остеобластах. С этой целью использовали кассетный вектор pUC18, любезно предоставленный Mark Kronenberg (Dept. Of Reconstructive Sciences, Университет штата Коннектикут, Центр здоровья Центрального Университета штата Мичиган, США), который содержит фрагмент промотора крысиного коллагена I типа  $\alpha$  длиной 2,3 т.п.н. (далее 2,3 kb Col1a1) (рис. 74). Данный фрагмент промотора обеспечивает специфичную экспрессию трансгена в остеобластах, активируется на поздней стадии дифференцировки остеобластов и сохраняет активность в зрелых остеоцитах [123]. Кроме того, в экспрессионном векторе pUC18 содержится первый интрон промотора Col1a1, который обеспечивает высокий уровень экспрессии трансгена [123].

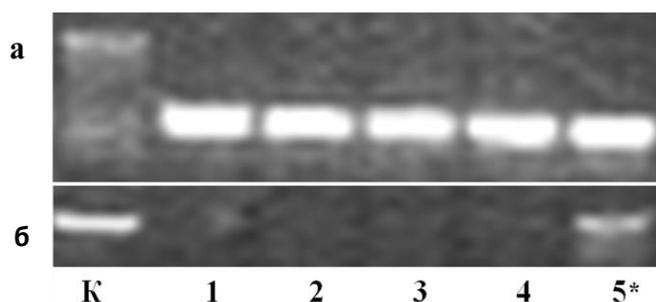


**Рисунок 74** - Плазмида pUC18, содержащая первый интрон (1.6 kb rIntrn 1) и фрагмент промотора крысиного коллагена I типа  $\alpha$  (2.3 kb rCol1a1 prom)

Для создания экспрессионной генетической конструкции полноразмерную кДНК мЦфА клонировали в вектор pUC18 по сайтам NheI и ClaI. Затем из полученной плазмиды pUC18-мЦфА рестриктазой SalI вырезали фрагмент длиной около 5 т.п.н. (рис. 74), который инъецировали в пронуклеус оплодотворенных яйцеклеток.

### ***3.5.1. Получение трансгенных мышей с повышенной экспрессией ЦфА в остеобластах***

На первом этапе работы в качестве доноров яйцеклеток использовали самок мышей инбредной линии C57BL/6. 237 яйцеклетки, инъецированные генетической конструкцией pUC18-мЦфА, пересадили 29 псевдобеременным самкам (табл. 29). Всего было получено 12 детенышей от 4 самок, из них два мертвых плода извлекли при кесаревом сечении через 21 день после трансплантации яйцеклеток. У одного мертвого детеныша была отмечена недоразвитость кожных покровов. Анализ геномной ДНК выявил наличие трансгена только у двух мертворожденных плодов (рис. 75).



**Рисунок 75** - Фрагмент ПЦР-анализа потомства, рожденного после микроинъекции генетической конструкции рUC18-мЦфА. а) Продукты амплификации праймерами к гену CD4; б) Продукты амплификации специфическими праймерами. К- экспрессионный вектор рUC18-мЦфА, 1- 5 - геномная ДНК мышей, развившихся из инъекцированных зигот. \* - геномная ДНК мертвого плода.

**Таблица 29** - Эффективность получения трансгенных мышей с гиперэкспрессией ЦфА в остеобластах

Доноры яйцеклеток	Кол-во пересаженных зигот	Частота беременности реципиентов <sup>1</sup> (%)	Уровень приживаемости эмбрионов <sup>2</sup> (%)	Кол-во трансгенных мышей	
				Всего	Живых
Самки линии C57BL/6	237	4/29 (13,8)	12/237 (5,0)	2	0
Самки F1(СВАхС57BL/6)	390	14 + 1 аборт/50 (30,0)	26/390 (6,7)	1	0
Самки F1(СВАхС57BL/6) (пересадка интактных яйцеклеток)	100	7/10 (70,0)	18/100 (18,0)	x	x

<sup>1</sup>Кол-во беременных реципиентов /Общее кол-во реципиентов

<sup>2</sup>Количество новорожденных /Общее количество пересаженных зигот

Наблюдавшаяся низкая частота беременности реципиентов (14%; табл. 29) могла быть обусловлена использованием в работе зигот инбредных мышей,

которые отличаются низкой жизнеспособностью *in vitro*, плохой выживаемостью после микроинъекций и при трансплантации псевдобеременным самкам [124].

Для исключения влияния генетической основы инбредной линии на эффективность трансгенеза на следующем этапе работы в качестве доноров оплодотворенных яйцеклеток использовали самок гибридов F1(CBA x C57BL/6), которые широко применяются при получении трансгенных мышей и отличаются хорошими воспроизводительными качествами [124]. После трансплантации микроинъецированных яйцеклеток F1(CBA x C57BL/6) количество беременных реципиентов оказалось в два раза больше по сравнению с группой самок, которым трансплантировали эмбрионы инбредной линии C57BL/6 (28,0% и 13,8% соответственно; табл. 29). Однако стоит отметить, что как инбредные, так и гибридные эмбрионы плохо выживали после микроинъекций экспрессионной конструкции рUC18-мЦФА. Общее количество новорожденных мышат, в том числе мертворожденных, в группе микроинъекций составило всего 6,0% от общего количества пересаженных зигот, тогда как в контрольной группе их было в три раза больше (табл. 29).

После пересадки 390 гибридных эмбрионов 50 псевдобеременным самкам от 14 реципиентов было получено 26 потомков, в том числе 1 мертворожденный детеныш (табл. 29). ПЦР - анализ геномной ДНК потомства показал, что носителем трансгена был только мертворожденный плод. В целом в ходе работы по получению первичных трансгенных мышей после трансплантации 627 инъецированных яйцеклеток получено 38 потомков, из них 3 трансгенных мертворожденных плода.

**Таким образом, независимо от генетической основы доноров яйцеклеток наблюдался низкий уровень выживаемости зигот, невысокая эффективность трансгенеза и отсутствие жизнеспособных первичных трансгенных животных. Эти эффекты могли быть обусловлены гиперэкспрессией ЦФА, приводящей к гибели трансгенных эмбрионов на ранних стадиях развития.**

### 3.5.2. Оценка антенатального развития трансгенных эмбрионов

Для проверки данной гипотезы провели исследование самок-реципиентов на 12 день после трансплантации инъецированных гибридных яйцеклеток. Уровень доимплантационной гибели этих эмбрионов составил 80%, что на 17% выше по сравнению с данным показателем в группе самок с пересаженными интактными гибридными яйцеклетками (табл. 30). Уровень постимплантационной гибели эмбрионов в обеих группах был сопоставим (табл. 30), однако ПЦР - анализ показал, что около 66% резорбированных микроинъецированных плодов были трансгенными (табл. 31). На основании полученных результатов мы предположили, что именно экспрессия ЦфА стала основной причиной постимплантационной гибели микроинъецированных эмбрионов.

**Таблица 30** - Уровень выживаемости эмбрионов на 12 день после трансплантации реципиентам

Доноры яйцеклеток	Тип яйцеклеток	Кол-во имплантированных эмбрионов (%) <sup>1</sup>	Уровень выживаемости эмбрионов	
			Кол-во живых эмбрионов <sup>2</sup> (%)	Кол-во резорбированных эмбрионов <sup>3</sup> (%)
F1(СВАхС57BL/6)	Инъецированные яйцеклетки	22/110 (20,0%)	10/22 (45,5)	12/22 (54,5)
F1(СВАхС57BL/6)	Интактные яйцеклетки	37/100 (37,0%)	18/37 (48,6)	19/37 (51,4)

<sup>1</sup>Количество мест имплантации/Общее количество пересаженных яйцеклеток

<sup>2</sup>Количество живых плодов/Общее количество мест имплантации

<sup>3</sup>Количество резорбированных плодов/Общее количество мест имплантации

**Таблица 31** - Уровень выживаемости трансгенных эмбрионов на 12 день после трансплантации реципиентам

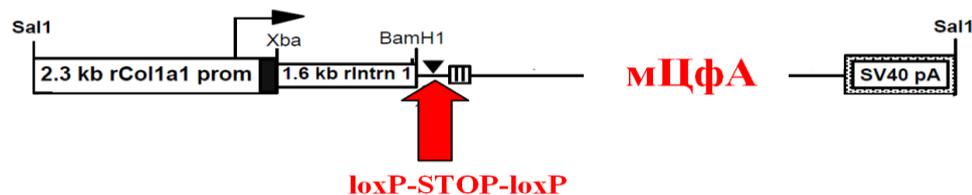
Тип эмбрионов	Всего	Трансгенных	Относительное кол-во трансгенных эмбрионов, %
Живые	10	3	30,0
Резорбированные	12	8	66,7
<b>Итого:</b>	22	11	50

**Таким образом, конститутивная гиперэкспрессия ЦфА в остеобластах может обладать эмбриотоксичностью, проявляющейся на разных этапах развития плода и приводящей к гибели всех трансгенных эмбрионов (табл. 29).**

### *3.5.3. Создание трансгенных мышей с индуцируемой экспрессией ЦфА в остеобластах*

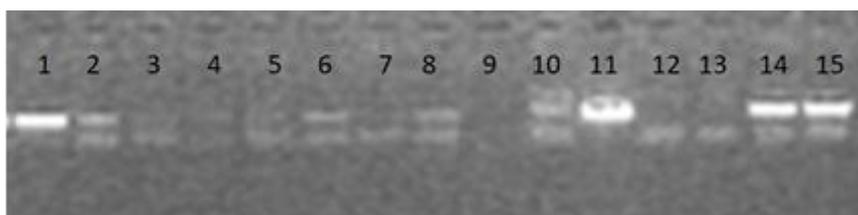
Вследствие эмбриотоксичности ЦфА, выявленной при его конститутивной гиперэкспрессии в остеобластах, оказалось невозможным получить целевых трансгенных мышей для изучения роли данного белка как фактора микроокружения ГСК. Поэтому были созданы трансгенные мыши с индуцируемой экспрессией ЦфА в остеобластах.

С этой целью проведена модификация генетической конструкции рUC18-мЦфА путем вставки последовательности СТОП - кассеты, фланкированной loxP - сайтами (loxP-STOP-loxP), между первым интроном промотора и последовательностью кДНК мЦфА (рис. 76), что препятствовало экспрессии гена мЦфА в отсутствие Cre-рекомбиназы.



**Рисунок 76** - Схематичное изображение модифицированной экспрессионной конструкции рUC18 - STOP - мЦфА

В ходе трансгеноза генетической конструкции рUC18 - STOP - мЦфА было получено 4 первичных трансгенных мыши на генетической основе F1(СВАхС57BL/6), у которых отсутствовали фенотипические особенности роста и развития. Путем 6 возвратных скрещиваний с мышами С57BL/6 выведена чистая линия трансгенных мышей Сур-STOP (рис. 77).



**Рисунок 77** - Фрагмент ПЦР-анализа потомков F6 скрещивания Сур-STOP х С57BL/6: 1- генетическая конструкция рUC18 - STOP - мЦфА (положительный контроль); 2 - 15 - геномная ДНК мышей - потомков F6

Для получения целевых трансгенных животных мышей линии Сур-STOP скрещивали с мышами линии Osx-Cre, которая характеризуется тетрациклин-зависимой (в отсутствии тетрациклина, tet-off система) индукцией экспрессии Cre-рекомбиназы под промотором транскрипционного фактора Osx (рис. 78) [108].



**Рисунок 78** - Фрагмент ПЦР-анализа потомков F1 скрещивания *Сур* - *STOP* x *Osx* - *Cre*: **А)** амплификация праймерами к генетической конструкции *pUC18* - *STOP* - мЦфА; **Б)** амплификация праймерами к генетической конструкции *Osx* - *Cre*; 1 - генетическая конструкция *pUC18* - *STOP* - мЦфА (положительный контроль); 2 - генетическая конструкция *Osx*-*Cre* (положительный контроль); 3 - 15 - геномная ДНК мышей - потомков F1. Трансгенные мыши с генотипом *Сур*-*STOP*<sup>+</sup>*Cre*<sup>+</sup> выделены красным.

Таким образом, в разработанной модели кондиционных трансгенных мышей с экспрессией ЦфА в остеобластах используется сочетание *tet-off* и *Cre-loxP* систем. В потомстве от скрещивания двух трансгенных линий *Сур*-*STOP* и *Osx*-*Cre* экспрессия исследуемого белка будет наблюдаться у животных с генотипом *Сур*-*STOP*<sup>+</sup>*Cre*<sup>+</sup> только в отсутствии тетрациклина - ингибитора экспрессии *Cre*-рекомбиназы. Созданные трансгенные мыши могут использоваться в качестве модели для изучения роли ЦфА как фактора микроокружения ГСК на разных этапах развития организма.

#### 3.5.4. Изучение эмбрио - и фетотоксического действия рчЦфА

Для подтверждения эмбриотоксичности, выявленной при конститутивной гиперэкспрессии ЦфА, проведено дополнительное исследование с использованием рчЦфА, который вводили самкам F1(*СВА/Лас* x *С57BL/6*) на различных сроках беременности: в доимплантационный период, в период органогенеза и фетогенеза (табл. 32). В данном исследовании использовали дозу рчЦфА 2,0 мг/мышь (100,0 мг/кг), которая в 20 раз превышает терапевтическую дозу. Контрольной группе самок (плацебо) вводили PBS в течение всей беременности.

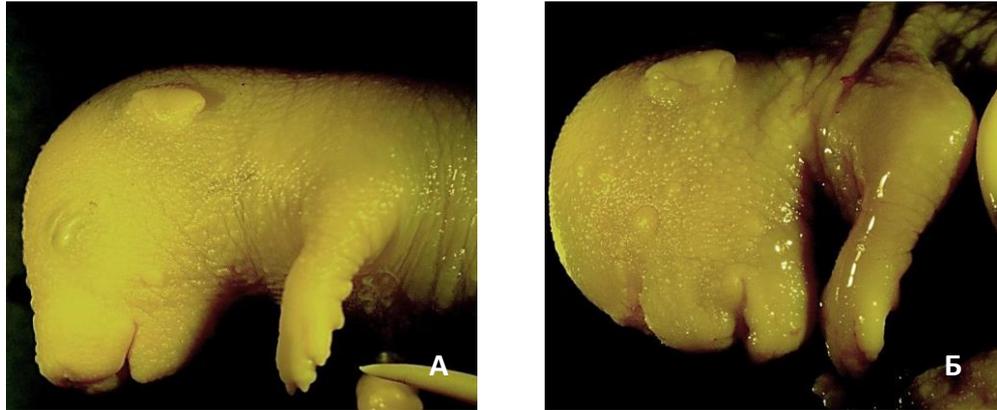
Введение рЦФА беременным мышам в различные периоды не оказало влияния на общий размер помета, количество живых детенышей, массу и краниокаудальный размер живых плодов. Также не наблюдалось отставания в развитии эмбрионов у самок опытных групп по сравнению с контрольной группой (плацебо). Количество мертвых и резорбированных плодов в опытных группах не отличалось от контроля.

Однако, при оценке анатомических пороков развития выявлено повреждающее действие рЦФА при введении беременным самкам в период органогенеза (табл. 32).

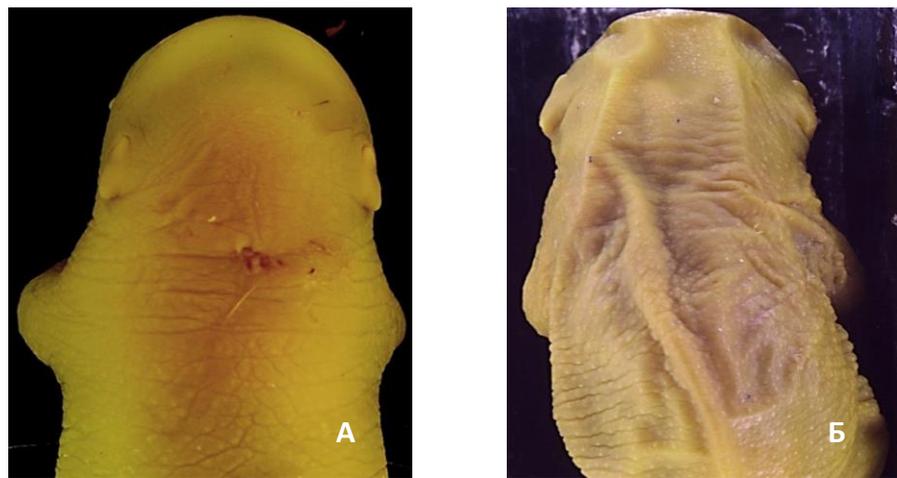
**Таблица 32 - Влияние рЦФА на развитие анатомических пороков плода**

Параметр	Контрольная группа (плацебо)	100 мг/кг рЦФА		
		0,5 - 5,5 день (доимплантационный период)	6,5 - 11,5 день (органогенез)	12,5 - 17,5 день (фетогенез)
<b>Внешний осмотр плодов</b>				
Кол-во обследованных плодов	49	55	69	56
из них с аномалиями развития	2	2	16	1
%	4,1	3,6	23,0	1,8
<b>Состояние костной системы:</b>				
Кол-во обследованных плодов	24	24	30	29
из них с аномалиями развития	0	0	7	2
%	0	0	23,3	6,9

У 23% изученных плодов данной группы при визуальном осмотре отмечались множественные аномалии лицевого (рис. 79) или мозгового отдела черепа (рис. 80), предположительно, обусловленные нарушением развития мандибулярных, максиллярных и назальных костей или парных париетальных и непарной интерпариетальной костей соответственно.

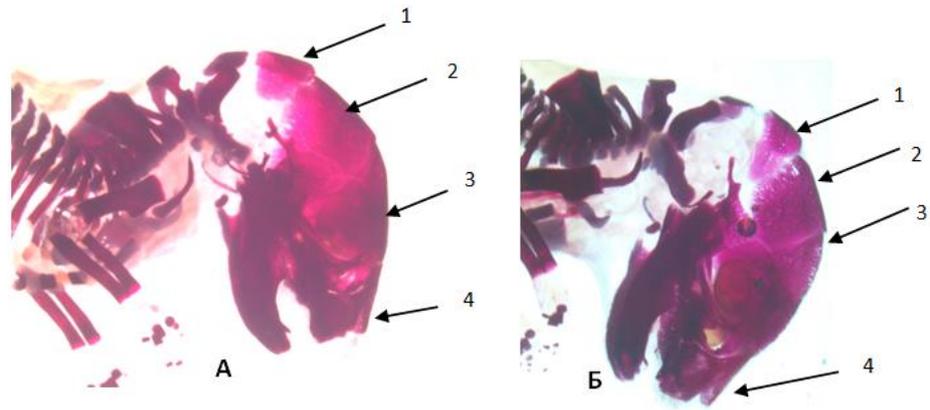


**Рисунок 79** - Нарушение развития лицевого отдела черепа эмбрионов самок, обработанных рчЦФА. А) Контрольная группа; Б) Введение рчЦФА самкам в период органогенеза. Увеличение  $\times 0,7$

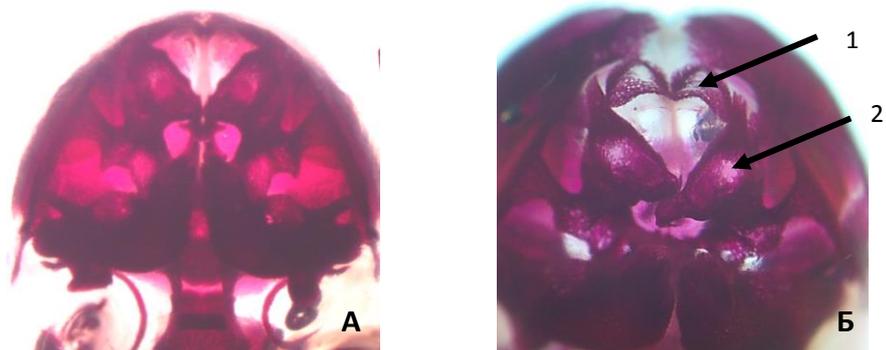


**Рисунок 80** - Нарушение развития мозгового отдела черепа эмбрионов самок, обработанных рчЦФА. А) Контрольная группа; Б) Введение рчЦФА самкам в период органогенеза. Увеличение  $\times 0,7$

При исследовании состояния скелета эмбрионов данной экспериментальной группы было выявлено замедление процесса оссификации всех костей черепа у 23% плодов (табл. 32, рис. 81 и 82).

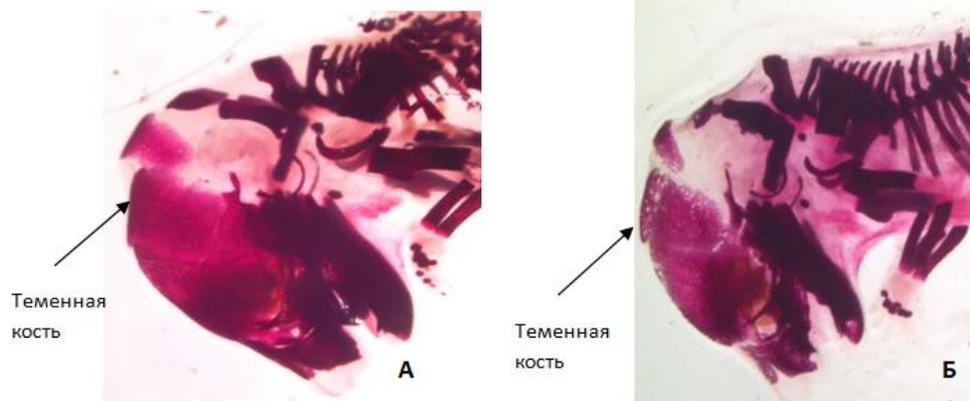


**Рисунок 81** - Нарушение оксификации костей черепа у эмбрионов самок, обработанных рчЦфА. А) Контрольная группа; Б) Введение рчЦфА самкам в период органогенеза. 1- затылочная кость, 2- теменная кость, 3<sub>т</sub> лобная кость, 4- назальная кость. Увеличение х1

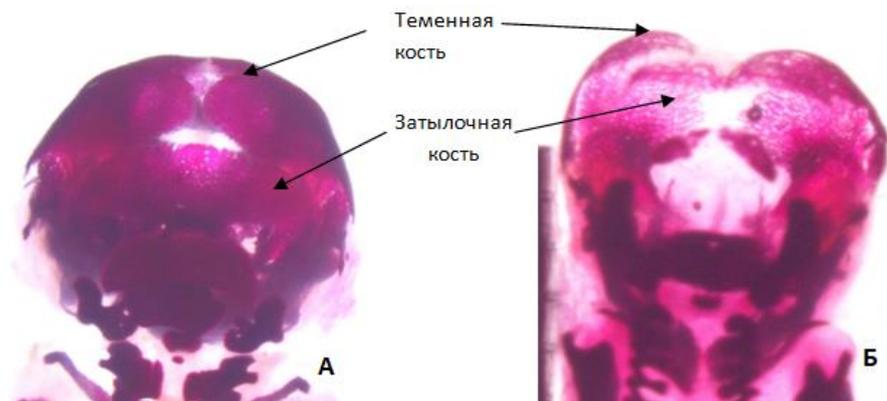


**Рисунок 82** - Нарушение оксификации костей черепа у эмбрионов самок, обработанных рчЦфА (показаны стрелками). А) Контрольная группа; Б) Введение рчЦфА самкам в период органогенеза. 1- назальные кости, 2- максиллярные кости. Увеличение х2

У эмбрионов самок, обработанных рчЦфА, отмечалось нарушение сращения теменных костей (рис. 83) и развития затылочной кости (рис. 84).

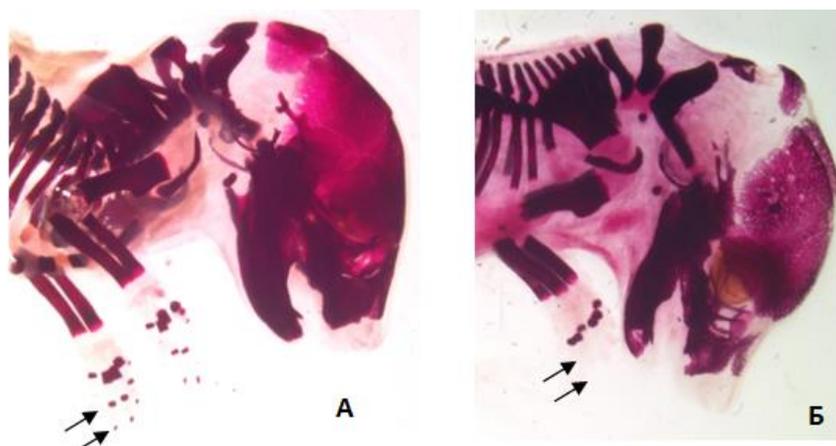


**Рисунок 83** - Дефект развития теменных костей у эмбрионов самок, обработанных рчЦФА. А) Контрольная группа; Б) Введение рчЦФА самкам в период органогенеза. Увеличение  $\times 1,5$

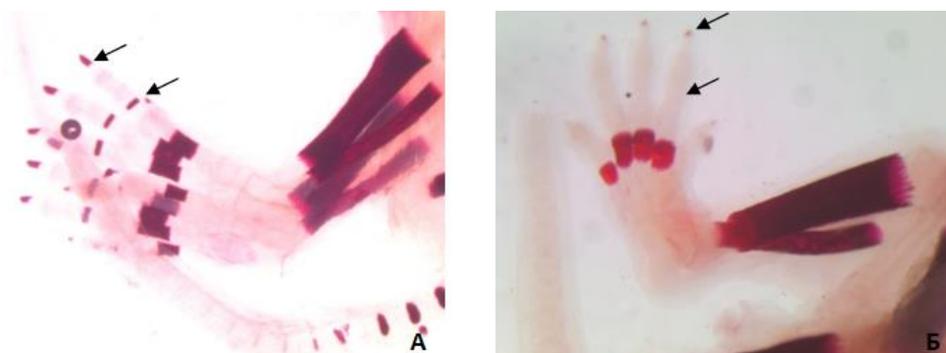


**Рисунок 84** - Дефект развития затылочной кости у эмбрионов самок, обработанных рчЦФА. А) Контрольная группа; Б) Введение рчЦФА самкам в период органогенеза. Также видно нарушение оссификации и сращения теменных костей. Увеличение  $\times 1$ .

У 10,0% плодов с описанными выше дефектами также выявлены нарушения оссификации фаланг пальцев обеих конечностей (рис. 85 и 86).



**Рисунок 85** - Дефект оссификации фаланг пальцев верхней конечности у эмбрионов самок, обработанных рчЦФА. А) Контрольная группа; Б) Введение рчЦФА самкам в период органогенеза. Увеличение x1



**Рисунок 86** - Дефект оссификации фаланг пальцев нижней конечности у эмбрионов самок, обработанных рчЦФА. А) Контрольная группа; Б) Введение рчЦФА самкам в период органогенеза. Увеличение x2

Введение рчЦФА беременным самкам в доимплантационный период или период фетогенеза не приводило к увеличению частоты или изменению характера аномалий, которые наблюдали в контрольной группе.

**Таким образом, в ходе данного исследования выявлены эмбриотоксические свойства высоких доз рчЦФА. Наибольшее тератогенное действие данный белок оказывал в период органогенеза. Полученные результаты подтверждают наблюдавшийся токсический эффект конститутивной гиперэкспрессии мЦФА, которая приводит к гибели трансгенных животных в антенатальном периоде.**

## 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Циклофилин А (ЦфА) - это консервативный, широко распространенный белок с многочисленными функциями. Эндогенная форма данного белка является шапероном и компонентом различных сигнальных каскадов, а также участвует во внутриклеточном транспорте белков. Важнейшая функция экзогенного ЦфА заключается в его хемокиновой активности в отношении клеток костного мозга различных ростков дифференцировки [37], а также зрелых клеток иммунной системы [39], исходя из чего мы предположили, что данный белок может участвовать в восстановлении гемопоэтической и иммунной систем организма после воздействия высоких доз цитостатика или облучения. Кроме того, роль секреторного ЦфА как провоспалительного фактора в развитии и регуляции процессов воспаления указывает на наличие возможных иммуномодулирующих и противоопухолевых свойств данного белка.

Исследованию функций ЦфА как фактора гемопоэза, иммуномодуляции и противоопухолевой защиты организма посвящена настоящая диссертационная работа.

### *4.1. Влияние рЦфА на гемопоэз и иммунную систему интактных животных*

На первом этапе работы оценивали влияние рЦфА на гомеостаз кроветворной и иммунной систем организма интактных животных. Было показано, что однократное введение терапевтической дозы рЦфА (100,0 мг/мышь, 1 ТД) приводит к кратковременному увеличению относительного количества гранулоцитов в периферической крови мышей, что обусловлено хемоаттрактивной функцией данного белка и согласуется с нашими ранними результатами [37].

Курсовое 7 - дневное введение 1 ТД рЦфА не влияет на субпопуляционный состав клеток костного мозга, а также относительное

количество и активационный фенотип Т - лимфоцитов периферической крови интактных животных. Однако, при данном режиме введения исследуемый белок индуцирует активацию В - клеток периферической крови, что может обуславливать наблюдавшееся усиление гуморального иммунного ответа на эритроциты барана (ЭБ) (рис. 35).

Исследования *in vitro* подтвердили, что рЧЦфА является активатором и митогеном для В - лимфоцитов селезенки интактных мышей (рис. 37 - 39). Кроме того, было показано, что исследуемый белок регулирует пролиферацию активированных Т - лимфоцитов, при этом чувствительность клеток к митогенному действию рЧЦфА прямо коррелирует со степенью их активации (рис. 42).

Курсовое введение высоких доз рЧЦфА (10 - 30 ТД) приводит к усилению спонтанной пролиферации спленоцитов *ex vivo*, что может быть обусловлено *in vivo* активацией лимфоцитов. Дополнительное воздействие *ex vivo* Т-клеточным митогеном (Кон А) или рЧЦфА вызывает подавление пролиферативной активности клеток селезенки мышей, обработанных рЧЦфА (рис. 44, 45), что, вероятно, связано с избыточной активацией лимфоцитов. Полученные данные свидетельствуют о способности рЧЦфА в высоких дозах вызывать сенсibilизацию лимфоцитов, повышая их чувствительность к дополнительным активационным стимулам.

Сенсibilизирующее действие рЧЦфА может обуславливать наблюдавшееся подавление реакции ГЗТ (рис. 36): введение модельного антигена (ТНБС) после курсовой обработки животных исследуемым белком могло привести к избыточной активации Т-лимфоцитов *in vivo*, и, как следствие, подавлению их эффекторных функций при вторичном контакте с данным антигеном.

**Таким образом, выявлены иммуномодулирующие свойства рЧЦфА как митогена и фактора активации В - лимфоцитов. Кроме того показано, что исследуемый белок способен регулировать пролиферацию активированных Т-лимфоцитов, что может иметь важное значение для контроля их эффекторных функций. Курсовое введение рЧЦфА в терапевтической дозе не**

**оказывает значительного влияния на гемопозитическую систему интактного организма, однако при высоких дозах (10 - 30 ТД) исследуемый белок нарушает гомеостаз, вызывая сенсibilизацию лимфоцитов и повышая их чувствительность к активационным и митогенным стимулам.**

#### ***4.2. Роль рчЦфА в восстановлении гемопозитической и иммунной систем организма после сублетального облучения***

Проведенные исследования показали, что однократное системное введение 1 ТД рчЦфА стимулирует формирование колоний стволовых клеток в селезенке сублетально облученных мышей. Это подтверждает хемоаттрактивные свойства рекомбинатного белка в отношении ГСК [37].

Дальнейшие исследования проводили при курсовом введении рчЦфА и анализировали субпопуляционный состав клеток костного мозга, периферической крови, селезенки и тимуса через 7, 14 и 21 день после облучения животных.

Обнаружено, что через 7 дней после облучения количество лейкоцитов в крови мышей, обработанных рчЦфА, достоверно превышает значения в контрольной группе облученных животных, что сопровождается увеличением доли гранулоцитов Gr1+CD11b+ (рис. 12А). На более поздних сроках данный эффект не наблюдали. Это свидетельствует о роли рчЦфА в восстановлении клеток периферической крови в первые, самые критические дни после облучения. Являясь хемоаттрактантом для клеток костного мозга, данный белок стимулирует их миграцию в кровь, при этом наибольшей чувствительностью к рчЦфА обладают зрелые гранулоциты Gr1+CD11b+, что подтверждают ранние данные [37] и результаты, полученные при изучении влияния данного белка на гомеостаз кроветворной системы интактных животных (рис. 7).

Стоит особо отметить, что развитие лейкоцитоза под действием рчЦфА может быть фактором повышения резистентности облученного организма, т.к. известно, что нейтрофилы являются важными эффекторными клетками врожденного иммунитета, которые принимают активное участие в развитии иммунного ответа на вирусные и бактериальные инфекции [125; 126].

В нашем исследовании не обнаружено влияние рчЦфА на динамику изменения клеточности и субпопуляционного состава клеток костного мозга ни на одном из сроков наблюдения. Это обусловлено тем, что выброс клеток из костного мозга под действием рчЦфА не приводит к опустошению данного органа, и количество мигрировавших клеток успевает восстановиться за счет его резервов. Следовательно, рчЦфА оказывает мягкое воздействие на процессы восстановления кроветворения после облучения в отличие от известных гемопозитических ростовых факторов (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора), использование которых приводит к снижению количества клеток в костном мозге и истощению пула ГСК [9; 10; 23].

В течение первой недели после облучения в селезенке животных, обработанных рчЦфА, отмечали восстановление пула стволовых клеток (Sca-1+) до уровня необлученных мышей. Эти данные коррелируют с результатами, полученными при оценке влияния белка на формирование эндоколоний в селезенке (см. выше). На второй неделе после облучения под влиянием рчЦфА наблюдали увеличение пула коммитированных предшественников Sca-1-CD31+ в селезенке, что свидетельствует о участии данного белка в восстановлении иммунной системы сублетально облученных мышей. К третьей неделе после облучения рчЦфА способствовал нормализации уровня незрелых гранулоцитов (CD31+Gr1+) в селезенке экспериментальных животных и приближению их количества к уровню у необлученных мышей.

Лимфоциты являются одним из наиболее радиочувствительных типов клеток, восстановление которых после облучения занимает длительное время [3]. Тем не менее под влиянием рчЦфА в селезенке мышей наблюдалось увеличение количества В - лимфоцитов (B220+) через 14 дней после облучения. При этом исследуемый белок не оказал влияния на восстановление Т - клеток в периферических лимфоидных органах. Эти данные, а также результаты, полученные при исследовании влияния рчЦфА на гомеостаз иммунной системы

интактного организма, свидетельствуют о большей по сравнению с Т-клетками чувствительности В - лимфоцитов к действию исследуемого белка.

На 7 и 21 день после сублетального облучения в тимусе экспериментальных животных наблюдали два пика снижения абсолютного количества тимоцитов. Под действием рчЦфА к третьей неделе отмечали достоверное увеличение клеточности данного органа ( $p \leq 0,05$  при сравнении с группой облученных животных) и восстановление субпопуляционного состава клеток до уровня необлученного контроля.

Как отмечалось выше, лимфоцитам требуется длительный срок (более трех месяцев) для восстановления функциональной активности после сублетального облучения организма. Наши эксперименты *in vitro* показали, что уровень пролиферации (как фоновой, так и антиген-индуцированной) лимфоцитов облученных животных в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) был достоверно снижен по сравнению с пролиферативной активностью лимфоцитов необлученных мышей на всех сроках исследования (в течение 3 недель после облучения). При этом введение рчЦфА облученным животным способствовало стимуляции аллогенного иммунного ответа лимфоцитов *in vitro* через 2 недели после облучения ( $p \leq 0,05$  при сравнении с контрольной группой облученных животных). Однако, через три недели после облучения у мышей, обработанных рчЦфА, наблюдали подавление гуморального и клеточного иммунного ответа *in vivo* и отсутствие усиленной пролиферативной активности *in vitro* в реакции MLR. Данный эффект, по всей видимости, является следствием системных взаимодействий, которые приводят к супрессорному эффекту, что требует дальнейшего изучения как по параметрам взаимодействующих цитокинов, так и во временной динамике.

**Таким образом, рчЦфА оказывает умеренное воздействие на процессы восстановления гранулоцитопоза и В-лимфопоза в периферических органах сублетально облученных животных. Наиболее выраженные эффекты исследуемого белка отмечаются через 1 неделю после облучения, т.е. непосредственно по окончании введения рчЦфА. Между тем, отсутствие**

субпопуляционных перестроек клеток костного мозга и его опустошения под действием данного белка указывает на возможность проведения нескольких курсов рчЦФА без риска истощения пула ГСК и развития миелодиспластического синдрома или острого миелоидного лейкоза. Повторные курсовые введения рчЦФА могут значительно ускорить регенерацию органов гемопоэза и иммунной системы, а также оказать положительный эффект на функциональную активность клеток иммунной системы после облучения.

#### *4.3. Роль рчЦФА в восстановлении гемопоэтической и иммунной систем организма после воздействия цитостатика*

Исследование процессов восстановления костного мозга, периферической крови, селезенки и тимуса мышей проводили через 24 часа, 3 дня и 7 дней после введения 5-фторурацила (5ФУ) по параметрам абсолютного количества и субпопуляционного состава клеток данных органов.

Введение рчЦФА предотвращало развитие лейкопении в селезенке экспериментальных животных: уже через 24 ч после введения 5ФУ количество клеток в этом органе не отличалось от значений в контрольной группе интактных животных. На этом же сроке наблюдения у мышей, обработанных рчЦФА, отмечали частичное (на ~70% по сравнению с интактным контролем), а к 3 дню полное восстановление абсолютного количества лейкоцитов в периферической крови.

Это сопровождалось активной миграцией клеток из костного мозга под действием рчЦФА, что привело к частичному опустошению (на 50% по сравнению с контрольной группой 5ФУ-плацебо) данного органа на 3 день после введения 5ФУ. Тем не менее, рчЦФА способствовал полному восстановлению клеточности костного мозга к 7 дню, что не наблюдалось без введения исследуемого белка.

Анализ субпопуляций клеток органов показал, что через 7 дней после введения 5ФУ под действием рчЦФА происходит снижение относительного

количества коммитированных предшественников Sca-1+CD31+ в костном мозге и увеличение доли незрелых гранулоцитов в селезенке. Данные процессы свидетельствуют об активных процессах регенерации гранулоцитопоэза на периферии.

Оценка лимфоцитарного звена иммунной системы показала, что введение рчЦфА привело к снижению в костном мозге доли В - клеток через 3 дня и Т - клеток через 7 дней после обработки 5ФУ. Это может быть отражением восстановительных процессов, имеющих место в периферических органах.

Введение рчЦфА не оказало влияния на восстановление клеточности тимуса мышей, обработанных 5ФУ. Тем не менее, исследуемый белок регулировал субпопуляционные перестройки, которые наблюдались в данном органе при регенерации после воздействия химиопрепарата. В тимусе наиболее чувствительными к действию 5ФУ оказались двойные позитивные (DP) клетки, доля которых была значительно снижена (в 2 - 8 раз по сравнению с интактными животными) в течение 3 дней после введения химиопрепарата. Обработка мышей рчЦфА способствовала частичному восстановлению данной субпопуляции тимоцитов (в 1,5 - 2 раза по сравнению с контрольной группой 5ФУ-плацебо). В популяции DN тимоцитов наибольшему воздействию 5ФУ подвергалась субпопуляция DN3 клеток, снижение доли которых наблюдалось в течение 3 дней после введения химиопрепарата (в 3 - 5 раз по сравнению с интактными животными). Введение мышам рчЦфА приводило к частичному восстановлению (в 2,2 - 2,5 раза по сравнению с контрольной группой 5ФУ-плацебо) данной клеточной популяции через 24 часа и 3 дня после обработки 5ФУ. Это происходило за счет сокращения доли DN4 тимоцитов, относительное количество которых под действием рчЦфА было достоверно снижено через 24 часа после введения химиопрепарата ( $p \leq 0,05$  по сравнению с контрольной группой 5ФУ-плацебо).

При оценке функционального состояния иммунной системы мышей, обработанных 5ФУ, было показано, что рчЦфА способствовал восстановлению реакции ГЗТ до уровня интактных животных.

Таким образом, проведенные исследования показали, что рчЦФА принимает активное участие в процессах восстановления гемopoэтической и иммунной систем организма после воздействия цитостатика. Это открывает перспективы для практического использования рчЦФА в качестве поддерживающей терапии при проведении химиотерапевтического лечения онкологических заболеваний. Курсовое введение данного белка на фоне химиотерапии позволит контролировать развитие лейкопении, проводить иммунокоррекцию и, как следствие, снизить риск возникновения инфекционных осложнений. Кроме того, учитывая выявленный аддитивный противоопухолевый эффект рчЦФА и 5ФУ (см. раздел 3.3.4), данный белок потенциально способен усиливать действие классических химиопрепаратов и, таким образом, может быть использован как компонент комплексной терапии опухолей.

#### ***4.4. Влияние рчЦФА на рост перевиваемых опухолевых штаммов *in vivo****

Полученные в данной работе результаты, свидетельствующие об участии рчЦФА в процессах восстановления гомеостаза и функциональной активности кроветворной и иммунной систем организма после облучения и воздействия цитостатика, создают предпосылки для разработки лекарственных средств на основе исследуемого белка, направленных на устранение побочных действий традиционных подходов терапии злокачественных новообразований.

Между тем, ряд исследований указывает на участие ЦФА в развитии онкологических заболеваний и на его потенциальные проонкогенные функции, такие как антиапоптотическое действие [100], стимуляция пролиферации, миграции и метастазирования злокачественных клеток, участие в ангиогенезе солидных опухолей, а также в формировании лекарственной устойчивости (см. раздел 1.3.3.). В связи с этим в нашей работе было крайне важно оценить влияние рчЦФА на рост опухоли *in vivo*.

С этой целью было проведено исследование с использованием перевиваемых опухолевых штаммов различного гистогенеза. В работе применяли

две схемы введения белка: в течение 14 дней (7 дней до и 7 дней после прививки опухоли) или 7 дней после прививки опухоли. Было показано, что рчЦФА обладает противоопухолевым действием в отношении всех используемых опухолевых штаммов, которое проявлялось в высоких показателях торможении роста опухоли (ТРО). Кроме того, в модели меланомы В16 под влиянием рчЦФА наблюдали достоверное увеличение продолжительности жизни животных - опухоленосителей.

Было установлено, что опухоли различного гистогенеза обладают индивидуальной чувствительностью к схемам введения рчЦФА. Так, в модели меланомы В16 при прививке в дозе  $3,0 \times 10^5$  кл/мышь введение исследуемого белка в течение 14 дней (7 дней до и 7 дней после прививки опухоли) приводило к максимальному эффекту ТРО, который составлял 60 - 80% в течение 25 дней после прививки опухоли. При обработке экспериментальных животных только в течение 7 дней после прививки опухоли отмечали более низкие показатели ТРО (55 - 65%), которые сохранялись до 23 дня после трансплантации опухолевых клеток. Однако, при трансплантации мышам стандартной дозы клеток меланомы В16 ( $5,0 \times 10^6$  кл/мышь) противоопухолевое действие рчЦФА не было выявлено, что, вероятно, связано с более агрессивным характером роста опухоли при таком способе прививки.

Подавление роста аденокарциномы Са755 также наблюдалось при обеих схемах введения рчЦФА. Однако показатели ТРО при обработке мышей в течение 7 дней после прививки составили не более 40% на протяжении всего срока наблюдения (23 дня), что оказалось ниже установленного критерия эффективности ( $\geq 50 - 70\%$ ). При 14-дневном курсе введения исследуемого белка отмечалось ТРО на уровне 50 - 60% в течение 19 дней после имплантации клеток Са755.

Высокую чувствительность к действию рчЦФА проявили клетки LLC. Оба режима обработки мышей исследуемым белком приводили к сопоставимым эффектам подавления роста данной опухоли: показатели ТРО составляли 75 - 90%

через 4 - 5 дней после окончания введения рчЦфА и сохранялись на уровне 60 - 70% до 14 дня после прививки опухоли (табл. 18).

В отношении перевиваемого рака шейки матки РШМ-5 рчЦфА также обладал выраженным противоопухолевым действием: уровень ТРО составлял 50 - 75% в течение 26 дней после прививки опухоли. Кроме того, было показано, что исследуемый белок способен подавлять рост уже развившегося опухолевого узла РШМ-5. При этом наблюдали 55 - 68% ТРО до 29 дня после трансплантации клеток опухоли. Стоит особо отметить, что эффект подавления роста как развивающейся, так и развившейся опухоли РШМ-5 под действием рчЦфА был сопоставим с противоопухолевым действием 5ФУ (табл. 22, 25), который используют в терапии различных опухолей, в том числе и рака шейки матки.

На следующем этапе работы было выявлено аддитивное действие рчЦфА и 5ФУ при сочетанной терапии развивающегося опухолевого узла РШМ-5, которое выражалось в более сильном и пролонгированном эффекте подавления роста данной опухоли (50 - 80% ТРО до 36 дня после прививки опухоли) по сравнению с монотерапией рчЦфА или 5ФУ (50 - 70% ТРО до 26 дня после прививки РШМ-5). Однако стоит отметить, что аддитивное действие рчЦфА и 5ФУ не было выявлено при терапии развившего опухолевого узла РШМ-5.

В модели РШМ-5 было подтверждено очень важное протективное действие рчЦфА: введение данного белка предотвращало развитие 5ФУ- индуцированной лейкопении, что открывает перспективы для использования рчЦфА в качестве компонента комбинированной терапии при онкологических заболеваниях.

**Таким образом, в ходе данного исследования в системах *in vivo* впервые показано, что рчЦфА способен значительно подавлять рост опухолей различного гистогенеза. Выявленная противоопухолевая активность рчЦфА, вероятно, опосредована его иммуномодулирующими свойствами, т.к. в экспериментах *in vitro* ранее нами было показано, что рчЦфА не обладает прямой цитотоксической активностью по отношению к злокачественным клеткам. Полученные результаты открывают перспективы в изучении противоопухолевой активности рчЦфА как самостоятельного агента, так и в**

**сочетании с различными химиопрепаратами, а также создают предпосылки для разработки подходов в терапии злокачественных новообразований с использованием исследуемого белка.**

На следующем этапе работы изучено влияние рЧЦФА на процесс метастазирования в модели постоперационного метастазирования LLC. Было показано, что при профилактическом введении (в течение 7 дней до удаления первичного опухолевого узла) рЧЦФА обладает ярко выраженным антиметастатическим эффектом (показатель торможения метастазирования составил 73%). Однако исследуемый белок не способен подавлять развитие уже сформированных метастазов. Стоит отметить, что обработка животных рЧЦФА после удаления LLC не приводила к стимуляции роста метастазов, что особенно важно, принимая во внимание приведенные выше литературные данные о потенциальных проонкогенных функциях данного белка (см. раздел 1.3.3.).

Известно, что метастазирование опухоли - это многостадийный процесс, включающий в себя 1) открепление злокачественных клеток от первичного опухолевого узла и/или внеклеточного матрикса, 2) миграцию через внеклеточный матрикс и инвазию в мезенхиму прилегающего органа, 3) интравазацию, 4) арест в дистальном сайте метастазирования и экстравазацию, 5) формирование микрометастазов и метастатическую колонизацию [127; 128]. Для реализации такого сложного процесса опухолевые клетки приобретают ряд свойств, в частности локомоторный фенотип, устойчивость к апоптозу, способность разрушать внеклеточный матрикс, стимулировать ангиогенез и т.д.

**Наблюдавшийся в нашей модели профилактический антиметастатический эффект рЧЦФА указывает на влияние данного белка на самые ранние этапы метастазирования, предположительно, за счет модуляции опухолевого микроокружения и стимуляции инфильтрации первичной опухоли клетками иммунной системы, поскольку данный белок является хемоаттрактантом для клеток костного мозга различных ростков дифференцировки [37], а также зрелых клеток врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы.**

#### **4.5. Механизмы противоопухолевой активности рЧЦФА**

В качестве возможного молекулярного механизма противоопухолевого действия рЧЦФА мы оценили влияние данного белка на уровень экспрессии генов некоторых матриксных металлопротеиназ (ММП) в модели перевиваемой меланомы В16 *in vivo*. Известно, что ММП играют важную роль в канцерогенезе, участвуя в пролиферации, адгезии и миграции опухолевых клеток, а также в ангиогенезе за счет модуляции микроокружения злокачественных клеток [129; 130].

Результаты экспериментов показали, что введение рЧЦФА мышам-опухоленосителям в течение 7 дней после прививки меланомы В16 приводит к увеличению уровня мРНК ММП8, ММП9 и ММП12 в опухолевой ткани. Наряду с известными проонкогенными функциями данные ММП также могут проявлять протективные свойства на разных стадиях канцерогенеза [131]. При этом стоит отметить, что рЧЦФА не оказал влияния на экспрессию генов ММП с хорошо изученными проонкогенными свойствами (МТ-1-ММП, ММП2, ММП3).

ММП8 секретируется, в основном, нейтрофилами, но может также экспрессироваться фибробластами, эндотелиальными и эпителиальными клетками, кератиноцитами, хондроцитами, макрофагами и плазматическими клетками [132]. На модели нокаутных мышей было показано, что отсутствие ММП8 приводит к развитию хронического воспаления, что создает благоприятные условия для развития опухоли [133]. Данная металлопротеиназа обладает также антиметастатическим действием за счет подавления инвазивности и способности к экстравазации опухолевых клеток [131; 134; 135].

ММП9 секретируют преимущественно тучные клетки, нейтрофилы и макрофаги, которые располагаются в строме опухоли [136]. Гиперэкспрессия ММП9 ассоциирована с благоприятным прогнозом у пациентов с раком молочной железы без метастазов в лимфоузлах и имеет отрицательную корреляцию с количеством метастазов в печени у больных с раком толстой кишки [131]. Было показано, что ММП9 подавляет рост опухоли за счет генерации анти-ангиогенных факторов - эндостатина и тумстатина [131]. Кроме того, ММП9 стимулирует

инфильтрацию опухоли нейтрофилами и активирует M1 опухоль-ассоциированные макрофаги (TAM, от англ. tumor-associated macrophages), что приводит к регрессии опухоли [137]. Обнаруженное в нашем исследовании повышение экспрессии MMP9 в ткани первичной меланомы B16 под действием рчЦФА согласуется с результатами других исследований, продемонстрировавших способность секреторного ЦФА регулировать продукцию данной MMP в злокачественных клетках [98; 138].

Рядом клинических исследований показано, что повышенная экспрессия MMP12, или макрофагальной металлоэластазы, коррелирует с увеличением продолжительности жизни пациентов с раком легкого [139]. При этом предполагается, что благоприятный прогноз наблюдается только в случае продукции MMP12 макрофагами, но не клетками опухоли [140; 141]. В экспериментальных моделях продемонстрирована роль MMP12 в подавлении роста и метастазирования рака легкого [141; 142]. Считается, что противоопухолевое действие MMP12 реализуется за счет продукции ангиостатина - ингибитора ангиогенеза [143]. Кроме того, было показано, что C-терминальный домен MMP12 может индуцировать TRAIL-опосредованный апоптоз опухолевых клеток [144].

Введение рчЦФА животным в течение 7 дней после прививки меланомы B16 приводило к увеличению уровня мРНК тканевого ингибитора металлопротеиназ -1 (TIMP-1) в клетках опухоли. Многочисленные исследования показали, что повышение экспрессии TIMP-1 приводит к снижению инвазивности опухолевых клеток, подавлению роста опухоли и ангиогенеза *in vitro* и *in vivo* [145; 146; 147].

Известно, что секреторный ЦФА способен стимулировать экспрессию своего основного рецептора CD147 [76, 138], который, в свою очередь, играет важную роль в канцерогенезе, участвуя в пролиферации, метастазировании опухолевых клеток и продукции MMP опухолевыми и стромальными клетками (см. раздел 1.3.3.2). В связи с этим было проанализировано влияние рчЦФА на экспрессию гена CD147 в клетках первичной ткани меланомы B16. Мы не

обнаружили изменения уровня мРНК данного рецептора в опухолевой ткани мышей, обработанных рчЦфА, по сравнению с контрольными образцами, полученными у животных - плацебо. Более того, введение мышам рчЦфА не привело к стимуляции экспрессии гена эндогенного ЦфА в клетках меланомы В16. Таким образом, мы предполагаем, что гиперэкспрессия внутриклеточного ЦфА, проонкогенные функции которого описаны выше, является результатом злокачественной трансформации и прогрессии опухоли, но не индуцируется воздействием экзогенного ЦфА.

На следующем этапе работы оценили влияние рчЦфА на ангиогенез меланомы В16 в системе *in vivo*. Был проведен иммуногистохимический анализ срезов опухолевых тканей, обработанных антителами к молекуле CD34, которая является маркером эндотелиальных клеток кровеносных сосудов. Данное исследование показало, что введение рчЦфА мышам - опухоленосителям в течение 7 дней после прививки опухолевых клеток не влияет на степень васкуляризации меланомы В16. Кроме того, в образцах опухолевой ткани меланомы В16 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.

Таким образом, обработка мышей-опухоленосителей рчЦфА не приводит к стимуляции экспрессии гена *VEGF-A* в злокачественных клетках и усилению ангиогенеза опухоли. Секреция ЦфА опухолевыми клетками является следствием их селекции и адаптации к микроокружению в условиях гипоксии, в том числе посредством стимуляции ангиогенеза [100]. Данный факт, с нашей точки зрения, не является препятствием для практического использования рчЦфА в качестве противоопухолевого средства.

Как было сказано ранее, секреторный ЦфА является провоспалительным фактором, участвующим в формировании очага воспаления за счет привлечения разнообразных клеток врожденного иммунитета и активированных лимфоцитов.

Данный белок стимулирует захват и презентацию антигенов незрелыми дендритными клетками, участвуя таким образом в развитии адаптивного иммунного ответа [42]. Исходя из этого, проведено исследование роли рЧЦФА в развитии противоопухолевого иммунного ответа.

Известно, что иммунная система организма находится в динамичных отношениях с опухолью. Антигены опухолевых клеток способны индуцировать врожденный и адаптивный иммунный ответ [148; 149; 150]. В нашем исследовании использовали аллогенную систему, в которой отторжение опухолевых клеток происходит за счет различий в одной молекуле главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса. Было показано, что под действием рЧЦФА у мышей B10D2(R101) происходит ускоренное накопление гранулоцитов разной степени зрелости в месте локализации опухоли и системное накопление эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов, вследствие чего наблюдалась более быстрая (на 30% по сравнению с животными плацебо) элиминация клеток лимфомы EL-4.

Стоит особо отметить, что ранее привлечение гранулоцитов в сайт локализации опухолевых клеток является первой фазой модуляции противоопухолевого ответа под действием рЧЦФА. Известно, что при инфицировании или так называемом стерильном воспалении наблюдается быстрая инфильтрация пораженной ткани нейтрофилами [125]. Эти клетки способны захватывать антиген и мигрировать в дренирующие лимфоузлы и селезенку [151; 152; 153], где они взаимодействуют с антигенпрезентирующими клетками (АПК) и лимфоцитами [126; 154] или сами выступают в роли АПК [155; 156], участвуя, таким образом, в формировании адаптивного иммунного ответа. Ранее в нашей лаборатории было показано, что в иммунных ответах на клетки аллогенных опухолей нейтрофилы обеспечивают костимуляторные сигналы (CD80 и CD86) и цитокиновое окружение (интерлейкин-12), способствующие дифференцировке цитотоксических Т-лимфоцитов [157; 158].

Для подтверждения роли рЧЦФА в развитии противоопухолевого иммунного ответа использовали линию трансгенных мышей 1D1b, которая

характеризуется экспрессией в Т-лимфоцитах  $\beta$ -цепи Т-клеточного рецептора (ТКР) клеток памяти, специфичного к молекуле МНС I класса H-2K<sup>b</sup> [122].

Ранее в нашей лаборатории было показано, что мыши 1D1b погибают в течение 80 дней после введения клеток EL-4, несущих специфический антиген (H-2K<sup>b</sup>), поскольку у них не развивается полноценный иммунный ответ на данную аллогенную опухоль вследствие недостаточной активации Т-клеток, экспрессирующих трансгенную  $\beta$ -цепь ТКР [107; 122]. В этой экспериментальной системе мы обнаружили, что на фоне иммунизации клетками модельной опухоли рчЦфА стимулирует накопление пула специфических цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, несущих трансгенную  $\beta$ -цепь ТКР.

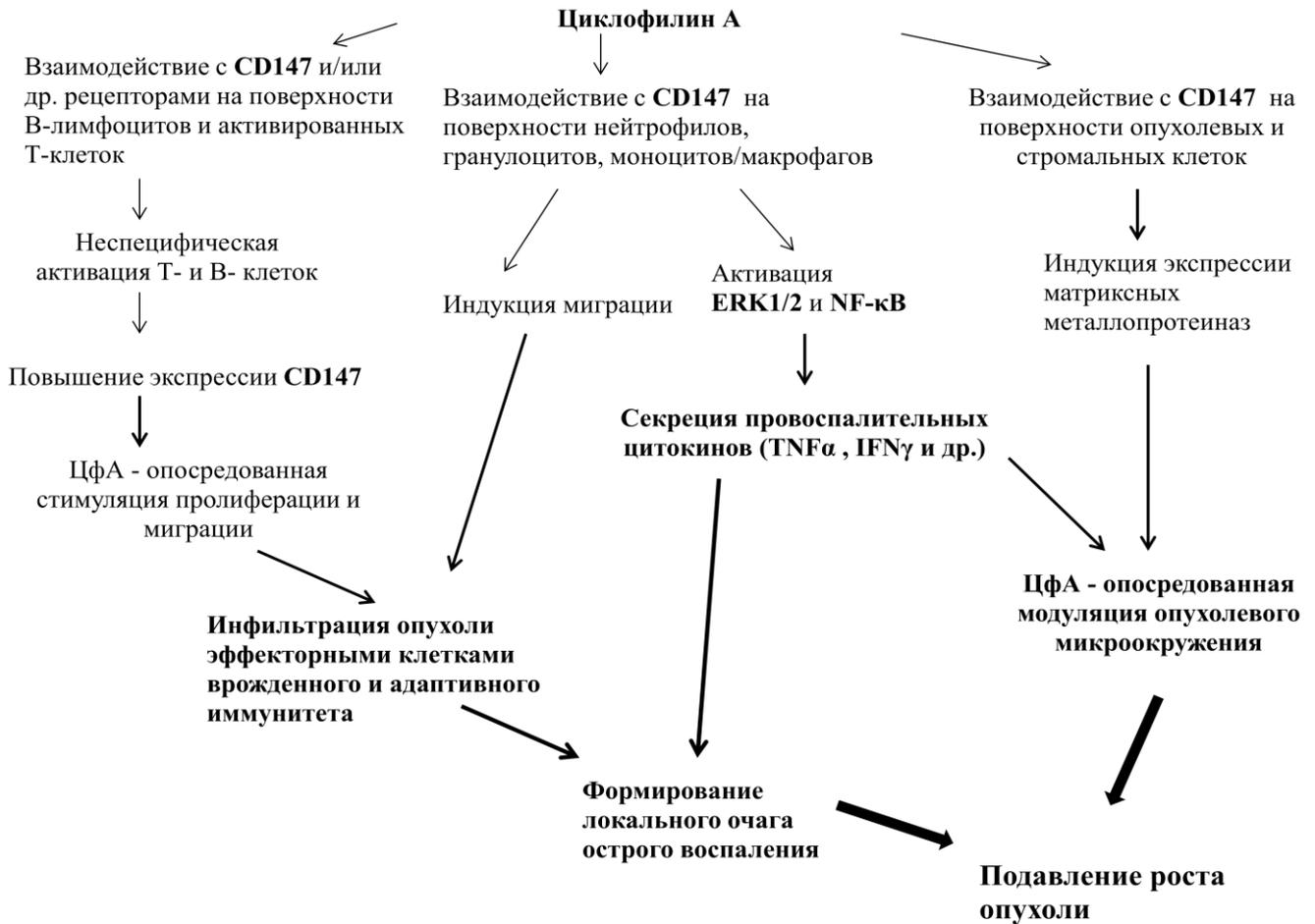
**Таким образом, рчЦфА обладает иммуномодуляторным эффектом, который проявляется в стимуляции врожденного и адаптивного звеньев иммунного ответа путем раннего привлечения гранулоцитов в сайт локализации опухолевых клеток и быстрого накопления эффекторных Т-киллеров на системном уровне, что приводит к ускоренной элиминации клеток модельной опухоли.**

Полученные в рамках диссертационной работы 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. 87). Исследования *ex vivo* и *in vitro* показали, что рчЦфА является неспецифическим активатором В-клеток и ко-стимулятором активированных Т - клеток (см. раздел 4.1.). Активация лимфоцитов, в свою очередь, сопровождается усилением экспрессии молекулы CD147 на их поверхности [62; 74], что повышает чувствительность данных клеток к митогенному и хемоаттрактивному действию рчЦфА. Данные, полученные ранее в нашей лаборатории [37] и в рамках настоящей диссертации (см. раздел 3.4.3.1.), а также многочисленные исследования других авторов продемонстрировали, что ЦфА индуцирует миграцию гранулоцитов, моноцитов/макрофагов и нейтрофилов [39; 40] посредством взаимодействия с CD147 [40; 77; 78]. Таким образом, рчЦфА

способен индуцировать инфильтрацию опухоли, как очага воспаления, эффекторными клетками врожденного и адаптивного иммунитета.

С другой стороны, ЦФА является фактором, оказывающим влияние на секрецию и функции других провоспалительных цитокинов [41]: связывание секреторного ЦФА с CD147 на поверхности макрофагов [40] и активированных Т-клеток [42] приводит к активации сигнального пути ERK1/2 и транскрипционного фактора NF-κB, что, в свою очередь, индуцирует экспрессию таких цитокинов, как TNFα, IFNγ этими клетками. Аналогичным образом, ЦФА может регулировать продукцию MMP через взаимодействие с молекулой CD147 на поверхности стромальных и опухолевых клеток, которая является внеклеточным индуктором матриксных металлопротеиназ (EMMPRIN) [104; 105]. Все вышесказанное позволяет предположить, что рЦФА может изменять микроокружение опухоли за счет сдвига баланса цитокинов в сторону преобладания цитокинов Т-хелперов 1 типа (TNFα, IFNγ и т.п.) и модуляции профиля экспрессии MMP.

Таким образом, выявленные противоопухолевые свойства рЦФА опосредованы его иммуномодулирующим действием, направленным на создание локального очага острого воспаления и изменение опухолевого микроокружения, вызывающих подавление роста опухоли (рис. 87). Молекулярные механизмы и сигнальные пути, вовлеченные в реализацию данных процессов, требуют дальнейшего детального исследования.



**Рисунок 87** - Возможные механизмы реализации противоопухолевой активности рчЦфА

#### ***4.6. Разработка трансгенной модели для изучения роли ЦфА как фактора микроокружения ГСК***

В ходе данной работы впервые показано, что рчЦфА усиливает миграцию стволовых клеток и ранних предшественников различных ростков дифференцировки, а также участвует в восстановлении кроветворной и иммунной систем организма после воздействия цитостатика и облучения. Ранее было показано, что эндотелиальные и миелоидные клетки костного мозга активно секретируют ЦфА [138]. Кроме того, рецептор CD147 экспрессируется на 84% клеток костного мозга [74]. Исходя из этого и полученных нами результатов, мы предположили, что исследуемый белок может являться одним из факторов

микроокружения для гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Эта потенциальная функция ЦфА ранее не была изучена и представляет большой фундаментальный и практический интерес. Поэтому мы разработали модель трансгенных мышей с гиперэкспрессией ЦфА в костном мозге.

Известно, что судьба ГСК в значительной степени определяется уникальным микроокружением или нишей. Условно в костном мозге можно выделить две наиболее важные ниши: первая сформирована, главным образом, остеобластами [159; 160], вторая - синусоидальными и эндотелиальными клетками [161]. В эндостальной нише располагаются долгоживущие самообновляющиеся ГСК, находящиеся в прямом контакте с остеобластами [159], который обеспечивается посредством рецептора N-кадгерина, экспрессирующегося на обоих типах этих клеток [162]. Кроме того, остеобласты продуцируют ангиопоэтин-1, который активирует рецептор Tie2 на поверхности ГСК, что, в свою очередь, также обеспечивает прочную адгезию ГСК с клетками своей ниши [163]. Секретируемый остеобластами тромбопоэтин, который взаимодействует со своим рецептором MPL (CD110) на поверхности ГСК, также способствует поддержанию пула покоящихся ГСК в костном мозге [164]. Помимо межклеточных контактов остеобласты обеспечивают ГСК необходимыми ростовыми факторами и цитокинами, такими как ГКСФ [163; 165], макрофагальный колониестимулирующий фактор (МКСФ) [166, 167], ГМКСФ [165; 166; 167], интерлейкин-1 [168], интерлейкин-6 [168; 169; 170], лейкемия - ингибирующий фактор (LIF) [171; 172; 173], TNF $\alpha$  [174] и VEGF [175].

Очевидно, что остеобласты крайне важны для нормального гемопоэза, поэтому мы решили использовать данные клетки в качестве продуцентов ЦфА. Генетическая конструкция для трансгенеза была создана на основе экспрессионного вектора pUC18, который содержит первый интрон и фрагмент промотора крысиного коллагена I типа  $\alpha$  (2,3kb Colla1), обеспечивающий специфичную экспрессию трансгена в остеобластах [176].

В ходе трансгенеза было установлено, что экспрессионная конструкция pUC18-мЦфА обладает эмбриотоксическим действием, приводящим к гибели

80% микроинъекцированных зигот до имплантации и 66% трансгенных эмбрионов после имплантации. Исследования показали, что наблюдавшийся эффект был обусловлен конститутивной гиперэкспрессией мЦфА.

Для преодоления эмбриотоксичности на следующем этапе работы применили технологию двухстадийной геномной инженерии, включающую в себя трансгенез и loxP-Cre рекомбинацию. В созданной трансгенной линии мышей *Сур-STOP* экспрессия гена мЦфА под контролем промотора 2,3kb *Colla1* предотвращалась Cre-регулируемой СТОП-кассетой. 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* [108]. Гиперэкспрессия гена мЦфА в остеобластах индуцировалась только у мышей с генотипом *Сур+Cre+* в отсутствие тетрациклина.

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. Созданных трансгенных животных можно потенциально использовать в исследованиях влияния ЦфА на развитие онкологических, аутоиммунных и др. заболеваний, а также для поиска новых методов их лечения. Эта модель также открывает новые возможности для изучения роли ЦфА в эмбриогенезе и выявления механизмов эмбриотоксичности при индукции экспрессии данного белка в раннем антенатальном периоде.

Стоит также отметить одно из наиболее важных преимуществ разработанной модели: созданные трансгенные животные представляют собой "чистую" систему, которая позволит проводить оценку функциональной активности нативного ЦфА, исключив возможное влияние биологически активных примесей, что неизбежно при использовании рекомбинантных белков.

#### 4.7. Эмбриотоксическое действие рчЦфА

При изучении эмбриотоксических свойств высоких доз рчЦфА было показано, что данный белок обладает тератогенным действием при введении беременным самкам в период формирования внутренних органов плода. Высокие дозы рчЦфА вызывали нарушение формирования костей черепа и (реже) конечностей, что, в свою очередь, приводило к развитию морфологических аномалий, но, тем не менее, не влияло на жизнеспособность дефектных плодов.

Известно, что нарушение баланса цитокинов Т - хелперов 1 и 2 типа во время беременности может привести к различным осложнениям, в том числе к спонтанным абортam, преждевременным родам, преэклампсии и торможению внутриутробного развития [177]. Первый триместр беременности характеризуется преобладанием провоспалительных факторов, поскольку имплантация и формирование плаценты сопровождаются интенсивными воспалительными процессами. Во втором триместре, когда происходит рост и развитие плода, наблюдается усиление продукции цитокинов Т-хелперов 2 типа в организме женщины [178; 179; 180]. Перед родами также происходит формирование провоспалительного микроокружения, которое обеспечивает развитие схваток, стимулирует роды и отделение плаценты [181; 182]. Введение высоких доз рчЦфА - провоспалительного фактора - во втором триместре беременности могло сместить баланс в сторону цитокинов Т-хелперов 1 типа, что стало причиной дефектного развития эмбрионов.

Тератогенное действие рчЦфА, выявленное в нашей экспериментальной системе, проявлялось в нарушении процессов оссификации скелета плода. Исследования нокаутных по гену ЦфА мышей (*Ppia*<sup>-/-</sup>) также продемонстрировали участие данного белка в нормальном развитии скелета. Было показано, что у таких животных происходит неполная эндохондральная оссификация [183], наблюдается низкая минеральная плотность костной ткани, сниженное количество остеобластов и повышенное количество остеокластов в костях [184].

Наши результаты, наряду с уже имеющимися данными, подтверждают важную роль ЦФА в развитии плода на различных этапах беременности. Как высокие, так и низкие концентрации данного белка вызывают тяжелые патологии, которые могут приводить к прерыванию беременности, гибели эмбрионов или развитию аномалий плода.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования, проведенные в рамках настоящей работы с использованием рчЦфА [38], подтвердили и углубили знания о выявленной ранее функциональной активности нативного белка [37]. Обнаружены и изучены новые функции рчЦфА, которые расширяют фундаментальные представления о биологической активности данного белка и могут иметь практическое применение.

Было установлено, что рчЦфА играет важную роль в восстановлении гемопоэза в первые, наиболее критические дни после облучения и способствует устранению лейкопении, вызванной введением 5ФУ. Данный эффект реализуется посредством индукции миграции ГСК из костного мозга, а также стимуляции регенерации гранулоцитопоэза в периферических кроветворных органах. Более того, рчЦфА способствует восстановлению лимфопоэза после облучения и воздействия высоких доз цитостатика, при этом В - клетки обладают большей чувствительностью к действию данного белка по сравнению с Т-лимфоцитами.

В ходе исследований выявлена роль рчЦфА в восстановлении тимуса животных после облучения и воздействия цитостатика. Представленные результаты, а также данные других авторов, свидетельствующие о высоком уровне экспрессии основного рецептора ЦфА (CD147) на тимоцитах [185], указывают на потенциальные, ранее не изученные функции ЦфА в формировании тимуса и развитии Т-лимфоцитов.

Регенерация периферических органов гемопоэтической и иммунной систем организма под влиянием рчЦфА не сопровождалась длительным опустошением и значительными перестройками субпопуляционного состава клеток костного мозга. Это свидетельствует о более мягком действии данного белка при восстановлении кроветворения в отличие от традиционных гемопоэтических ростовых факторов (ГКСФ, ГМКСФ), использование которых может приводить к снижению пула ГСК [186], истощению их потенциала к самообновлению [10; 23] и нарушению развития отдельных ростков гемопоэза, например В-лимфопоэза [187]. Полученные результаты дают основание предполагать, что рчЦфА

способен предотвращать хроническое повреждение костного мозга, которое ассоциировано с преждевременным старением ГСК [17; 18]. Однако, функции рчЦфА как фактора гемопоэза требуют дальнейшего детального изучения.

Для этого в рамках настоящей работы создана уникальная модель трансгенных мышей с индуцируемой гиперэкспрессией ЦфА в остеобластах. Данная модель позволит изучать в системе *in vivo* роль данного белка как фактора микроокружения ГСК и его участие в функционировании гемопоэтической системы организма в различные периоды онтогенеза.

В клинической практике ЦфА рассматривается как фактор патогенеза онкологических заболеваний. С другой стороны, ЦфА как провоспалительный фактор и хемоаттрактант активированных лимфоцитов [37; 39] может являться компонентом противоопухолевого иммунитета и способствовать элиминации опухоли посредством инфильтрации активированными клетками иммунной системы и взаимодействия с цитокинами Т-хелперов 1 типа (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ). В наших исследованиях была выявлена противоопухолевая активность рчЦфА *in vivo* в отношении лимфомы EL-4 и солидных штаммов перевиваемых опухолей различного гистогенеза.

На модели перевиваемого рака шейки матки показатели торможения роста опухоли под действием исследуемого белка были сопоставимы с эффектами 5ФУ. Была также выявлена способность рчЦфА усиливать и продлевать противоопухолевое действие данного химиопрепарата. На модели рака легкого LLC показано профилактическое антиметастатическое действие рчЦфА. На модели лимфомы EL-4 показано участие рчЦфА в развитии противоопухолевого иммунного ответа за счет стимуляции врожденного и адаптивного звеньев иммунитета. Противоопухолевая активность данного белка может быть также опосредована модуляцией микроокружения злокачественного новообразования за счет изменения профиля экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММР).

Проведенные исследования показали, что рчЦфА не индуцирует экспрессию генов нативного ЦфА и CD147 в тканях первичной опухоли, не влияет на рост сформированных метастазов и не стимулирует ангиогенез

развивающейся опухоли. Следовательно, в используемых моделях по исследуемым параметрам данный белок не выступает в качестве фактора опухолевой прогрессии.

Было показано, что рчЦфА является индуктором активации и пролиферации В - клеток и стимулирует развитие гуморального иммунного ответа. Кроме того, данный белок регулирует пролиферацию активированных Т - лимфоцитов. Таким образом, впервые выявлены иммуномодулирующие свойства ЦфА и изучена его роль в формировании клеточного, гуморального и противоопухолевого иммунного ответа, что имеет важное фундаментальное значение и может быть использовано в клинической практике при терапии онкологических и других заболеваний.

Изучение безопасных доз и отсутствие нежелательных побочных воздействий рчЦфА на органы кроветворения и иммунную систему здорового организма являются важным аспектом разработки лекарственных средств на его основе. В связи с этим были проведены исследования на интактных животных, которые показали, что курсовое введение рчЦфА в дозе 100,0 мкг/мышь (1 ТД) не влияет на гемопоэтическую и иммунную системы организма. Введение очень высоких доз данного белка (10 - 30 ТД) приводит к сенсibilизации организма, но не сопровождается изменением аллергостатуса.

В ходе работы по созданию трансгенных мышей с гиперэкспрессией ЦфА в остеобластах обнаружено эмбриотоксическое действие конститутивной повышенной экспрессии данного белка. Кроме того, показан тератогенный эффект высокой дозы (20 ТД) рчЦфА при его системном воздействии на организм беременных самок в период органогенеза, который проявлялся в виде различных дефектов формирования скелета плода. Выявленные эмбриотоксические свойства ЦфА необходимо учитывать при разработке возможных стратегий лечения с использованием лекарственных средств на его основе.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты расширяют представление о функциональной активности ЦфА и открывают перспективы для его практического применения. Проведенные исследования показали, что рчЦфА

потенциально можно использовать в клинической практике: 1) в качестве средства для смягчения побочных эффектов традиционных методов терапии онкологических заболеваний; 2) для коррекции иммунодефицитных состояний и в иммунотерапии опухолей; 3) в качестве самостоятельного противоопухолевого средства; 4) в качестве компонента комбинированной противоопухолевой терапии для усиления действия химиопрепаратов.

## 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.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- 5ФУ - 5-фторурацил
- АОК - антителообразующие клетки
- АПК - антигенпрезентирующие клетки
- ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа
- ГКСФ - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- ГМКСФ - гранулоцитарно - макрофагальный колониестимулирующий фактор
- ГСК - гемопоэтические стволовые клетки
- кДНК - комплементарная ДНК
- Кон А - конканавалин А
- ЛД - летальная доза
- ЛПС - липополисахарид
- МКСФ - макрофагальный колониестимулирующий фактор
- мРНК - матричная РНК
- мЦфА - циклофилин А мыши
- ПС - полная среда
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- РБТ- реакция бласт-трансформации
- рчЦфА - рекомбинантный циклофилин А человека
- РШМ-5 - рак шейки матки штамм 5
- т.п.н. - тысяч пар нуклеотидов
- ТД - терапевтическая доза
- ТКР - Т-клеточный рецептор
- ТМ - торможение метастазирования
- ТНБС - тринитробензосульфоновая кислота

- ТРО - торможение роста опухоли
- УПЖ - увеличение продолжительности жизни
- ЦсА - циклоспорин А
- ЦфА - циклофилин А
- ЭБ - эритроциты барана
- АСТ - адоптивная клеточная терапия (от англ. adoptive cell therapy)
- CAR - химерный антигенный рецептор (от англ. chimeric antigen receptor)
- CD - кластер дифференцировки (от англ. cluster of differentiation)
- срм- количество распадов в минуту (от англ. counts per minute)
- DEAE - диэтилэтанолламин
- DN - двойные негативные тимоциты (от англ. double negative)
- DP - двойные позитивные тимоциты (от англ. double positive)
- LIF - лейкемия - ингибирующий фактор (от англ. leukemia inhibitory factor)
- LLC - карцинома легкого Льюис (от англ. Lewis lung carcinoma)
- mAbs - моноклональные антитела (от англ. monoclonal antibodies)
- МНС - главный комплекс гистосовместимости (от англ. major histocompatibility complex)
- MLR - смешанная культура лимфоцитов (от англ. mixed lymphocyte reaction)
- MMP - матриксная мателлопротеиназа (от англ. matrix metalloproteinase)
- PBS - фосфатно-солевой буфер (от англ. phosphate buffered saline)
- ROS - активные формы кислорода (от англ. reactive oxygen species)
- SCID - тяжелый комбинированный иммунодефицит (от англ. severe combined immunodeficiency)
- SEM - стандартная ошибка среднего (от англ. standard error of mean)
- siRNA - короткие интерферирующие РНК (от англ. short interfering RNA)

TGF - трансформирующий ростовой фактор (от англ. transforming growth factor)

TIL - опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (от англ. tumor-infiltrating lymphocytes)

TIMP - тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ (от англ. tissue inhibitors of matrix metalloproteinases)

TNF - фактор некроза опухоли (от англ. tumor necrosis factor)

VEGF - фактора роста эндотелия сосудов (от англ. vascular endothelial growth factor)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Wang, Y. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury- Mechanisms of induction and implication for therapy / Y. Wang, V. Probin, D. Zhou // *Curr Cancer Ther Rev.* - 2006. - V. 2(3). - P. 271-279.
2. Shao, L. Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy induced long-term bone marrow injury / L. Shao, Y. Wang, J. Chang, Y. Luo, A. Meng, D. Zhou // *Transl Cancer Res.* - 2013. - V. 2(5). - P. 397-411.
3. Nakamura, N. Radiosensitivity of CD4 or CD8 positive human T-lymphocytes by an in vitro colony formation assay / N. Nakamura, Y. Kusunoki, M. Akiyama // *Radiat. Res.* - 1990. - V. 123(2). - P. 224–227.
4. Chen, Y. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is correlated with response to neoadjuvant chemotherapy as an independent prognostic indicator in breast cancer patients: a retrospective study / Y. Chen, K. Chen, X. Xiao, Y. Nie, S. Qu, C. Gong, F. Su, E. Song // *BMC Cancer.* - 2016. - V. 19(6) - P. 320.
5. Kitayama, J. Circulating lymphocyte is an important determinant of the effectiveness of preoperative radiotherapy in advanced rectal cancer / J. Kitayama, K. Yasuda, K. Kawai, E. Sunami, H. Nagawa // *BMC Cancer.* - 2011. - V. 10(11). - P. 64.
6. Lohr, J. Effector T cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived TGF- $\beta$  / J. Lohr, T. Ratliff, A. Huppertz, Y. Ge, C. Dictus, R. Ahmadi, S. Grau, N. Hiraoka, V. Eckstein, R.C. Ecker, T. Korff, A. von Deimling, A. Unterberg, P. Beckhove, C. Herold-Mende // *Clin. Cancer Res.* - 2011. - V. 17(13). - P. 4296–4308.
7. Hiraoka, K. Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma / K. Hiraoka, M. Miyamoto, Y. Cho, M. Suzuoki, T. Oshikiri, Y. Nakakubo, T. Itoh, T. Ohbuchi, S. Kondo, H. Katoh // *Br. J. Cancer.* - 2006. - V. 94(2). - P. 275–280.

8. Dempke, W. Human hematopoietic growth factors: old lessons and new perspectives / W. Dempke, A. von Poblozki, A. Grothey, H.J. Schmoll // *Anticancer Res.* - 2000. - V. 20. - P. 5155–5164.
9. Gardner, R.V. The effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on primitive hematopoietic stem cell (PHSC) function and numbers, after chemotherapy / R.V. Gardner, R. Begue, E. Mckinnon // *Exp Hematol.* - 2001. - V. 29. - P. 1053–9.
10. van Os, R. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Enhances Bone Marrow Stem Cell Damage Caused by Repeated Administration of Cytotoxic Agents / R. van Os, S. Robinson, T. Sheridan, J.M. Mislow, D. Dawes, P.M. Mauch // *Blood.* - 1998. - V. 92. - P. 1950–6.
11. Gale, R.P. Antineoplastic chemotherapy myelosuppression: mechanisms and new approaches / R.P. Gale // *Exp Hematol.* - 1985. - V. 13. - P. 3-7.
12. Gardner, R.V. Assessing permanent damage to primitive hematopoietic stem cells after chemotherapy using the competitive repopulation assay / R.V. Gardner, C. Lerner, C.M. Astle, D.E. Harrison // *Cancer Chemother Pharmacol.* - 1993. - V. 32. - P. 450–454.
13. Neben, S. Hematopoietic stem cell deficit of transplanted bone marrow previously exposed to cytotoxic agents / S. Neben, S. Hellman, M. Montgomery, J. Ferrara, P. Mauch // *Exp Hematol.* - 1993. - V. 21. - P. 156–162.
14. Santos, G.W. Preparative regimens: chemotherapy versus chemoradiotherapy. A historical perspective / G.W. Santos // *Ann N Y Acad Sci.* - 1995. - V. 770. - P. 1–7.
15. Meng, A. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells / A. Meng, Y. Wang, G. Van Zant, D. Zhou // *Cancer Res.* - 2003. - V. 63. - P. 5414–9.
16. Wang, Y. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence / Y. Wang, B.A. Schulte, A.C. Larue, M. Ogawa, D. Zhou // *Blood.* - 2006. - V. 107. - P. 358–66.

17. Wang, Y. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells / Y. Wang, L. Liu, S.K. Pazhanisamy, H. Li, A. Meng, D. Zhou // *Free Radic Biol Med.* - 2010. - V. 48. - P. 348–56.
18. Ito, K. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells / K. Ito, A. Hirao, F. Arai, S. Matsuoka, K. Takubo, I. Hamaguchi, K. Nomiyama, K. Hosokawa, K. Sakurada, N. Nakagata, Y. Ikeda, T.W. Mak, T. Suda // *Nature.* - 2004. - V. 431. - P. 997–1002.
19. Mauch, P. Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy / P. Mauch, L. Constine, J. Greenberger, W. Knospe, J. Sullivan, J.L. Liesveld, H.J. Deeg // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* - 1995. - V. 31. - P. 1319–39.
20. von Wangenheim, K.H. Residual radiation effect in the murine hematopoietic stem cell compartment / K.H. von Wangenheim, H.P. Peterson, L.E. Feinendegen // *Radiat Environ Biophys.* - 1986 - V. 25. - P. 93–106.
21. Spangrude, G.J. Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: in vivo expansion of stem cell phenotype but not function / G.J. Spangrude, D.M. Brooks, D.B. Tumas // *Blood.* - 1995. - V. 85. - P. 1006–16.
22. Mauch, P. Permanent loss in stem cell self renewal capacity following stress to the marrow / P. Mauch, M. Rosenblatt, S. Hellman // *Blood.* - 1988. - V. 72. - P. 1193–6.
23. van Os, R. Robinson S, Sheridan T, et al. Granulocyte-colony stimulating factor impedes recovery from damage caused by cytotoxic agents through increased differentiation at the expense of selfrenewal / R. van Os, S. Robinson, T. Sheridan, P.M.Mauch // *Stem Cells.* - 2000. - V. 18. - P. 120–7.
24. Zhang, H. Current status and future directions of cancer immunotherapy / H. Zhang, J. Chen // *J Cancer.* - 2018. - V. 9(10). - P.1773-1781.

25. Li, Z. Recent updates in cancer immunotherapy: a comprehensive review and perspective of the 2018 China Cancer Immunotherapy Workshop in Beijing / Z. Li, W. Song, M. Rubinstein, D. Liu // *J Hematol Oncol.* - 2018. - V. 11(1). - P.14.
26. Shevchenko, I. Metabolic Checkpoints: Novel Avenues for Immunotherapy of Cancer / I. Shevchenko, A.V. Bazhin // *Front Immunol.* - 2018. - V. 9. - P. 1816.
27. Kimiz-Gebologlu, I. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy / I. Kimiz-Gebologlu, S. Gulce-Iz, C. Biray-Avci // *Mol Biol Rep.* - 2018. - V. 45(6). - P. 2935-2940.
28. Darvin, P. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers / P. Darvin, S.M. Toor, V. Sasidharan Nair, E. Elkord // *Exp Mol Med.* - 2018. - V. 50(12). - P. 165.
29. Teillaud, J.L. From whole monoclonal antibodies to single domain antibodies: think small / J.L. Teillaud // *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* - 2012. - V. 911. - P. 3-13.
30. Sathyanarayanan, V. Cancer immunotherapy: strategies for personalization and combinatorial approaches / V. Sathyanarayanan, S.S. Neelapu // *Mol Oncol.* - 2015. - V. 9. - P. 2043–2053.
31. Thill, M. New frontiers in oncology: biosimilar monoclonal antibodies for the treatment of breast cancer / M. Thill // *Expert review of anticancer therapy.* - 2015. - V. 15. - P. 331-8.
32. Met, Ö. Principles of adoptive T cell therapy in cancer / Ö. Met, K.M. Jensen, C.A. Chamberlain, M. Donia, I.M. Svane // *Semin Immunopathol.* - 2019. - V. 41(1). - P. 49-58.
33. Mescher, M.F. Activation-induced non-responsiveness (anergy) limits CD8 T cell responses to tumors / M.F. Mescher, F.E. Popescu, M. Gerner, C.D. Hammerbeck, J.M. Curtsinger // *Semin Cancer Biol.* - 2007. - V. 17. - P. 299–308.

34. William, Y. Adoptive therapy with CD8+ T cells: it may get by with a little help from its friends / Y. William, C.Y. Ho, P.D. Greenberg // *J Clin Invest.* - 2002. - V. 110. - P. 1415–7.
35. Srivastava, S. Chimeric antigen receptor T cell therapy: challenges to bench-to-bedside efficacy / S. Srivastava, S.R. Riddell // *J Immunol.* - 2018. - V. 200. - P. 459–468.
36. Casucci, M. Overcoming the toxicity hurdles of genetically targeted T cells / M. Casucci, R.E. Hawkins, G. Dotti, A. Bondanza // *Cancer Immunol Immunother.* - 2015. - V. 64. - P. 123–130.
37. Khromykh, L.M. Cyclophilin A produced by thymocytes regulates the migration of murine bone marrow cells / L.M. Khromykh, N.L. Kulikova, T.V. Anfalova, T.A. Muranova, V.M. Abramov, A.M. Vasiliev, V.S. Khlebnikov, D.D. Kazansky // *Cell Immunol.* - 2007. - V. 249. - P. 46–53.
38. Патент РФ RU 2603283 C1, 2015, ШТАММ *Escherichia coli* BL21(DE3)Gold/pETCYPopti - ПРОДУЦЕНТ РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИКЛОФИЛИНА А ЧЕЛОВЕКА. Хромых Л.М., Калинина А.А., Козырь А.В., Колесников А.В., Силаева Ю.Ю., Казанский Д.Б.
39. Xu, Q. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin / Q. Xu, M.C. Leiva, S.A. Fischkoff, R.E. Handschumacher, C.R. Lyttle // *J Biol Chem.* - 1992. - V. 267(17). - P. 11968–11971
40. Nigro, P. Cyclophilin A: a key player for human disease / P. Nigro, G. Pompilio, M.C. Capogrossi // *Cell Death Dis.* - 2013. - V. 4. - e888. doi: 10.1038/cddis.2013.410.
41. Dawar, F.U. Potential role of cyclophilin A in regulating cytokine secretion / F.U. Dawar, Y. Xiong, M.N.K. Khattak, J. Li, L. Lin, J. Mei // *J Leukoc Biol.* - 2017. - V. 102(4). - P. 989-992.
42. Bharadwaj, U. Effects of cyclophilin A on myeloblastic cell line KG-1 derived dendritic like cells (DLC) through p38 MAP kinase activation / U.

Bharadwaj, R. Zhang, H. Yang, M. Li, L.X. Doan, C. Chen, Q. Yao // J Surg Res. - 2005. - V. 127. - P. 29-38.

43. Korniluk, A. From inflammation to cancer / A. Korniluk, O. Koper, H. Kemon, V. Dymicka-Piekarska // Ir J Med Sci. - 2017. - V. 186. - P. 57–62.

44. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н., Бунатян А.Н. и др. –М.: ЗАО «Гриф», 2012.

45. Wang, P. Cyclophilins / P. Wang, J. Heitman // Genome Biol. - 2005. - V. 6(7). - P. 226.

46. Colgan, J. Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk / J. Colgan, M. Asmal, M. Neagu, B. Yu, J. Schneidkraut, Y. Lee, E. Sokolskaja, A. Andreotti, J. Luban // Immunity. - 2004. - V. 21(2). - P. 189-201.

47. Honga, F. Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase activity / F. Honga, J. Leeb, Y.J. Piao, Y.K. Jae, Y.J. Kim, C. Oh, J.S. Seo, Y.S. Yun, C.W. Yang, J. Ha, S.S. Kim // Biochemical and Biophysical Research Communications. - 2004. - V. 316. - P. 1073–1080.

48. Takahashi, N Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin / N. Takahashi, T. Hayano, M. Suzuki // Nature. - 1989. - V. 337(6206). - P. 473-475.

49. Song, F. Cyclophilin A (CyPA) induces chemotaxis independent of its peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity: Direct binding between CyPA and the ectodomain of CD147 / F. Song, X. Zhang, X.B. Ren, P. Zhu, J. Xu, L. Wang, Y.F. Li, N. Zhong, Q. Ru, D.W. Zhang, J.L. Jiang, B. Xia, Z.N. Chen ZN // J. Biol. Chem. - 2011. - V. 286. - P. 8197–8203.

50. Bahmed, K. Extracellular cyclophilin-A stimulates ERK1/2 phosphorylation in a cell-dependent manner but broadly stimulates nuclear factor kappa B / K. Bahmed, C. Henry, M. Holliday, J. Redzic, M. Ciobanu, F. Zhang, C.

Weekes, R. Sclafani, J. Degregori, E. Eisenmesser // *Cancer Cell Int.* - 2012. - V. 12. - P. 19.

51. Vajdos, F.F. Crystal structure of cyclophilin A complexed with a binding site peptide from the HIV-1 capsid protein / F.F. Vajdos, S. Yoo, M. Houseweart, W.I. Sundquist, C.P. Hill // *Protein Sci.* - 1997. - V. 6(11). - P. 2297-307.

52. Ryffel, B. Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues / B. Ryffel, G. Woerly, B. Greiner, B. Haendler, M.J. Mihatsch, B.M. Foxwell // *Immunology.* - 1991. - V. 72(3). - P. 399–404.

53. Galat, A. Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins / A. Galat // *Eur J Biochem.* - 1993. - V. 216(3). - P. 689-707.

54. Doyle, V. Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress / V. Doyle, S. Virji, M. Crompton // *Biochem J.* - 1999. - V. 341. - P. 127-32.

55. Seko, Y. Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes / Y. Seko, T. Fujimura, H. Taka, R. Mineki, K. Murayama, R. Nagai // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2004. - V. 317. - P. 162–168.

56. Jäschke, A. Human T cell cyclophilin18 binds to thiol-specific antioxidant protein Aop1 and stimulates its activity / A. Jäschke, H. Mi, M. Tropschug // *J Mol Biol.* - 1998. - V. 277(4). - P. 763–769.

57. Hu, B.R. Protein aggregation after transient cerebral ischemia / B.R. Hu, M.E. Martone, Y.Z. Jones, C.L. Liu // *J Neurosci.* - 2000. - V. 20. - P. 3191–3199.

58. Sherry, B. Identification of Cyclophilin as a Proinflammatory Secretory Product of Lipopolysaccharide-Activated Macrophages / B. Sherry, N. Yarlett, A. Strupp, A. Cerami // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 1992. - V. 89(8). - P. 3511–3515.

59. Obchoei, S. Cyclophilin A. Potential functions and therapeutic target for human cancer / S. Obchoei, S. Wongkhan, Ch. Wongkham, M. Li, Q. Yao, C. Chen // *Med Sci Monit.* - 2009. - V. 15(11). - P. 221–32.
60. Suzuki, J. Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells / J. Suzuki, Z.-G. Jin, D.F. Meoli, T. Matoba, B.C. Berk // *Circ. Res.* - 2006. - V. 98(6). - P. 811-817.
61. Damsker, J.M. Preferential chemotaxis of activated human CD4<sup>+</sup> T cells by extracellular cyclophilin A / J.M. Damsker, M.I. Bukrinsky, S.L. Constant // *J Leukoc Biol.* - 2007. - V. 82. - P. 613–8.
62. Gwinn, W.M. Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention / W.M. Gwinn, J.M. Damsker, R. Falahati, I. Okwumabua, A. Kelly-Welch, A.D. Keegan, C. Vanpouille, J.J. Lee, L.A. Dent, D. Leitenberg, M.I. Bukrinsky, S.L. Constant // *J Immunol.* - 2006. - V. 177. - P. 4870–4879.
63. Billich, A. Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis / A. Billich, G. Winkler, H. Aschauer, A. Rot, P. Peichl // *J Exp Med.* - 1997. - V. 185(5). - P. 975-80.
64. Tegeder, I. Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis / I. Tegeder, A. Schumacher, S. John, H. Geiger, G. Geisslinger, H. Bang, K. Brune // *J Clin Immunol.* - 1997. - V. 17. - P. 380–386.
65. Yurchenko, V. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins / V. Yurchenko, S. Constant, M. Bukrinsky // *Immunology.* - 2006. - V. 117(3). - P. 301-9.
66. Nabeshima, K. Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression / K. Nabeshima, H. Iwasaki, K. Koga, H. Hojo, J. Suzumiya, M. Kikuchi // *Pathol Int.* - 2006. - V. 56(7). - P. 359-67.
67. Pushkarsky, T. Cell Surface Expression of CD147/EMMPRIN Is Regulated by Cyclophilin 60 / T. Pushkarsky, V. Yurchenko, C. Vanpouille, B.

Brichacek, I. Vaisman, S. Hatakeyama, K.I. Nakayama, B. Sherry, M.I. Bukrinsky // *J Biol Chem.* - 2005. - V. 280(30). - P. 27866-71.

68. Yurchenko, V. Regulation of CD147 Cell Surface Expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain / V. Yurchenko, T. Pushkarsky, J.H. Li, W.W. Dai, B. Sherry, M. Bukrinsky // *J Biol Chem.* - 2005. - V. 280(17). - P. 17013-9.

69. Yurchenko, V. Cyclophilin–CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics / V. Yurchenko, S. Constant, E. Eisenmesser, M. Bukrinsky // *Clin Exp Immunol.* - 2010. - V. 160(3). - P. 305-17.

70. Schlegel, J. Solution characterization of the extracellular region of CD147 and its interaction with its enzyme ligand cyclophilin A / J. Schlegel, J.S. Redzic, C.C. Porter, V. Yurchenko, M. Bukrinsky, W. Labeikovskiy, G.S. Armstrong, F. Zhang, N.G. Isern, J. DeGregori, R. Hodges, E.Z. Eisenmesser // *J Mol Biol.* - 2009. - V. 391(3). - P. 518-35.

71. Nabeshima, K. Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression / K. Nabeshima, H. Iwasaki, K. Koga, H. Hojo, J. Suzumiya, M. Kikuchi // *Pathol Int.* - 2006. - V. 56(7). - P. 359-67.

72. Gabison, E.E. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair / E.E. Gabison, T. Hoang-Xuan, A. Mauviel, S. Menashi // *Biochimie.* - 2005. - V. 87(3-4). - P. 361-8.

73. Coste, I. Unavailability of CD147 leads to selective erythrocyte trapping in the spleen / I. Coste, J.F. Gauchat, A. Wilson, S. Izui, P. Jeannin, Y. Delneste, H.R. MacDonald, J.Y. Bonnefoy, T. Renno // *Blood.* - 2001. - V. 97(12). - P. 3984-8.

74. Paterson, D.J. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts / D.J. Paterson DJ, W.A. Jefferies, J.R. Green, M.R. Brandon, P. Corthesy, M. Puklavec, A.F. Williams // *Mol Immunol.* - 1987. - V. 24(12). - P. 1281-90.

75. Fan, Q.W. Expression of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in the mouse central nervous system / Q.W. Fan, S. Yuasa, N. Kuno, T. Senda, M. Kobayashi, T. Muramatsu, K. Kadomatsu // *Neurosci Res.* - 1998. - V. 30(1). - P. 53-63.
76. Arora, K. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses / K. Arora, W.M. Gwinn, M.A. Bower, A. Watson, I. Okwumabua, H.R. MacDonald, M.I. Bukrinsky, S.L. Constant // *J Immunol.* - 2005. - V. 175(1). - P. 517-22.
77. Damsker, J.M. Contribution of cyclophilin-CD147 interactions in rheumatoid arthritis / J.M. Damsker, I. Okwumabua, M.I. Bukrinsky // *J Immunol.* - 2006. - V. 176. - P. 47.
78. Iacono K.T. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology / K.T. Iacono, A.L. Brown, M.I. Greene, S.J. Saouaf // *Exp Mol Pathol.* - 2007. - V. 83. - P. 283-295.
79. Jin, Z.G. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress / Z.G. Jin, M.G. Melaragno, D.F. Liao, C. Yan, J. Haendeler, Y.A. Suh, J.D. Lambeth, B.C. Berk // *Circ Res.* - 2000. - V. 87(9). - P. 789-96.
80. Satoh, K. Cyclophilin A / K. Satoh, H. Shimokawa, B.C. Berk // *Circ J.* - 2010. - V. 74(11). - P. 2249-2256.
81. Boulos, S. Evidence that intracellular cyclophilin A and cyclophilin A/CD147 receptor-mediated ERK1/2 signalling can protect neurons against in vitro oxidative and ischemic injury / S. Boulos, B.P. Meloni, P.G. Arthur, B. Majda, C. Bojarski, N.W. Knuckey // *Neurobiol Dis.* - 2007. - V. 25(1). - P. 54-64.
82. Jin, Z.G. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells / Z.G. Jin, A.O. Lungu, L. Xie, M. Wang, C. Wong, B.C. Berk // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2004. - V. 24(7). P. 1186-91.
83. Kim, S.H. Cyclophilin a as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction / S.H. Kim, S.M. Lessner, Y. Sakurai, Z.S. Galis // *Am J Pathol.* - 2004. - V. 164(5). - P. 1567-74.

84. Bane, F.T. The microtubule-targeting agents, PBOX-6 [pyrrolobenzoxazepine 7-[(dimethylcarbamoyloxy)-6-(2-naphthyl)pyrrolo-[2,1-d](1,5)-benzoxazepine] and paclitaxel, induce nucleocytoplasmic redistribution of the peptidyl-prolyl isomerases, cyclophilin A and pin1, in malignant hematopoietic cells / F.T. Bane, J.H. Bannon, S.R. Pennington, G. Campiani, D.C. Williams, D.M. Zisterer, M.M. Mc Gee // *J Pharmacol Exp Ther.* - 2009. - V. 329. - P. 38–47.
85. Cecconi, D. Proteomic analysis of pancreatic ductal carcinoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine / D. Cecconi, H. Astner, M. Donadelli, M. Palmieri, E. Missiaglia, M. Hamdan, A. Scarpa, P.G. Righetti // *Electrophoresis.* - 2003. - V. 24. - P. 4291-4303.
86. Lou, J. Proteomic profiling identifies cyclooxygenase-2-independent global proteomic changes by celecoxib in colorectal cancer cells / J. Lou, N. Fatima, Z. Xiao, S. Stauffer, G. Smythers, P. Greenwald, I.U. Ali // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* - 2006. - V. 15. - P. 1598-1606.
87. Wong, C.S. Identification of 5-fluorouracil response proteins in colorectal carcinoma cell line SW480 by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry / C.S. Wong, V.W. Wong, C.M. Chan, B.B. Ma, E.P. Hui, M.C. Wong, M.Y. Lam, T.C. Au, W.H. Chan, W. Cheuk, A.T. Chan // *Oncol Rep.* - 2008. - V. 20. - P. 89-98.
88. Grigoryeva, E.S. Expression of cyclophilin A in gastric adenocarcinoma patients and its inverse association with local relapses and distant metastasis / E.S. Grigoryeva, N.V. Cherdyntseva, M.S. Karbyshev, V.V. Volkomorov, I.V. Stepanov, M.V. Zavyalova, V.M. Perelmuter, M.A. Buldakov, S.G. Afanasjev, S.A. Tuzikov, Y.A. Bukurova, N.A. Lisitsyn, S.F. Beresten // *Pathol Oncol Res.* - 2014. - V. 20(2). - P. 467-73.
89. Yang, H. Cyclophilin A is upregulated in small cell lung cancer and activates ERK1/2 signal / H. Yang, J. Chen, J. Yang, S. Qiao, S. Zhao, L. Yu // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2007. - V. 361(3). - P. 763-7.
90. Li, M. Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147 / M. Li, Q. Zhai, U.

Bharadwaj, H. Wang, F. Li, W.E. Fisher, C. Chen, Q. Yao // *Cancer*. - 2006. - V. 106. - P. 2284-2294.

91. Gong, Z. Cyclophilin A Is Overexpressed in Hepatocellular Carcinoma and Is Associated with the Cell Cycle / Z. Gong, C. Chi, X. Huang, H. Chu, J. Wang, F. Du, L. Jiang, J. Chen // *Anticancer Res.* - 2017. - V. 37(8). - P. 4443-4447.

92. Semba, S. Protein expression profiling identifies cyclophilin A as a molecular target in Fhit-mediated tumor suppression / S. Semba, K. Huebner // *Mol Cancer Res.* - 2006. - V. 4(8). - P. 529-38.

93. Li, Z. Proteomics identification of cyclophilin a as a potential prognostic factor and therapeutic target in endometrial carcinoma / Z. Li, X. Zhao, S. Bai, Z. Wang, L. Chen, Y. Wei, C. Huang // *Mol Cell Proteomics.* - 2008. - V. 7. - P. 1810–1823.

94. Howard, B.A. Stable RNA interference-mediated suppression of cyclophilin A diminishes non-small-cell lung tumor growth in vivo / B.A. Howard, R. Furumai, M.J. Campa, Z.N. Rabbani, Z. Vujaskovic, X.F. Wang, E.F. Jr. Patz // *Cancer Res.* - 2005. - V. 65. - P. 8853–8860.

95. Al-Ghoul, M. Comparative proteomic analysis of matched primary and metastatic melanoma cell lines / M. Al-Ghoul, T.B. Brück, J.L. Lauer-Fields, V.S. Asirvatham, C. Zapata, R.G. Kerr, G.B. Fields // *J Proteome Res.* - 2008. - V. 7. - P. 4107–18.

96. Zhang, M. Cyclophilin A promotes human hepatocellular carcinoma cell metastasis via regulation of MMP3 and MMP9 / M. Zhang, C. Dai, H. Zhu, S. Chen, Y. Wu, Q. Li, X. Zeng, W. Wang, J. Zuo, M. Zhou, Z. Xia, G. Ji, H. Saiyin, L. Qin, L. Yu // *Mol Cell Biochem.* - 2011. - V. 357(1-2). - P. 387-95.

97. Guo, Y. Cyclophilin A promotes non-small cell lung cancer metastasis via p38 MAPK / Y. Guo, M. Jiang, X. Zhao, M. Gu, Z. Wang, S. Xu, W. Yue // *Thorac Cancer.* - 2018. - V. 9(1). - P. 120-128.

98. Qian, Z. Downregulation of Cyclophilin A by siRNA diminishes non-small cell lung cancer cell growth and metastasis via the regulation of

matrixmetallopeptidase 9 / Z. Qian, X. Zhao, M. Jiang, W. Jia, C. Zhang, Y. Wang, B. Li, W. Yue // *BMC Cancer*. - 2012. - V. 12. - P. 442.

99. Wang, G. Cyclophilin A Maintains Glioma-Initiating Cell Stemness by Regulating Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling / G. Wang, J. Shen, J. Sun, Z. Jiang, J. Fan, H. Wang, S. Yu, Y. Long, Y. Liu, H. Bao, K.X. Zhang, K. Han, M. Zhu, Y. Zheng, Z. Lin, C. Jiang, M. Guo // *Clin Cancer Res*. - 2017. - V. 23(21). - P. 6640-6649.

100. Choi, K.J. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death / K.J. Choi, Y.J. Piao, M.J. Lim, J.H. Kim, J. Ha, W. Choe, S.S. Kim // *Cancer Res*. - 2007. - V. 67. - P. 3654–3662.

101. Chen, S. Oligo-microarray analysis reveals the role of cyclophilin A in drug resistance / S. Chen, M. Zhang, H. Ma, H. Saiyin, S. Shen, J. Xi, B. Wan, L. Yu // *Cancer Chemother Pharmacol*. - 2008. - V. 61. - P. 459–469.

102. Wang, J. Melittin inhibits the invasion of MCF-7 cells by downregulating CD147 and MMP-9 expression / J. Wang, F. Li, J. Tan, X. Peng, L. Sun, P. Wang, S. Jia, Q. Yu, H. Huo, H. Zhao // *Oncol Lett*. - 2017. - V. 13(2). - P. 599-604.

103. Hu, X. Repressing CD147 is a novel therapeutic strategy for malignant melanoma / X. Hu, J. Su, Y. Zhou, X. Xie, C. Peng, Z. Yuan, X. Chen // *Oncotarget*. - 2017. - 8(15). - P. 25806-25813.

104. Davies, B. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease / B. Davies, D.W. Miles, L.C. Happerfield, M.S. Naylor, L.G. Bobrow, R.D. Rubens, F.R. Balkwill // *Br J Cancer*. - 1993. - V. 67(5). - P. 1126–1131.

105. Egeblad, M. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression / M. Egeblad, Z. Werb // *Nat Rev Cancer*. - 2002. - V. 2(3). - P. 161-74.

106. Tang, Y. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix

metalloproteinases / Y. Tang, M.T. Nakada, P. Kesavan, F. McCabe, H. Millar, P. Rafferty, P. Bugelski, L. Yan // *Cancer Res.* - 2005. - V. 65(8). - P. 3193–3199.

107. Силаева, Ю.Ю. Сокращение пула Т-лимфоцитов с поверхностным фенотипом эффекторов и клеток памяти под действием экспрессии трансгена  $\beta$ -цепи Т-клеточного рецептора / Ю.Ю. Силаева, А.А. Калинина, М.С. Вагида, Л.М. Хромых, А.В. Дейкин, Т.Г. Ермолкевич, Е.Р. Садчикова, И.Л. Гольдман, Д.Б. Казанский // *Биохимия.* - 2013. - Т. 78(5). - С. 614 – 626.

108. Chen, J. Osx-Cre targets multiple cell types besides osteoblast lineage in postnatal mice / J. Chen, Y. Shi, J. Regan, K. Karuppaiah, D.M. Ornitz, F. Long // *PLoS One.* - 2014. - V. 9(1). - e85161. 10.1371/journal.pone.0085161.

109. Blechová, R. Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) Test - An Alternative Method for Detection of Bacterial Endotoxins / R. Blechová, D. Pivodová // *Acta Veterinaria Brno.* - 2001. - V. 70(3). - P. 291 - 296.

110. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под. ред. В.В. Меншикова. - М.: Медицина, 1987.

111. Jerne, N.K. The Agar Technique for Recognizing Antibody Producing Cells / N.K. Jerne, A.A. Nordin, C. Henry // *The Wistar Institute Press.* - 1963. -V. 109. - P. 125.

112. Weiss, J. Tribromoethanol (Avertin) as an anaesthetic in mice / J. Weiss, F. Zimmermann // *Lab Anim.* - 1999. - V. 33(2). - P. 192-3.

113. Звездова, Е.С. Создание трансгенных животных, экспрессирующих  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи аутореактивного TCR / Е.С. Звездова, Ю.Ю. Силаева, М.С. Вагида, Е.В. Марюхнич, А.В. Дейкин, Т.Г. Ермолкевич, С.Г. Кадулин, Е.Р. Садчикова, И.Л. Гольдман, Д.Б. Казанский // *Мол. Биол.* - 2010. - Т. 44(2). - С. 311-322.

114. Объекты биологии развития / Под ред. Б.Л. Астаурова. - М.: "Наука", 1975 г.

115. Till, J.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells / J.E. Till, E.A. McCullough // *Rad Res.* - 1961. - V. 14. - P. 213-22.
116. Holmes, C. Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma / C. Holmes, W.L. Stanford // *Stem Cells.* - 2007. - V. 25. - P. 1339–1347.
117. Spangrude, G.J. Mouse strain variability in the expression of the hematopoietic stem cell antigen Ly-6A/E by bone marrow cells / G.J. Spangrude, D.M. Brooks // *Blood.* - 1993. - V. 82(11). - P. 3327-32.
118. Morrison, S.J. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells / S.J. Morrison, H.D. Hemmati, A.M. Wandycz, I.L. Weissman // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1995. - V. 92(22). - P. 10302-6.
119. Baumann, C.I. PECAM-1 is expressed on hematopoietic stem cells throughout ontogeny and identifies a population of erythroid progenitors / C.I. Baumann, A.S. Bailey, W. Li, M.J. Ferkowicz, M.C. Yoder, W.H. Fleming // *Blood.* - 2004. - V. 104(4). - P. 1010-6.
120. Kim, H. CD31+ cells represent highly angiogenic and vasculogenic cells in bone marrow: novel role of non-endothelial CD31+ cells in neovascularization and their therapeutic effects on ischemic vascular disease / H. Kim, H.J. Cho, S.W. Kim, B. Liu, Y.J. Choi, J. Lee, Y.D. Sohn, M.Y. Lee, M.A. Houge, Y.S. Yoon // *Circ Res.* - 2010. - V.107(5). - P. 602-14.
121. Ueda, Y. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow / Y. Ueda, M. Kondo, G. Kelsoe // *J Exp Med.* - 2005. - V. 201(11). - P. 1771-80.
122. Silaeva, Yu.Yu. Immune selection of tumor cells in TCR b -chain transgenic mice / Yu.Yu. Silaeva, T.S. Grinenko, M.S. Vagida, A.A. Kalinina, L.M. Khromykh, D.B. Kazansky // *J. Immunotoxicol.* - 2014. - V. 1(4). - P. 393-399.
123. Kalajzic, I. Use of type I collagen green fluorescent protein transgenes to identify subpopulations of cells at different stages of the osteoblast

lineage / I. Kalajzic, Z. Kalajzic, M. Kaliterna, G. Gronowicz, S.H. Clark, A.C. Lichtler, D. Rowe // *J Bone Miner Res.* - 2002. - V. 17(1). - P. 15-25.

124. *Methods in Molecular Biology, Transgenic Mouse Methods and Protocols* / M. H. Hofker, J. van Deursen. - Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2002.

125. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities / C. Nathan // *Nat Rev Immunol.* - 2006. - V. 6. - P. 173–82.

126. Jaillon, S. Neutrophils in innate and adaptive immunity / S. Jaillon, M.R. Galdiero, D. Del Prete, M.A. Cassatella, C. Garlanda, A. Mantovani // *Semin Immunopathol.* - 2013. - V. 35(4). - P. 377-394.

127. Kaplan, R.N. Preparing the “soil”: The Premetastatic Niche / R.N. Kaplan, S. Rafii, D. Lyden // *Cancer Res.* - 2006. - V. 66(23). - P. 11089-93.

128. Valastyan, S. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms / S. Valastyan, R.A. Weinberg // *Cell.* - 2011. - V. 147(2). - P. 275-92.

129. Cathcart, J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas / J. Cathcart J, A. Pulkoski-Gross, J. Cao // *Genes Dis.* - 2015. - V. 2(1). - P. 26-34.

130. Gialeli, C. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting / C. Gialeli, A.D. Theocharis, N.K. Karamanos // *FEBS J.* - 2011. - V. 278(1). - P. 16-27.

131. López-Otín, C. Emerging roles of proteases in tumour suppression / C. López-Otín, L.M. Matrisian // *Nat Rev Cancer.* - 2007. - V. 7(10). - P. 800-8.

132. Gutiérrez-Fernández, A. Matrix Metalloproteinase-8 Functions as a Metastasis Suppressor through Modulation of Tumor Cell Adhesion and Invasion / A. Gutiérrez-Fernández, A. Fueyo, A.R. Folgueras, C. Garabaya, C.J. Pennington, S. Pilgrim, D.R. Edwards, D.L. Holliday, J.L. Jones, P.N. Span, F.C. Sweep, X.S. Puente, C. López-Otín // *Cancer Res.* - 2008. - V. 68(8). - P. 2755-63.

133. Balbín, M. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice / M. Balbín, A. Fueyo, A.M. Tester, A.M. Pendás, A.S. Pitiot, A. Astudillo, C.M. Overall, S.D. Shapiro, C. López-Otín // *Nature Genet.* - 2003. - V. 35. - P. 252–257.

134. Montel, V. Altered metastatic behavior of human breast cancer cells after experimental manipulation of matrix metalloproteinase 8 gene expression / V. Montel, J. Kleeman, D. Agarwal, D. Spinella, K. Kawai, D. Tarin // *Cancer Res.* - 2004. - V. 64. - P. 1687–1694.
135. van Lint, P. Matrix metalloproteinase- 8: cleavage can be decisive / P. van Lint, C. Libert // *Cytokine Growth Factor Rev.* - 2006. - V. 17. - P. 217–23.
136. Decock, J. Matrix metalloproteinases: protective roles in cancer / J. Decock, S. Thirkettle, L. Wagstaff, D.R. Edwards // *J Cell Mol Med.* - 2011. - V. 15(6). - P. 1254-65.
137. Leifler, K.S. Inflammation Induced by MMP-9 Enhances Tumor Regression of Experimental Breast Cancer / K.S. Leifler, S. Svensson, A. Abrahamsson, C. Bendrik, J. Robertson, J. Gauldie, A.K. Olsson, C. Dabrosin // *J Immunol.* - 2013. - V. 190(8). - P. 4420-30.
138. Zhu, D. The Cyclophilin A-CD147 complex promotes bone marrow colonization of B-cell malignancies: implications for therapy / D. Zhu, Z. Wang, J.-J. Zhao, J.-J. Zhao, T. Calimeri, J. Meng, T. Hideshima, M. Fulciniti, Y. Kang, S. Ficarro, Y.-T. Tai, Z. Hunter, D. McMilin, H. Tong, C.S. Mitsiades, C. Wu, S. Treon, D.M. Dorfman, G. Pinkus, N. Munshi, P. Tassone, J. Marto, K. Anderson, R.D. Carrasco // *Nat Med.* - 2015. - V. 21(6). - P. 572–580.
139. Scherf, D.B. Single nucleotide polymorphisms in matrix metalloproteinase genes and lung cancer chemotherapy response and prognosis / D.B. Scherf, H. Dally, P. Müller, G. Werle-Schneider, B. Jäger, L. Edler, S. Tuengerthal, J.R. Fischer, P. Drings, H. Bartsch, A. Risch // *Eur Respir J.* - 2010. - V. 35. - P. 381–390.
140. Kerkelä, E. Metalloelastase (MMP- 12) expression by tumour cells in squamous cell carcinoma of the vulva correlates with invasiveness, while that by macrophages predicts better outcome / E. Kerkelä, R. Ala-aho, P. Klemi, S. Grénman, S.D. Shapiro, V.M. Kähäri, U. Saarialho-Kere // *J. Pathol.* - 2002. - V. 198. - P. 258–269.

141. Acuff, H.B. Analysis of host- and tumor derived proteinases using a custom dual species microarray reveals a protective role for stromal matrix metalloproteinase-12 in non-small cell lung cancer / H.B. Acuff, M. Sinnamon, B. Fingleton // *Cancer Res.* - 2006. - V. 66(16). - P. 7968-75.

142. Houghton, A.M. Macrophage elastase (matrix metalloproteinase- 12) suppresses growth of lung metastases / A.M. Houghton, J.L. Grisolano, M.L. Baumann, D.K. Kobayashi, R.D. Hautamaki, L.C. Nehring, L.A. Cornelius, S.D. Shapiro // *Cancer Res.* - 2006. - V. 66. - P. 6149–6155.

143. Dong, Z. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma / Z. Dong, R. Kumar, X. Yang, I.J. Fidler // *Cell.* - 1997. - V. 88. - P. 801–810.

144. Dandachi, N. Macrophage Elastase Induces TRAIL-mediated Tumor Cell Death through Its Carboxy-Terminal Domain / N. Dandachi, N.J. Kelly, J.P. Wood, C.L. Burton, J.E. Radder, A.S. Leme, A.D. Gregory, S.D. Shapiro // *Am J Respir Crit Care Med.* - 2017. - V. 196(3). - P. 353-363.

145. Rigg, A.S. Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect in viv / A.S. Rigg, N.R. Lemoine // *Cancer Gene Ther.* - 2001. - V. 8(11). - P. 869-78.

146. Yamazaki, M. Long-term exposure to elevated levels of circulating TIMP-1 but not mammary TIMP-1 suppresses growth of mammary carcinomas in transgenic mice / M. Yamazaki, T. Akahane, T. Buck, H. Yoshiji, D.E. Gomez, D.J. Schoeffner, E. Okajima, S.R. Harris, O.R. Bunce, S.S. Thorgeirsson, U.P. Thorgeirsson // *Carcinogenesis.* - 2004. - V. 25. - P. 1735–1746.

147. Ikenaka, Y. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model / Y. Ikenaka, H. Yoshiji, S. Kuriyama, J. Yoshii, R. Noguchi, H. Tsujinoue, K. Yanase, T. Namisaki, H. Imazu, T. Masaki, H. Fukui // *Int. J. Cancer.* - 2003. - V. 105. - P. 340–346.

148. Zitvogel, L. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? / L. Zitvogel, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, F. André, A. Tesniere, G. Kroemer // *J Clin Invest.* - 2008. - V. 118(6). - P. 1991-2001.
149. Munhoz, R.R. Recent advances in understanding antitumor immunity / R.R. Munhoz, M.A. Postow // *F1000Res.* - 2016. - V. 5. - P. 2545.
150. Yang, Y. Targeting Antitumor Immune Response for Enhancing the Efficacy of Photodynamic Therapy of Cancer: Recent Advances and Future Perspectives / Y. Yang, Y. Hu, H. Wang // *Oxid Med Cell Longev.* - 2016. - V. 1-11. 10.1155/2016/5274084.
151. de Veer, M. Cell recruitment and antigen trafficking in afferent lymph after injection of antigen and poly(I:C) containing liposomes, in aqueous or oil-based formulations / M. de Veer, M. Neeland, M. Burke, J. Pleasance, J. Nathanielsz, M. Elhay, E. Meeusen // *Vaccine.* - 2013. - V. 31(7). - P. 1012-1018.
152. Gorlino, C.V. Neutrophils exhibit differential requirements for homing molecules in their lymphatic and blood trafficking into draining lymph nodes / C.V. Gorlino, R.P. Ranocchia, M.F. Harman, I.A. García, M.I. Crespo, G. Morón, B.A. Maletto, M.C. Pistoiresi-Palencia // *J Immunol.* - 2014. - V. 193(4). - P. 1966-1974.
153. Puga, I. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen / I. Puga, M. Cols, C.M. Barra, B. He, L. Cassis, M. Gentile, L. Comerma, A. Chorny, M. Shan, W. Xu, G. Magri, D.M. Knowles, W. Tam, A. Chiu, J.B. Bussel, S. Serrano, J.A. Lorente, B. Bellosillo, J. Lloreta, N. Juanpere, F. Alameda, T. Baró, C.D. de Heredia, N. Torán, A. Català, M. Torrebadell, C. Fortuny, V. Cusí, C. Carreras, G.A. Diaz, J.M. Blander, C.M. Farber, G. Silvestri, C. Cunningham-Rundles, M. Calvillo, C. Dufour, L.D. Notarangelo, V. Lougaris, A. Plebani, J.L. Casanova, S.C. Ganal, A. Diefenbach, J.I. Aróstegui, M. Juan, J. Yagüe, N. Mahlaoui, J. Donadieu, K. Chen, A. Cerutti // *Nat Immunol.* - 2011. - V. 13(2). - P. 170-180.

154. Mantovani, A. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity / A. Mantovani, M.A. Cassatella, C. Costantini, S. Jaillon // *Nat Rev Immunol.* - 2011. - V. 11(8). - P. 519-31.
155. Vono, M. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4<sup>+</sup>T cells in vitro and ex vivo / M. Vono, A. Lin, A. Norrby-Teglund, R.A. Koup, F. Liang, K. Loré // *Blood.* - 2017. -V. 129(14). - P. 1991-2001.
156. Takashima, A. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell / A. Takashima, Y. Yao // *J Leukoc Biol.* - 2015. - V. 98(4). - P. 489-96.
157. Побезинский, Л.А. Накопление нейтрофилов в селезенке мышей, иммунизированных клетками аллогенных опухолей / Л.А. Побезинский, Е.Л. Побезинская, Е.С. Звездова, В.Н. Петрищев, Т.С. Гриненко, И.А. Батурина, Т.В. Анфалова, Л.М. Хромых, Т.В. Васильева, Д.Б. Казанский // *Докл. Акад. Наук.* - 2005. - Т. 402(3). - С. 421 - 426.
158. Марюхнич, Е.В. Функциональная роль нейтрофилоподобных клеток селезенки в иммунном ответе на клетки аллогенных опухолей / Е.В. Марюхнич, Е.С. Звездова, Т.В. Анфалова, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский // *Доклады Академии Наук.* - 2007. - Т. 414(1). - С. 126-129.
159. Calvi, L.M. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche / L.M. Calvi, G.B. Adams, K.W. Weibrecht, J.M. Weber, D.P. Olson, M.C. Knight, R.P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F.R. Bringhurst, L.A. Milner, H.M. Kronenberg, D.T. Scadden // *Nature.* - 2003. - V. 425. - P. 841–846.
160. Zhang, J. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size / J. Zhang, C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J.Q. Feng, S. Harris, L.M. Wiedemann, Y. Mishina, L. Li // *Nature.* - 2003. - V. 425. - P. 836–841.
161. Kiel, M.J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells / M.J. Kiel, O.H. Yilmaz, T. Iwashita, O.H. Yilmaz, C. Terhorst, S.J. Morrison // *Cell.* - 2005. - V. 121. - P. 1109–1121.

162. Haug, J.S. N-cadherin expression level distinguishes reserved versus primed states of hematopoietic stem cells / J.S. Haug, X.C. He, J.C. Grindley, J.P. Wunderlich, K. Gaudenz, J.T. Ross, A. Paulson, K.P. Wagner, Y. Xie, R. Zhu, T. Yin, J.M. Perry, M.J. Hembree, E.P. Redenbaugh, G.L. Radice, C. Seidel, L. Li // *Cell Stem Cell*. - 2008. - V. 2(4). - P. 367-79.
163. Felix, R. Production of hemopoietic growth factors by bone tissue and bone cells in culture / R. Felix, P.R. Elford, C. Stoeckle, M. Cecchini, A. Wetterwald, U. Trechsel, H. Fleisch, B.M. Stadler // *J Bone Miner Res*. - 1988. - V. 3. - P. 27-36.
164. Yoshihara, H. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche / H. Yoshihara, F. Arai, K. Hosokawa, T. Hagiwara, K. Takubo, Y. Nakamura, Y. Gomei, H. Iwasaki, S. Matsuoka, K. Miyamoto, H. Miyazaki, T. Takahashi, T. Suda // *Cell Stem Cell*. - 2007. - V. 1. - P. 685–697.
165. Dexter, T.M. Growth and differentiation in the hemopoietic system / T.M. Dexter, E. Spooner // *Ann Rev Cell Biol*. - 1987. - V. 3. - P. 432-441.
166. Elford, P.R. Murine osteoblast-like cells and osteogenic cell MC3T3-E1 release a macrophage colony-stimulating activity in culture / P.R. Elford, R. Felix, M. Cecchini, U. Trechsel, H. Fleisch // *Calcif Tissue Int*. - 1987. - V. 41. - P. 151-156.
167. Horowitz, M.C. Functional and molecular changes in colony stimulating factor secretion by osteoblasts / M.C. Horowitz, T.A. Einhorn, W. Philbrick, R.L. Jilka // *Conn Tiss Res*. - 1989. - V. 20. - P. 159-168.
168. Hanazawa, S. Biological characterization of interleukin-1-like cytokine produced by bone cells from newborn mouse calvaria / S. Hanazawa, S. Amano, K. Nakada, Y. Ohmori, T. Miyoshi, K. Hirose, S. Kitano // *Calcif Tissue Int*. - 1987. - V. 41. - P. 31-37.
169. Ishimi, Y. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption / Y. Ishimi, C. Miyaura, C.H. Jin, T. Akatsu, E. Abe, Y. Nakamura, A.

Yamaguchi, S. Yoshiki, T. Matsuda, T. Hirano // *J Immunol.* - 1990. - V. 145. - P. 3297-3303.

170. Feyen, J.H.M. Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone / J.H.M. Feyen, P. ELford, F.E. DiPadova, U. Trechsel // *J Bone Miner Res.* - 1989. -V. 4. - P. 633-638.

171. Marusic, A. Production of leukemia inhibitory factor mRNA and protein by malignant and immortalized bone cells / A. Marusic, J. Kalinowski, S. Jastrzebski, J.A. Lorenzo // *J Bone Miner Res.* - 1993. - V. 8. - P. 617-624.

172. Greenfield, E. Stimulation by parathyroid hormone of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor expression in osteoblasts is an immediate-early gene response induced by cAMP signal transduction / E. Greenfield, M. Horowitz, S. Lavish // *J BiolChem.* - 1996. - V. 271. - P. 10984-10989.

173. Osawa, M. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell / M. Osawa, K. Hanada, H. Hamada, H. Nakauchi // *Science.* - 1996. - V. 273. - P. 242-245.

174. Gowen, M. Production of TNF by human osteoblasts is modulated by other cytokines but not by osteopetrotic hormones / M. Gowen, K. Chapman, A. Littlewood, D. Hughes, D. Evans, G. Russell // *Endocrinology.* - 1990. - V. 126. - P. 1250-1255.

175. Goad, D. Enhanced expression of vascular cell endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I / D. Goad, J. Rubin, H. Wang, A.H. Jr Tashjian, C. Patterson // *Endocrinology.* - 1996. - V. 137. - P. 2262-2268.

176. Paic, F. Identification of Differentially Expressed Genes Between Osteoblasts and Osteocytes / F. Paic, J.C. Igwe, N. Ravi, M.S. Kronenberg, T. Franceschetti, P. Harrington, L. Kuo, D.G. Shin, D.W. Rowe, S.E. Harris, I. Kalajzic // *Bone.* - 2009. - V. 45(4). - P. 682-692.

177. Orsi, N.M. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition / N.M. Orsi, R.M. Tribe // *J Neuroendocrinol.* - 2008. - V. 20(4). - P. 462-9.

178. Abrahams, V.M. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy / V.M. Abrahams, Y.M. Kim, S.L. Straszewski, R. Romero, G. Mor // *Am J Reprod Immunol.* - 2004. - V. 51(4). - P. 275-82.
179. Dekel, N. Inflammation and implantation / N. Dekel, Y. Gnainsky, I. Granot, G. Mor // *Am J Reprod Immunol.* - 2010. - V. 63(1). - P. 17-21.
180. Koga, K. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders / K. Koga, G. Izumi, G. Mor, T. Fujii, Y. Osuga // *Am J Reprod Immunol.* - 2014. - V. 72(2). - P. 192-205.
181. Romero, R. Novel aspects of neutrophil biology in human pregnancy / R. Romero // *Am J Reprod Immunol.* - 2005. - V. 53. - P. 275.
182. Mor, G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction / G. Mor // *Ann N Y Acad Sci.* - 2008. - V. 1127. - P. 121-8.
183. Guo, M. Novel Role for Cyclophilin A in Regulation of Chondrogenic Commitment and Endochondral Ossification / M. Guo, J. Shen, J.H. Kwak, B. Choi, M. Lee, S. Hu, X. Zhang, K. Ting, C.B. Soo, R.H. Chiu // *Mol Cell Biol.* - 2015. - V. 35(12). - P. 2119-30.
184. Guo, M. Cyclophilin A (CypA) Plays Dual Roles in Regulation of Bone Anabolism and Resorption / M. Guo, A.W. James, J.H. Kwak, J. Shen, K.K. Yokoyama, K. Ting, C.B. Soo, R.H. Chiu // *Sci Rep.* - 2016. - V. 6. - P. 22378.
185. Renno, T. A role for CD147 in thymic development / T. Renno, A. Wilson, C. Dunkel, I. Coste, K. Maisnier-Patin, A. Benoit de Coignac, J.P. Aubry, R.K. Lees, J.Y. Bonnefoy, H.R. MacDonald, J.F. Gauchat // *J Immunol.* - 2002. - V. 168(10). - P. 4946-50.
186. Martínez, C. Effects of short-term administration of G-CSF (filgrastim) on bone marrow progenitor cells: analysis of serial marrow samples from normal donors / C. Martínez, A. Urbano-Ispizua, M. Rozman, M. Rovira, P. Marín, N. Montfort, E. Carreras, E. Montserrat // *Bone Marrow Transplant.* - 1999. - V. 23(1). - P. 15-9.

187. Winkler, I.G. B-lymphopoiesis is stopped by mobilizing doses of G-CSF and is rescued by overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl2 // I.G. Winkler, L.J. Bendall, C.E. Forristal, F. Helwani, B. Nowlan, V. Barbier, Y. Shen, A. Cisterne, L.M. Sedger, J.P. Levesque // *Haematologica*. - 2013. - V. 98(3). - P. 325.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю огромную благодарность моему научному руководителю доктору биологических наук, профессору Казанскому Дмитрию Борисовичу за предоставленную возможность выполнить данную диссертационную работу, за конструктивную критику, ценные советы, всестороннюю помощь и внимание. Выражаю глубочайшую признательность и безграничную благодарность моему учителю и наставнику кандидату биологических наук Хромым Людмиле Менделевне, идейному вдохновителю моей диссертационной работы, за разработку структуры работы, детальное планирование и обсуждение результатов исследований, за активную помощь в составлении, редактировании и оформлении диссертации, а также за поддержку, веру и внимание. Искренне благодарю весь коллектив лаборатории механизмов регуляции иммунитета НИИ Канцерогенеза ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" за помощь, понимание и заботу. Отдельно благодарю Замкову Марию Анатольевну за помощь в создании генетической конструкции рUC18 - STOP - мЦфА и оптимизацию метода Real-time ПЦР.

Выражаю благодарность Козырь Арине Владимировне, Колесникову Александру Владимировичу и Куликовой Наталье Леонидовне за наработку рекомбинантного циклофилина А человека. Свою огромную благодарность выражаю Яворской Надежде Петровне, Голубевой Ирине Сергеевне и Кудрявцеву Игорю Алексеевичу за бесценную помощь в проведении *in vivo* исследований с перевиваемыми опухолевыми штаммами. Я искренне благодарю Силаеву Юлию Юрьевну и Дейкина Алексея Васильевича за неоценимую помощь в создании трансгенных мышей. Выражаю благодарность Хромовой Наталье Викторовне, Трухановой Любове Сергеевне, Антошиной Елене Евгеньевне и Горьковой Татьяне Георгиевне за помощь в проведении иммуногистохимических исследований. Искренне благодарю оппонентов и рецензентов за конструктивную критику, замечания и советы, которые помогли сделать мою диссертационную работу лучше.