

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ ИНДУЦИРОВАТЬ
ИММУНОГЕННУЮ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК**

Троицкая Ольга Сергеевна

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н. Коваль Ольга Александровна

Новосибирск – 2022

Оглавление

Оглавление.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	8
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1. ИММУНОГЕННАЯ ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	16
1.1. Иммуногенная клеточная гибель. Общие понятия.....	16
1.2. Механизм индукции иммуногенной клеточной гибели.....	17
1.2.1. Роль эндоплазматического ретикулума в индукции ICD.....	17
1.2.2. Классификация ICD.....	18
1.2.3. Каскад иммуногенной гибели клеток.....	20
1.2.4. Роль дендритных клеток при индукции ICD.....	23
1.2.5. Процессинг и перекрестная презентация опухолевых антигенов дендритными клетками при индукции ICD.....	25
1.3. Эндогенные факторы, задействованные в реализации иммуногенной клеточной гибели.....	26
1.3.1. Кальретикулин и его функции при гибели клетки.....	26
1.3.2. Аденозинтрифосфат (АТФ) и его функции при гибели клетки.....	29
1.3.3. Негистоновый хроматин-связывающий ядерный белок HMGB1 и его функции при гибели клетки.....	29
1.3.4. Белки теплового шока HSP70, HSP90 и их функции при гибели клетки.....	31
1.4. Индукция иммуногенной клеточной гибели <i>in vivo</i> при профилактической вакцинации.....	32
1.5. Препараты, вызывающие иммуногенную клеточную гибель.....	34
1.5.1. Химиотерапевтические препараты.....	34
1.5.1.1. Доксорубицин.....	35
1.5.1.2. Оксалиплатин.....	36
1.5.1.3. Ингибиторы микротрубочек.....	37
1.5.1.4. Сердечные гликозиды.....	38

1.5.2. Пептиды с противоопухолевой активностью.....	39
1.5.2.1. Пептид LTX-315.....	39
1.5.2.2. Противоопухолевый пептид RT53 класса CPP.....	40
1.5.2.3. RIG-1-подобные хеликазы.....	40
1.5.3. Онколитические вирусы.....	41
1.5.3.1. Онколитические вирусы как индукторы ICD.....	42
1.5.3.2. Недостатки виротерапии.....	43
1.5.4. Физические способы индукции ICD.....	44
1.5.4.1. Радиотерапия.....	44
1.5.4.2. Гипертермия (ГТ).....	45
1.5.4.3. Наноимпульсная стимуляция (NPS).....	45
1.5.4.4. Холодная плазменная струя (ХПС).....	46
1.5.4.5. Другие физические способы индукции ICD.....	47
1.6. Подавление противоопухолевого иммунного ответа при индукции ICD.....	48
1.6.1. Преодоление иммуносупрессии, вызванной микроокружением опухоли.....	49
Заключение.....	50
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	52
2.1. Материалы и оборудование.....	52
2.1.1. Реактивы и материалы.....	52
2.1.2. Оборудование.....	54
2.1.3. Буферы и растворы.....	54
2.1.4. Олигонуклеотиды.....	55
2.1.5. Клеточные культуры.....	55
2.1.6. Лабораторные животные.....	56
2.2. Методы.....	56
2.2.1. Культивирование эукариотических культур клеток.....	56
2.2.2. Анализ цитотоксического действия ХПС (МТТ-тест).....	56

2.2.3. Определение жизнеспособности клеток в режиме реального времени на приборе iCELLigence.....	57
2.2.4. Выделение суммарной клеточной РНК.....	57
2.2.5. Электрофорез в агарозном геле.....	57
2.2.6. ОТ-ПЦР в режиме реального времени.....	58
2.2.7. Приготовление лизатов клеток и измерение концентрации общего белка.....	58
2.2.8. Электрофорез лизатов клеток в ПААГ.....	59
2.2.9. Электроперенос белков на мембрану и Вестерн-блот анализ.....	59
2.2.10. Анализ белков на поверхности клеток методом проточной цитометрии.....	59
2.2.11. Измерение уровня внеклеточного АТФ.....	60
2.2.12. Количественное определение интерферона альфа в культуральной среде.....	60
2.2.13. Выделение перитонеальных макрофагов из брюшной полости мышей.....	61
2.2.14. Исследование фагоцитирующей активности перитонеальных макрофагов.....	61
2.2.15. Выделение дендритных клеток из красного костного мозга мышей.....	62
2.2.16. Исследование фагоцитирующей активности дендритных клеток.....	63
2.2.17. Оценка созревания дендритных клеток.....	64
2.2.18. Анализ захвата опухолевых клеток MX-7 CD11c ⁺ -клетками селезенки <i>in vivo</i>	64
2.2.19. Трансплантация мышам клеток MX-7, обработанных индукторами ICD, и последующая трансплантация живых клеток.....	65
2.2.19.1. Подготовка клеток для первой трансплантации мышам.....	65
2.2.19.2. Подготовка клеток для трансплантации с применением проточной сортировки...65	
2.2.19.3. Трансплантация живых опухолевых клеток (повторная трансплантация) и оценка вакцинирующего эффекта.....	66
2.2.19.4. Введение ингибиторов ИДО экспериментальным животным.....	66
2.2.20. Забор образцов крови и получение сыворотки крови.....	66
2.2.21. Выделение и иммуноокрашивание мононуклеаров крови мышей.....	66
2.2.22. Источник холодной плазменной струи.....	67
2.2.23. Трансплантация опухолевых клеток мышам и облучение ХПС.....	67

2.2.24. Определение концентрации белка HMGB1 методом ИФА.....	67
2.2.25. Анализ цитокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 α , INF- γ , TNF- α , G-CSF и GM-CSF в сыворотке крови мышей методом ИФА.....	68
2.2.26. Облучение клеток ХПС.....	69
2.2.27. Статистический анализ данных.....	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	70
3.1. Рекомбинантный аналог лактапина RL2.....	70
3.1.1. Анализ активации маркеров иммуногенной гибели опухолевых клеток при воздействии рекомбинантного аналога лактапина RL2 <i>in vitro</i>	71
3.1.1.1. Исследование экспозиции кальретикулина на внешнюю плазматическую мембрану под действием RL2.....	71
3.1.1.2. Экспозиция белка теплового шока HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану под действием RL2.....	77
3.1.1.3. Изменение уровня внеклеточного АТФ под действием RL2.....	78
3.1.1.4. Изменение уровня внеклеточного и клеточного HMGB1 под действием RL2.....	79
3.1.2. Исследование эффекта вакцинации клетками, обработанными рекомбинантным аналогом лактапина RL2, <i>in vivo</i>	81
3.1.2.1. Анализ жизнеспособности опухолевых клеток, трансплантируемых животным после индукции в них иммуногенного апоптоза.....	82
3.1.2.2. Оценка эффекта вакцинации при трансплантации клеток MX-7, обработанных RL2.....	83
3.1.2.3. Оценка эффекта вакцинации при трансплантации клеток MX-7, обработанных RL2, сортированных по йодиду пропидия.....	85
3.1.2.4. Влияние этилпирувата, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО), на эффективность вакцинации RL2-обработанными клетками.....	88
3.1.2.5. Влияние ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО) – 1-метилтриптофана на вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток.....	90

3.1.2.6. Влияние ингибирования индоламин-2,3-диоксигеназы на Т- и В-лимфоциты иммунизированных мышей.....	92
3.2. Рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующий GM-CSF человека и лактаптин, как индуктор ICD.....	95
3.2.1. Анализ активации маркеров иммуногенной гибели опухолевых клеток, зараженных рекомбинантными вирусами осповакцины, <i>in vitro</i>	96
3.2.1.1. Экспозиция кальретикулина на внешнюю плазматическую мембрану под действием рекомбинантных вирусов осповакцины.....	96
3.2.1.2. Экспозиция белка теплового шока HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану под действием рекомбинантных вирусов осповакцины.....	98
3.2.1.3. Изменение уровня внеклеточного АТФ при инфекции рекомбинантными вирусами осповакцины.....	100
3.2.1.4. Изменение клеточного HMGB1 под действием рекомбинантных вирусов осповакцины.....	101
3.2.2. Исследование эффекта вакцинации клетками, зараженными рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact, <i>in vivo</i>	103
3.3. Холодная плазменная струя (ХПС) как индуктор ICD.....	105
3.3.1. Экспозиция CRT и HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану под действием ХПС.....	108
3.3.2. Изменение уровня внеклеточного и клеточного HMGB1 под действием ХПС.....	111
3.3.3. Изменение уровня HMGB1 в сыворотке крови мышей, облученных ХПС <i>in vivo</i>	113
3.3.4. Изменение уровня цитокинов в сыворотке крови мышей, облученных ХПС.....	114
3.4. Оценка иммунологических эффектов, вызываемых потенциальными исследуемыми индукторами иммуногенной клеточной гибели.....	117
3.4.1. Выход ИФНа в межклеточное пространство.....	117
3.4.2. Сравнение фагоцитирующей активности перитонеальных макрофагов мыши в отношении опухолевых клеток, погибающих под действием RL2, VV-GMCSF-Lact, цисплатина или облучения ХПС.....	119

3.4.3. Стимуляция созревания дендритных клеток красного костного мозга мыши после фагоцитоза опухолевых клеток, обработанных индукторами ICD.....	124
3.4.4. Захват опухолевых клеток CD11c ⁺ -клетками селезенки мышей.....	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	131
ВЫВОДЫ.....	135
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	137

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

1-МТ – 1-метилтриптофан
АТФ – аденозинтрифосфат
ВОВ – вирусы осповакцины
ДК – дендритные клетки
ДМСО – диметилсульфоксид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА – иммуноферментный анализ
МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПААГ – полиакриламидный гель
РНК – рибонуклеиновая кислота
ТЕМЕД – N,N,N',N' - тетраметилендиамин
Трис – 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол
ХПС – холодная плазменная струя
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭП – этилпириват
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
BSA – бычий сывороточный альбумин
CD – кластер дифференцировки
СРР – белки с высокой проникающей способностью
CRT – кальретикулин
DAMPs – паттерны молекул, ассоциированные с сигналами опасности
Dox – доксорубин
FBS – сыворотка крови крупного рогатого скота
GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
HMGB1 – белок группы высокой мобильности 1
HRP – пероксидаза хрена
HSP – белок теплового шока
ICD – иммуногенная клеточная гибель
IFN – интерферон
IL – интерлейкин
FITC – флуоресцеин изотиоционат
LPC – лизофосфатидилхолин

MHC – главный комплекс гистосовместимости
PBMC – мононуклеарные клетки периферической крови
PBS – натрий-фосфатный буфер
PI – йодид пропидия
RL2 – рекомбинантный аналог лактапина 2
SD – стандартное отклонение
SDS – додецилсульфат натрия
TLR – Toll-подобный рецептор
TNF – фактор некроза опухолей
VV – вирус осповакцины

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое внимание уделяют феномену вовлечения иммунной системы в реализацию противоопухолевого эффекта цитостатической терапии. Одной из успешных противоопухолевых стратегий, отличных от хирургического вмешательства, является стратегия «двойного действия», когда, с одной стороны, противоопухолевый препарат напрямую индуцирует гибель большинства раковых клеток, а с другой стороны, погибающие клетки активируют иммунную систему, формируя адаптивный иммунный ответ на опухолевые антигены, что ведет к уничтожению оставшихся опухолевых клеток. Таким требованиям удовлетворяют индукторы иммуногенной клеточной гибели (Immunogenic Cell Death, ICD), к которым относят противоопухолевые препараты с различными молекулярными механизмами действия: некоторые традиционные химиопрепараты, белковые агенты, онколитические вирусы, а также фотодинамическую и радиотерапию. Иммуногенность гибнущих клеток можно определить по активации в них определенной комбинации сигналов опасности (аларминов или DAMPs), что способствует узнаванию и поглощению этих клеток антигенпрезентирующими клетками [1,2]. Клетки с активированными маркерами ICD активно поглощаются фагоцитирующими клетками, а процессинг и презентация опухолевых антигенов дендритными клетками запускает активацию антиген-специфических Т-лимфоцитов, что ведет к формированию адаптивного иммунного ответа против таких антигенов [3]. Таким образом, гибель клеток по иммуногенному типу способствует формированию адаптивного противоопухолевого иммунного ответа аналогично вакцинации, что способствует элиминации метастазирующих опухолевых клеток, или опухолевых клеток, не попавших под прямое воздействие лекарства, клетками иммунной системы [4]. Поэтому, терапевтические индукторы ICD могут иметь преимущество как в борьбе с метастазирующими опухолями, так и для разработки подходов противоопухолевой иммунизации [5–7].

Для «ухода» от иммунной системы опухоли реализуют различные механизмы иммунной супрессии или толерантности. Например, белки CD31 и CD47 на опухолевых клетках выступают сигналами, предотвращающими их фагоцитоз антигенпрезентирующими клетками [8,9]. Секреция микроокружением опухоли иммуносупрессорных цитокинов (TGF β , IL-10) и метаболитических ферментов, таких как индуцибельная синтаза азота (iNOS), индоламин 2,3-диоксигеназа (ИДО), триптофан 2,3 диоксигеназа, аргиназа и других, также инактивирует ответ иммунной системы по отношению к опухоли [10–13]. Поэтому, можно предположить, что использование ингибиторов указанных метаболитических ферментов позволит снизить иммунную супрессию в микроокружении опухоли.

Среди природных апоптоз-индуцирующих молекул, белки представляют особый интерес для разработки новых препаратов на основе рекомбинантных клеточных и вирусных продуктов для иммуно- и виротерапии онкологических заболеваний [14]. Было показано, что рекомбинантный аналог (RL2) цитотоксического белка лактапина из молока человека вызывает гибель опухолевых клеток с активацией маркеров различных типов программируемой гибели – апоптоза, АТФ-зависимого некроза и митофагии [15–17], а его основным белком-партнером в клетке является митохондриальный белок TOM70 [15]. Определены режимы внутривенного введения RL2, вызывающие эффект торможения роста солидных опухолей у мышей [17,18].

Рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующий лактапин и GM-CSF человека, был сконструирован генно-инженерным путем для усиления противоопухолевых свойств вируса. Рекомбинантные онколитические вирусы, несущие трансгены с различной активностью, могут отличаться по эффективности противоопухолевого действия. Продукты экспрессии встраиваемых трансгенов могут непосредственно активировать гибель опухолевых клеток, тормозить рост опухоли или активировать иммунную систему [19]. Использование в качестве трансгенов генов апоптоз-индуцирующих белков может давать преимущество таким рекомбинантным вирусам в качестве противоопухолевых агентов. Было показано, что рекомбинантный вирус VV-GMCSF-Lact эффективно подавляет рост солидных опухолей при внутриопухолевом и внутривенном введении в экспериментах *in vivo* [20].

Известно также, что плазмохимическое воздействие на биообъекты, например струи холодной плазмы, также может индуцировать гибель облучаемых клеток по иммуногенному типу [21]. Эффективность цитотоксического воздействия холодной плазмы на опухолевые клетки зависит от способа ее генерации и от параметров облучения: длительности, напряжения, силы тока, рабочего газа или газовой смеси и т.д. Сами методы генерации нетермической плазмы атмосферного давления хорошо развиты, причем используются различные геометрии разрядного промежутка, организации газовой среды (в том числе, смесей) и методов энергетического воздействия на газ. Особое внимание привлекает плазменная струя – разновидность газового разряда, которая в определенных условиях выходит за пределы разрядной зоны и представляет собой последовательность стримеров, распространяющихся в окружающей среде в потоке инертного газа, прокачиваемого через газоразрядное устройство. При использовании электрофизического устройства, сконструированного в ИФП СО РАН и позволяющего в широких пределах варьировать параметры плазменной струи, было показано цитотоксическое действие холодной плазменной струи на клетки аденокарциномы легкого A549 и карциномы кожи человека A431 [22,23].

Тем не менее, возможность индукции именно иммуногенного типа гибели в клетках, обработанных RL2, зараженных рекомбинантным вирусом VV-GMCSF-Lact или облученных холодной плазменной струей, ранее не была изучена.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось исследование и сравнение эффективности индукции иммуногенного типа клеточной гибели новых потенциальных противоопухолевых препаратов на основе аналога лактапина и подхода для противоопухолевой терапии с использованием струи холодной плазмы.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Анализ активации молекулярных маркеров иммуногенной гибели (ICD) в опухолевых клетках при воздействии рекомбинантного аналога лактапина RL2, рекомбинантных вирусов осповакцины и холодной плазменной струи в экспериментах *in vitro*. Оценка влияния цитотоксических белков лактапина или апоптина в составе рекомбинантных вирусов осповакцины на способность вируса активировать маркеры ICD в зараженных клетках.
2. Исследование эффекта противоопухолевой вакцинации погибающими опухолевыми клетками, обработанными RL2 или рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact, *in vivo*. Оценка влияния ингибиторов индоламин-2,3-диоксигеназы на противоопухолевую вакцинацию клетками, обработанными RL2.
3. Анализ изменения концентрации ядерного негистонового белка HMGB1 в сыворотке крови мышей после облучения холодной плазменной струей.
4. Подтверждение иммуногенности опухолевых клеток, обработанных RL2, вирусом VV-GMCSF-Lact или струей холодной плазмы, при взаимодействии с антигенпрезентирующими клетками иммунной системы.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость.

В данном исследовании впервые проведен анализ эффективности индукции ICD в опухолевых клетках человека при использовании трех различных потенциально иммуногенных противоопухолевых агентов: аналога лактапина RL2, рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующего GM-CSF человека и лактапин, и холодной плазменной струи (ХПС).

Впервые было показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 вызывает гибель опухолевых клеток по иммуногенному типу, и трансплантация таких гибнущих клеток сингенным мышам оказывает вакцинирующий противоопухолевый эффект. Предложено использование ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы при вакцинации опухолевыми клетками, обработанными RL2, для воздействия на иммуносупрессивное микроокружение опухоли и усиления противоопухолевого эффекта. Впервые была показана способность рекомбинантного вируса VV-GMCSF-Lact и облучения ХПС индуцировать гибель опухолевых клеток с признаками ICD *in vitro*. Показано, что введение гена лактапина в геном вируса осповакцины не влияет на способность вируса индуцировать гибель клеток по иммуногенному типу *in vitro*. Впервые показано, что вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток выше, чем вакцинирующий эффект опухолевых клеток, зараженных рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact. Впервые показано увеличение уровня маркера иммуногенной клеточной гибели – белка HMGB1, в сыворотке крови животных-опухоленосителей после облучения опухолей холодной плазменной струей. Установлено, что опухолевые клетки, погибающие под действием RL2, наиболее эффективно поглощаются антигенпрезентирующими клетками *in vitro* и *in vivo* и стимулируют созревание дендритных клеток. Сравнение уровня и динамики активации маркеров ICD в обработанных указанными индукторами клеток показало, что наиболее эффективным индуктором ICD и активатором эффекта вакцинации является аналог лактапина RL2.

Полученные результаты вносят существенный вклад в выявление закономерностей механизма противоопухолевого действия индукторов иммуногенной клеточной гибели. Новые данные об особенностях индукции гибели опухолевых клеток под действием рекомбинантного аналога лактапина RL2 и рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующего лактапин, закладывают практическую основу для направленной разработки новых противоопухолевых агентов на основе лактапина, а также для внедрения этих подходов в клиническую практику.

Положения, выносимые на защиту

1. Рекомбинантный аналог лактапина RL2 индуцирует гибель опухолевых клеток с признаками иммуногенного типа гибели *in vitro*. RL2 вызывает изменения в опухолевых клетках, ведущие к их захвату антигенпрезентирующими клетками, и стимулирует в них экспрессию МНС II.
2. Гибнущие опухолевые клетки, обработанные аналогом лактапина RL2, обладают противоопухолевым вакцинирующим эффектом *in vivo*. Вакцинация суммарным пулом

- RL2-обработанных клеток оказывает больший вакцинирующий эффект, чем вакцинация только клетками в состоянии позднего апоптоза/некроза
3. Ингибирование фермента индоламин-2,3-диоксигеназы этилпируватом усиливает противоопухолевый вакцинирующий эффект суммарного пула клеток, обработанных RL2.
 4. Рекомбинантные вирусы осповакцины при заражении опухолевых клеток вызывают изменение молекулярных маркеров ICD *in vitro* без реализации противоопухолевой вакцинации *in vivo*.
 5. Облучение опухолевых клеток холодной плазменной струей индуцирует активацию маркеров иммуногенной клеточной гибели *in vitro*.
 6. Облучение зоны опухоли у мышей холодной плазменной струей ведет к повышению концентрации белка HMGB1 в сыворотке крови животных.

Публикации и апробации результатов

По материалам диссертации опубликовано 4 печатных работы. Основные результаты работы были представлены на следующих международных конференциях: всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия-2017» (Новосибирск, 2017), международном 43м конгрессе и форуме молодых ученых FEBS «Biochemistry Forever» (Прага, Чехия, 2018), международном молодежном форуме «FEBS Advance Course Current Advances in Pathogen Research» (Ереван, Армения, 2019), мультikonференции «Биотехнология-медицине будущего» (Новосибирск, 2019), 27й конференции ECDO «Cell death and Regeneration» (Дрезден, Германия, 2019), международном 45м конгрессе FEBS «Molecules of life: Toward new horizons» (онлайн-конференция, 2021).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка цитированной литературы. Работа изложена на 155 страницах, включает 46 рисунков и 4 таблицы. Список литературы содержит 258 литературных источников.

Личный вклад автора

Основная часть работы была выполнена автором лично, либо с ее непосредственным участием. Эксперименты на мышах были проведены совместно со студентами и аспирантами лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН. Клеточную сортировку проводили совместно с сотрудником лаборатории иммуногенетики ИМКБ СО РАН к.б.н. Кулемзиным Сергеем Викторовичем. Рекомбинантные вирусы осповакцины были предоставлены Кочневой Галиной Вадимовной (ГНЦ «Вектор»). Нарботка и очистка рекомбинантного аналога лактапина RL2 была проведена м.н.с. лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН Чинак Ольгой Александровной. Эксперименты по исследованию свойств холодной плазмы были проведены в Институте физики полупроводников совместно с д.ф.-м.н. Закревским Дмитрием Эдуардовичем (ИФП СО РАН) и д.ф.-м.н. Швейгерт Ириной Вячеславовной (ИТПМ СО РАН).

ГЛАВА 1. ИММУНОГЕННАЯ ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Иммуногенная клеточная гибель. Общие понятия

Концепция иммунотерапии опухолей базируется на способности иммунной системы распознавать трансформированные клетки и воздействовать на их рост и распространение. Физиологическая гибель клеток происходит по пути апоптоза, который может быть активирован в результате реализации внутренних программ роста и жизнедеятельности организма или при внешнем воздействии [24]. Морфологическими признаками, позволяющими говорить о гибели клетки по типу апоптоза, являются конденсация хроматина, фрагментация ядра при интактной плазматической мембране и появление апоптотических телец, в то время как ранним событием некроза является нарушение целостности плазматической мембраны, в результате чего происходит выход аларминов (DAMPs) и сигнальных молекул, активирующих иммунную систему и запускающих реакцию воспаления [25].

Апоптоз исходно рассматривается как тип клеточной гибели, не вызывающий иммунного ответа. Смена парадигмы о «молчании» иммунной системы при апоптозе была обусловлена открытием того, что гемагглютинирующие клетки мезотелиомы AB1, в которых гемцитабином был запущен апоптоз, способны активировать CD8⁺ Т-лимфоциты, в результате чего развивается стойкий иммунный ответ [26]. Таким образом, стало ясно, что некоторые (далеко не все) химиопрепараты, индуцирующие апоптоз, могут способствовать развитию иммунной реакции в отношении опухолевых клеток [27].

Шеффер с соавторами [28] трансплантировали иммунокомпетентным мышам опухолевые клетки, в одних из которых γ -облучением был индуцирован апоптоз, а в других – последовательными процедурами замораживания/оттаивания индуцирован некроз. Они показали, что при последующей трансплантации живых клеток опухоли этим же мышам, только у животных, вакцинированных апоптотическими клетками, не происходило развития опухоли в 75%-100% случаев. Тогда как лишь у 0–30% животных, вакцинированных некротическими клетками по той же схеме, трансплантация живых опухолевых клеток не приводила к развитию опухоли. Иммуногистохимический анализ места вакцинации апоптотическими клетками показал инфильтрацию этой области CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами и дендритными клетками, указывая на сильный Т-клеточный ответ, в то время как сайт вакцинации некротическими клетками был преимущественно инфильтрирован лишь макрофагами. Таким образом, был показан иммуногенный потенциал клеток, в которых γ -облучением был индуцирован апоптоз. В работе [4] было показано, что трансплантированные мышам опухолевые клетки, в которых индуцирован

апоптоз производными антрациклинов, например, доксорубицином, стимулируют созревание дендритных клеток с последующим формированием иммунного ответа против опухолевых клеток *in vivo*. Сравнение противоопухолевого эффекта лечения оксалиплатином или сердечными гликозидами иммунокомпетентных и иммунодефицитных мышей-опухоленосителей показало, что элиминация опухолевых клеток происходит только у иммунокомпетентных мышей, что доказывало роль иммунной системы в противоопухолевом действии этих препаратов [29,30]. Апоптоз, вызывающий описанные эффекты, был назван иммуногенным апоптозом. Поиск молекулярных маркеров такого иммуногенного апоптоза показал, что для него характерна секреция эндогенных активаторов (DAMPs), узнаваемых дендритными клетками с дальнейшим процессингом и презентацией антигенов от погибающих клеток. Это приводит к активации специфических Т-лимфоцитов и формированию долгосрочного противоопухолевого иммунитета [5].

1.2. Механизм индукции иммуногенной клеточной гибели

1.2.1. Роль эндоплазматического ретикулума в индукции ICD

Первыми в качестве эффективных индукторов иммуногенной клеточной гибели были определены доксорубицин, митоксантрон и γ -облучение [31]. Было показано, что способность этих противоопухолевых препаратов и методов лечения вызывать ICD зависит от способности индуцировать стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [32]. Основопологающим этапом в индукции иммуногенной клеточной гибели является экспозиция шаперонов ЭПР на внешнюю плазматическую мембрану. При воздействии определенных стимулов клетка может запускать интегрированный стрессовый ответ – комплексный молекулярный механизм, направленный на сохранение клеточного гомеостаза [32]. В частности, стресс ЭПР, вызванный антрациклинами, стимулирует киназу PERK, которая фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2 α [33]. Инактивация eIF2 α сопровождается частичной активацией каспазы 8 и расщеплением белка, ассоциированного с В-клеточными рецепторами 31 (BAP31), и конформационной активацией белков Bax и Bak, что в свою очередь запускает транслокацию шаперонов ЭПР на внешнюю мембрану клетки [32]. Для большинства индукторов ICD процесс транслокации шаперонов на внешнюю мембрану клетки происходит не напрямую, а в результате транспорта из ЭПР в Аппарат Гольджи, опосредованного везикуло-ассоциированным мембранным белком 1 (VAMP1) и белком, ассоциированным с синапсосомами 25 (SNAP25) [32], а также требует сопутствующей продукции активных форм кислорода (АФК) [34]. В работе [35] было показано, что если заблокировать транспорт из ЭПР в аппарат Гольджи, то при воздействии индукторов ICD

происходит снижение секреции АТФ во внеклеточное пространство и не происходит экспозиции CRT, что говорит в пользу того, что, прежде чем достичь плазматической мембраны, CRT и АТФ используют путь транспорта ЭПР-Аппарат Гольджи. Следует отметить, что вызванная ICD транслокация шаперона ЭПР кальретикулина на внешнюю клеточную мембрану, по-видимому, регулируется множеством факторов: хемокиновым лигандом 8 (CXCL8) [36], изменением уровня ионов Ca^{2+} в ЭПР [37], а также каспазой 2 (CASP2) [38], длинными некодирующими РНК (например, miR-27a) [39] и интегринами плазматической мембраны, по крайней мере, в некоторых условиях [40]. Кальретикулин и другие шапероны ЭПР на поверхности клетки способствуют поглощению таких погибающих клеток или их частей, и их относят к сигналам «съешь меня» для антигенпрезентирующих клеток (АПК) [41]. Более того, экспозиция CRT, по-видимому, стимулирует секрецию IFN I антигенпрезентирующими клетками [42], что также может способствовать иммуногенности регулируемой клеточной гибели.

Было показано, что одновременный стресс ЭПР и продукция АФК увеличивали количество различных испускаемых DAMPs, что в конечном итоге становится решающим для иммуногенности погибающих опухолевых клеток. Интересно, что иммуногенность погибающих клеток снижалась в присутствии антиоксидантов, что говорит в пользу решающего значения АФК для индукции ICD [32]. Было показано, что цисплатин, который вызывает изменения в окислительно-восстановительном метаболизме клетки, не может запускать ICD из-за своей неспособности вызывать стресс ЭПР. Однако применение индукторов стресса ЭПР, таких как туникамицин, восстанавливает способность цисплатина к индукции ICD [43]. Также, например, этопозид вызывает только экспозицию HSP70 и секрецию АТФ, но не индуцирует стресс ЭПР, и он был не способен вызывать ICD [31,44]. В свою очередь доксорубицин вызывает экспонирование HSP70, HSP90, CRT на поверхности и испускание АТФ, и, таким образом, индуцирует гибель клеток по иммуногенному типу с активацией иммунной системы в отношении опухолевых клеток [4,44].

1.2.2. Классификация ICD

Выделяют 2 типа индукторов ICD в зависимости от того, вызывают они гибель клетки в результате воздействия на ЭПР или гибель клеток и стресс ЭПР происходят независимо друг от друга [45]. Такие агенты, как доксорубицин или митоксантрон, могут быть классифицированы как индукторы ICD I-го типа – то есть агенты, которые вызывают гибель клеток через мишени, не связанные с ЭПР, и которые стимулируют ассоциированную с ICD иммуногенность посредством вторичных или «побочных» стрессовых эффектов ЭПР. Напротив, индукторы ICD II-го типа избирательно нацелены на мишени в ЭПР и могут индуцировать иммуногенную гибель

клеток, напрямую изменяя гомеостаз ЭПР и вызывая его стресс, например, фотодинамическая терапия. Таким образом, стресс ЭПР, индуцированный индукторами ICD I типа, может качественно отличаться от стресса, вызванного индукторами II типа, поскольку он может быть более мягким и может инициировать передачу сигналов, способствующих выживанию [45].

В настоящее время показано, что апоптоз не является единственным возможным исходом в ответ на сигнал к иммуногенной программируемой гибели клетки. Помимо иммуногенного апоптоза, среди типов программируемой клеточной гибели выделяют аутофагию, некроптоз и пироптоз с признаками иммуногенной клеточной гибели (ICD), отличающиеся по ряду признаков [46]. В таблице 1 представлены формы иммуногенной гибели клеток и их специфические особенности.

Таблица 1. Сравнение различных типов программируемой клеточной гибели и некроза при проявлении иммуногенности.

Тип клеточной гибели	DAMPs, характерные для ICD	Сигналы «съешь меня»	Воспаление	Иммуногенность	Терминальные клеточные события
Апоптоз	Экспозиция CRT, секреция HMGB1 и ATP	Экспозиция CRT, HSP70, HSP90, экспозиция PS	-	+	Нелитический путь, фрагментация ДНК и апоптотические тельца
Аутофагия	Выход HMGB1 и ATP	Секреция LPC, экспозиция PS	-	+	Нелитический путь, аутофагальные тельца
Некроптоз	Длинные геномные ДНК, IL6 [46], ATP, HMGB1 [47]	Секреция LPC, экспозиция PS, низкий уровень поверхностного CRT [47]	+	++	Нелитический путь, потеря целостности плазматической мембраны, набухшие клеточные органеллы
Пироптоз	Выход HMGB1, ATP, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α	Экспозиция PS	+	++	Литический путь, разрыв клеточной мембраны, выход содержимого из клетки

Степень иммуногенности для каждого типа гибели клеток оценивается как + и ++, в соответствии с уровнями выраженности сигналов «съешь меня» и эмиссией DAMPs [46].

1.2.3. Каскад иммуногенной гибели клеток

На сегодняшний день определены основные молекулярные события, необходимые для реализации иммуногенной клеточной гибели (Рис. 1). Первым этапом каскада ICD является экспозиция на поверхности погибающих опухолевых клеток комплекса из двух белков – кальретикулина и дисульфид-изомеразы ERp57 [32]. Оба белка в норме локализованы в полости эндоплазматического ретикулума и транслоцируются на поверхность клетки в течение нескольких часов после стимуляции клеток индукторами ICD. Экспозиция CRT детектируется до транслокации фосфатидилсерина на внешней мембране гибнущей клетки. Транслокация кальретикулина из ЭПР является инициирующим сигналом «съешь меня» для фагоцитирующих клеток. Экспонированный на мембране клетки CRT взаимодействует с рецепторами CD91 на поверхности дендритных клеток, что стимулирует поглощение погибающих клеток [45,48].

Следующим молекулярным признаком ICD, который можно наблюдать после экспозиции CRT, является транслокация из ядра на клеточную поверхность белков теплового шока, таких как HSP70 или HSP90, которые аналогично кальретикулину, могут связываться с рецептором CD91 на поверхности дендритных клеток, что стимулирует активацию и созревание дендритных клеток [49]. Более того, они отвечают за взаимодействие опухолевых клеток с иммунными клетками, связывая Toll-подобные рецепторы (TLR) на дендритных клетках и NKG2A на натуральных киллерах [50].

Далее, спустя 12-18 часов после начала экспозиции CRT, происходит выход негистонового хроматин-связывающего ядерного белка HMGB1 в межклеточное пространство. Белок HMGB1 связывается с рецепторами TLR4 дендритных клеток, что необходимо для оптимального TLR4-зависимого процессинга и презентации Т-клеткам опухолевых антигенов дендритными клетками [51]. Во время химиотерапии или лучевой терапии дендритные клетки получают сигнал через TLR4 и его адаптер MyD88 для эффективной обработки и перекрестной презентации антигена от погибающих опухолевых клеток [52].

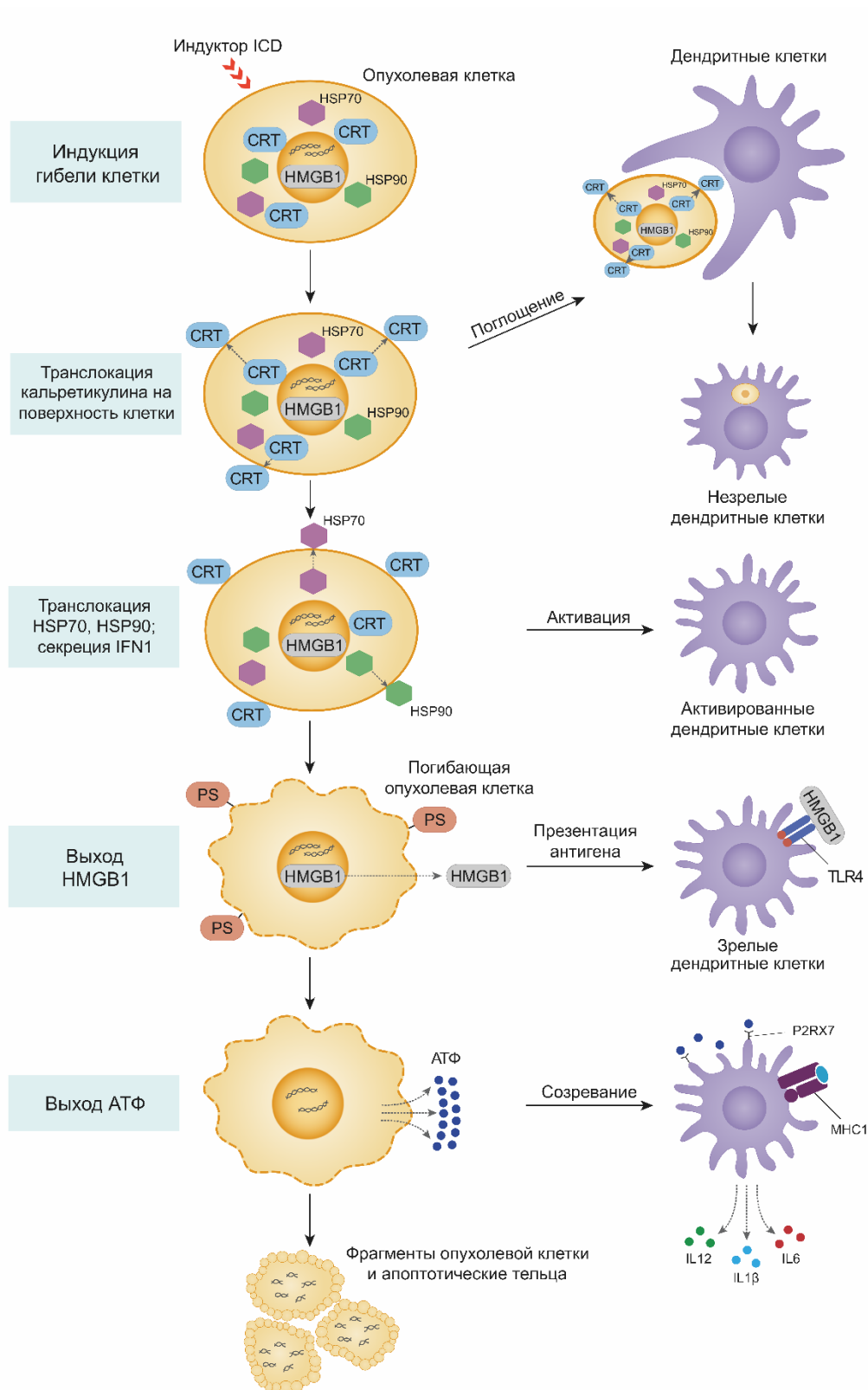


Рис. 1. Последовательные стадии иммуногенного апоптоза с активацией антигенпредставляющих клеток. Адаптировано по [51]. CRT – кальретикулин, HSP – белки теплового шока, HMGB1 – белок группы высокой мобильности 1, IFN1 – интерферон 1 типа, PS – фосфатидилсерин, TLR – Toll-подобный рецептор, АТФ – аденозинтрифосфат, P2RX7 – пуриnergический рецептор, MHC – главный комплекс гистосовместимости, IL – интерлейкин.

Заключительным молекулярным событием в каскаде ICD является выход АТФ во внеклеточное пространство – сигнала «найди меня», необходимого для продуктивного созревания дендритных клеток. Погибающие клетки обозначают свое присутствие с помощью хемотаксических факторов, известных как сигналы «найди меня», необходимых для того, чтобы фагоцитирующие клетки (нейтрофилы, моноциты, тканевые макрофаги) быстро находили их и эффективно уничтожали [53]. Выход АТФ из гибнущих клеток в межклеточное пространство активирует пуринергические рецепторы P2X7 на дендритных клетках и вызывает P2X7/NLRP3 рецептор-зависимую активацию инфламмосомы в дендритных клетках, тем самым содействуя протеолитическому созреванию и высвобождению провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин IL-1 β . IL-1 β необходим для активации антиген-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN γ [3]. Именно IL-1 β участвует в активации факторов врожденного иммунитета, развитии воспаления и первых этапах иммунного ответа [51,54]. Также было показано, что высвобождение интерферона I типа (ИФН) из погибающих опухолевых клеток также является важным фактором при индукции иммуногенной клеточной гибели [55]. ИФН I типа действует на общий рецептор IFNAR, который состоит из двух субъединиц, IFNAR1 и IFNAR2, запуская аутокринную активацию IFN-I-связанных генов в опухолевых клетках. Среди этих генов особое внимание заслуживает хемокин CXCL10, который действует как важный хемотаксический фактор для привлечения иммунных клеток в очаг опухоли. Показано, что под действием ИФН I типа происходит как увеличение экспрессии гена *sxcl10*, так и накопление CXCL10 в межклеточном пространстве опухолевых клеток [56,57].

При успешной реализации каскада иммуногенной гибели клеток должна появиться популяция антиген-специфических Т-клеток, которые при повторной встрече с опухолевыми клетками данного типа будут узнавать соответствующие антигены и уничтожать раковые клетки (Рис. 2). Возможность индукции каскада иммуногенного апоптоза в опухолевых клетках противоопухолевыми препаратами позволила разработать исследователям стратегию противоопухолевой вакцинации, при которой «вакциной» являются клетки, в которых индуцирована иммуногенная клеточная гибель.

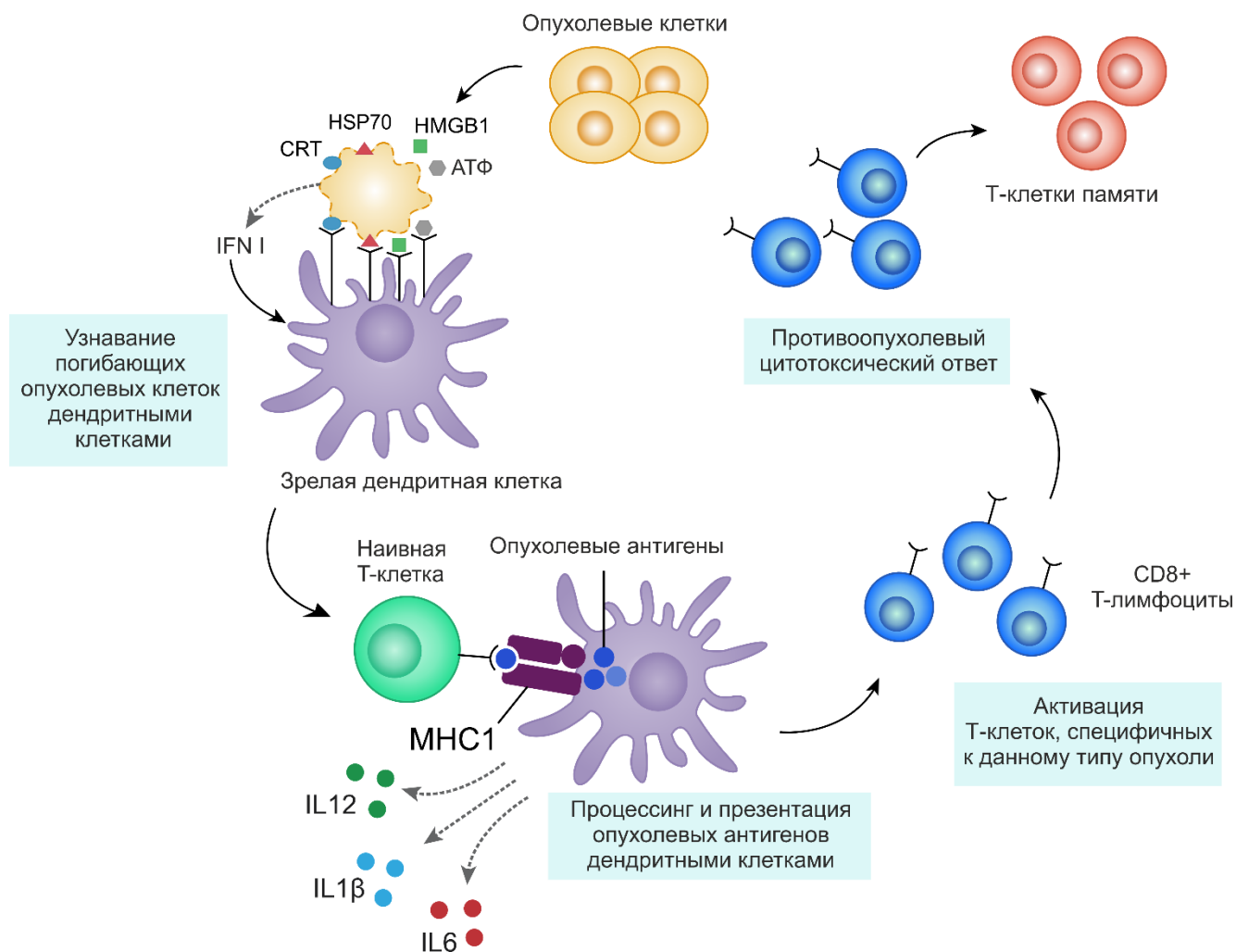


Рис. 2. Упрощенная схема индукции иммуногенной клеточной гибели. ICD – иммуногенная клеточная гибель, CRT – кальретикулин, HSP – белки теплового шока, HMGB1 – белок группы высокой мобильности 1, АТФ – аденозинтрифосфат, МНС – главный комплекс гистосовместимости, IL – интерлейкин, IFN I – интерферон 1 типа.

1.2.4. Роль дендритных клеток при индукции ICD

Антигенпрезентирующие клетки (АПК) представляют собой клетки иммунной системы, которые могут расщеплять белковые антигены на пептиды и представлять их в сочетании с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса (МНС) на своей клеточной поверхности для взаимодействия с соответствующими рецепторами Т-клеток. К профессиональным АПК относят дендритные клетки (ДК), макрофаги и В-клетки, тогда как к непрофессиональным АПК, участвующим в презентации антигенов только в течение коротких периодов времени, относят эпителиальные клетки тимуса и эндотелиальные клетки сосудов [58]. Считается, что среди АПК именно дендритные клетки играют главную роль в презентации антигенов за счет их способности стимулировать наивные хелперные и цитотоксические Т-

клетки и выполнять перекрестную презентацию антигенов [59]. Дендритные клетки повсеместно присутствуют во всех тканях, выполняя свои функции, однако большинство ДК происходят из красного костного мозга, после чего мигрируют в другие органы. ДК являются редкой популяцией иммунных клеток, небольшие популяции ДК обнаруживают в селезенке, тимусе, крови, миндалинах, коже, печени, легком, кишечнике и лимфатических узлах [60,61]. Исходно дендритные клетки находятся в незрелой форме, однако при встрече с антигеном происходит его процессинг и презентация, сопровождающиеся созреванием ДК. Для зрелых дендритных клеток характерно наличие поверхностных костимуляторных молекул, таких как: CD25, CD40, CD69, CD80, CD83 и CD86, а также МНС II, необходимых для эффективного связывания с Т-лимфоцитами при презентации антигена [62]. Именно зрелые ДК мигрируют в лимфатические узлы, стимулируют наивные Т-клетки посредством связывания с Т-клеточным рецептором [63].

В микроокружении опухоли инфильтрация зрелыми ДК связана с увеличением количества иммунных эффекторных клеток. Процессинг и перекрестная презентация опухолеассоциированных антигенов дендритными клетками запускает противоопухолевую активность CD8⁺ Т-клеток. К сожалению, показано, что у онкологических больных эти процессы часто тормозятся из-за иммуносупрессивного микроокружения опухоли [63]. Опухоль-индуцированная модуляция инфильтрирующих опухоль ДК часто приводит к их дисфункции, что приводит нарушению процессов процессинга, презентации антигенов и костимуляции Т-клеток. По этой причине опосредованная ДК перекрестная презентация опухолевых антигенов у онкобольных часто вызывает толерантность Т-клеток вместо противоопухолевого иммунного ответа [64].

Фагоцитоз дендритными клетками апоптотических клеток не ведет к их созреванию, а вызывает толерантность к опухолевым антигенам в результате генерации беспомощных CD8⁺ регуляторных Т-клеток, которые продуцируют TRAIL для уничтожения активированных Т-клеток [65]. Тем не менее, фагоцитоз апоптотических клеток может активировать Т-клеточный иммунный ответ, если апоптотические клетки испускают сигналы опасности (DAMPs) [66]. Так, при индукции иммуногенной клеточной гибели опухолевых клеток происходит секреция DAMPs, которые взаимодействуют с рецепторами на ДК, стимулирующие их созревание. Это взаимодействие приводит к иммунному ответу, который обычно коррелирует с формированием иммунологической памяти [5]. Существенное участие ДК в иммунных реакциях, запускаемых опухолевыми клетками при индукции ICD, описано в различных исследованиях [67,68], что свидетельствует о том, что способность индукторов ICD стимулировать эффективный противоопухолевый Т-клеточный ответ зависит от наличия и предрасположенности к активации ДК в микроокружении опухоли [63].

Из данных литературы известно, что ДК с фенотипом $CD8a^+$ являются специализированными к захвату погибающих клеток дендритными клетками. Показано, что $CD8a^-$ ДК не фагоцитируют апоптотические клетки, тогда как латексные частицы и овальбумин способны захватывать как $CD8a^+$, так и $CD8a^-$ ДК [69]. После захвата $CD8^+$ ДК формируют комплекс с МНС II и осуществляют презентацию антигенов, ассоциированных с апоптотическими клетками, $CD4^+$ - и $CD8^+$ Т-клеткам.

Тип дендритных клеток и тканевая локализация также влияют на ответ иммунной системы на гибнущие клетки [70]. Кроме того, окисленное или восстановленное состояние DAMPs из гибнущих клеток определяет толерогенный или иммуногенный апоптоз будет реализован [71]. Например, АФК в апоптотических клетках при взаимодействии с белками клетки могут вызывать окисление одного из цистеинов HMGB1. Этот окисленный HMGB1 не может активировать дендритные клетки и обладает толерогенным действием [72]. Таким образом, иммуногенные характеристики гибнущих клеток определяются набором DAMPs. Несмотря на то, что и апоптотические клетки, и некротические клетки испускают DAMPs, при некрозе репертуар испускаемых DAMPs разнообразней, а их концентрация выше [71].

1.2.5. Процессинг и перекрестная презентация опухолевых антигенов дендритными клетками при индукции ICD

Необходимым условием для антиген-специфической активации Т-лимфоцитов является взаимодействие между Т-клеточным рецептором и комплексом МНС I : антиген. Т-лимфоциты могут узнавать чужеродные антигены только в контексте главного комплекса гистосовместимости I – МНС I [73]. Молекулы МНС подразделяются на два основных класса – МНС I и МНС II. Они являются интегральными мембранными гликопротеидами, МНС I можно обнаружить на всех клетках, кроме трофобласта, а МНС II экспрессируется на поверхности антигенпредставляющих клеток. Молекулы МНС этих двух классов, нековалентно связанные в комплекс с антигенными пептидами, служат лигандами для Т-клеток разных типов. Т-клетки узнают комплексы «антиген–МНС» через экспрессированные на их поверхности Т-клеточные антигенраспознающие рецепторы. Клетки $CD8^+$ называют цитотоксическими Т-лимфоцитами, так как они могут выделять цитокины и литические и секреторные гранулы, содержащие перфорины, сериновые протеазы, гранзимы и некоторые другие белки, обладающие литической активностью, осуществляя прямой лизис клеток-мишеней. Содержимое гранул $CD8^+$ Т-клеток попадает в клетку-мишень путем экзоцитоза, перфорины встраиваются в мембрану и образуют широкое незакрывающееся отверстие в мембране, через которое внутрь попадают гранзимы [74]. Цитотоксическую активность в некоторых случаях проявляют и $CD4^+$ клетки, так как они

усиливают реакцию антител, активируя В-клетки, способствуют другим Т-клеточным взаимодействиям, а также активируют другие эффекторные клетки. Цитотоксические $CD8^+$ Т-лимфоциты узнают антигены в комплексе с МНС I, $CD4^+$ Т-хелперные клетки – с МНС II [75]. Это разделение связано с тем, что обычно при презентации антигенов дендритные клетки (ДК) представляют экзогенные, полученные из окружающей среды антигены в комплексе с МНС II, а эндогенные, синтезированные клеткой – с МНС I. Однако в некоторых случаях ДК способны захватывать и представлять антигены погибших клеток в «контексте» собственных молекул МНС I класса $CD8^+$ Т-лимфоцитам. Этот процесс называют перекрестной презентацией антигенов или кросс-презентацией [76]. В результате перекрестной презентации происходит кросс-прайминг – стимуляция наивных цитотоксических $CD8^+$ Т-лимфоцитов. Это процесс формирования иммунитета против опухолевых антигенов [77] и против вирусов, которые инфицируют антигенпрезентирующие клетки и нарушают нормальную функцию ДК [78]. Перекрестная презентация также необходима для индукции цитотоксического иммунитета путем вакцинации белковыми антигенами, например, при противоопухолевой вакцинации [79].

Для каскада иммуногенной клеточной гибели процесс перекрестной презентации важен для эффективного созревания популяции антиген-специфических Т-лимфоцитов [51]. Показано, что один из известных индукторов ICD, гемцитабин, вызывает апоптоз в солидных опухолях, в результате чего усиливается ДК-зависимая кросс-презентация опухолевых антигенов Т-клеткам [26]. В экспериментах *in vitro* показано, что 5-фторурацил, активирует экспрессию белков теплового шока (HSP) в опухолевых клетках, что облегчает захват опухолевых антигенов дендритными клетками и последующую перекрестную презентацию опухолевых антигенов [80].

1.3. Эндогенные факторы, задействованные в реализации иммуногенной клеточной гибели

1.3.1. Кальретикулин и его функции при гибели клетки

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) представляет собой разветвленную сеть внутренних мембран, которая связана с наружной мембраной ядерной оболочки. ЭПР – это первый компартмент в секреторном пути белков. Приблизительно 30% всех клеточных белков и пептидов синтезируется в ЭПР, где они взаимодействуют с ферментами и шаперонами, включая кальретикулин, кальнексин, глюкозо-регулируемый белок Grp94, тиоловые оксидоредуктазы PDI и дисульфид-изомеразу ERp57. Все эти молекулы участвуют в формировании функциональной конформации белковых молекул [81]. Кальретикулин, кальнексин и ERp57 составляют шаперонный комплекс, осуществляющий фолдинг и контроль качества синтезированных белков, которые транспортируются через ЭПР.

Другой важнейшей функцией ЭПР является хранение и высвобождение ионов Ca^{2+} [82]. Уровень Ca^{2+} в цитозоле регулируется за счет совместного функционирования различных растворимых Ca^{2+} -связывающих белков, а также белков, осуществляющих его трансмембранный перенос. Одним из таких белков является кальретикулин – уникальный Ca^{2+} -связывающий шаперон, который в норме находится в просвете ЭПР. Этот белок играет важную роль во многих клеточных процессах, основными из которых считают его участие в фолдинге белков, в депонировании и регуляции гомеостаза ионов Ca^{2+} и Ca^{2+} -зависимого сигналинга, регуляции экспрессии генов, клеточной адгезии, заживлении ран, канцерогенезе, аутоиммунных заболеваниях [83]. Ионы Ca^{2+} представляют собой вторичный мессенджер и контролируют многие клеточные функции, такие как сокращение сердечной и скелетной мышц, иммунный ответ Т-клеток и многие другие [81]. Большинство внутриклеточного Ca^{2+} хранится в просвете ЭПР и изменение концентрации Ca^{2+} в просвете ЭПР в результате нарушения взаимодействия ЭПР и комплекса Гольджи является внутриклеточным сигналом, который блокирует транспорт молекул через ядерные поры и нарушает работу шаперонов [84]. Более 50% ионов Ca^{2+} , находящихся в ЭПР, связаны с кальретикулином [85], поэтому не удивительно, что избыточная экспрессия кальретикулина приводит к увеличению количества Ca^{2+} во внутриклеточных депо [86].

Несмотря на то, что кальретикулин реализует большинство из перечисленных активностей в просвете ЭПР, показано его функционирование в ядре, в цитоплазме и на поверхности клетки. Кальретикулин является компонентом ядерного матрикса в клетках карциномы печени [87] и может связываться с гистонами [88]. Наконец, кальретикулин локализуется во внеклеточном матриксе зубов, где он способствует процессам минерализации [83].

Кальнексин – это встроенный мембранный белок ЭПР, который является гомологом кальретикулина [89]. Дисульфид-изомераза ERp57 – это белок, находящийся преимущественно в просвете ЭПР, способный катализировать реакции образования, распада и изомеризации дисульфидных связей в молекулах белков [90]. Белок, принявший правильную конформацию после взаимодействия с системой белков кальретикулин/кальнексин/ERp57, транспортируется из ЭПР, а неправильно свернутый белок остается в комплексе, где он под действием последовательных актов гликозилирования/дегликозилирования принимает правильную конформацию и проходит контроль качества, либо задерживается в комплексе с кальнексином, что является сигналом к его деградации. В клетках с пониженной экспрессией кальретикулина наблюдается неправильный фолдинг белков и накопление неправильно свернутых белков [83].

Предполагают, что поверхностный кальретикулин играет роль в презентации антигенов, активации комплемента [91], удалении апоптотических клеток [41], иммуногенности погибающих раковых клеток [31], заживлении ран [92] и тромбоспондиновом сигналинге [93].

Кальретикулин действует как второстепенный лиганд на поверхности клеток, необходимый для узнавания при фагоцитозе, стимулирующий белки, связанные с рецептором липопротеинов низкой плотности, на поверхности поглощающих клеток. Белок локализуется на внешней поверхности плазматической мембраны многих типов клеток, где он может служить посредником клеточной адгезии [83]. В норме расположенный в просвете ЭПР, кальретикулин транслоцируется на внешнюю клеточную мембрану в результате стресса ЭПР путем экзоцитоза (Рис. 3).

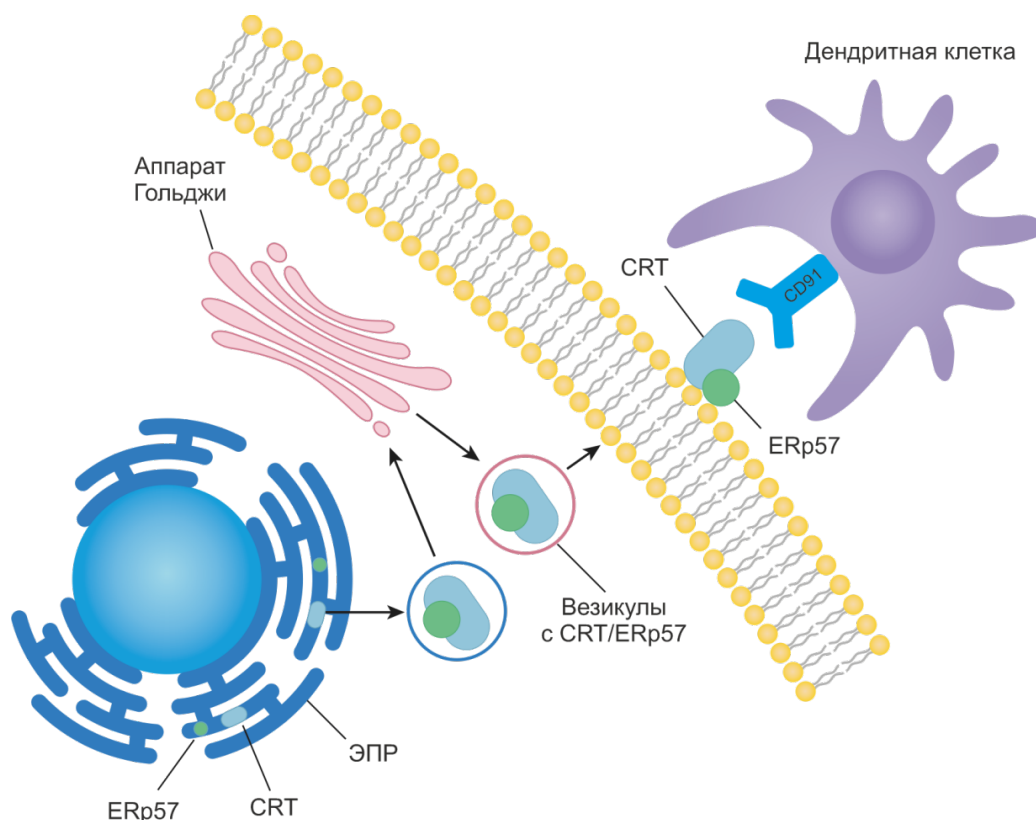


Рис. 3. Экспозиция кальретикулина на внешнюю плазматическую мембрану и узнавание дендритными клетками. ERp57 – протеин-дисульфид изомераза, CRT – кальретикулин, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, CD – кластер дифференцировки.

Везикулы с кальретикулином в сопровождении с ERp57 проходят путь от ЭПР к Гольджи, после чего сливаются с мембраной, и CRT экспонируется на внешней плазматической мембране. Транспорт кальретикулина от ЭПР к мембране зависит от взаимодействия связанных с везикулами белков SNARE (рецепторов растворимого N-этилmaleимид-чувствительного белка прикрепления) с белками SNARE на мембране клетки [32,40]. В итоге в результате стресса ЭПР происходит экспозиция кальретикулина на внешнюю плазматическую мембрану, где он способен связываться с рецепторами CD91 на поверхности ДК, что приводит к фагоцитозу погибающих клеток [94].

1.3.2. Аденозинтрифосфат (АТФ) и его функции при гибели клетки

Апоптоз происходит во многих типах тканей как в норме, так и при патологиях. Для того чтобы фагоциты быстро находили и эффективно уничтожали апоптотические клетки, необходимо, чтобы эти погибающие клетки обозначали свое присутствие при помощи выхода хемотаксических факторов, известных как сигналы «найди меня», и через сигналы «съешь меня», которые являются лигандами для поглощения. В настоящее время предложено несколько факторов, которые могут выступать в качестве сигналов «найди меня», в том числе: АТФ, УТФ, хемокин фракталкин (CX3CL1), липиды LPC и S1P [95]. При нарушении утилизации апоптотических клеток происходит конверсия апоптотических клеток во вторично-некротические, что вызывает хроническое воспаление и ведет к развитию аутоиммунных заболеваний [53].

Выход АТФ во внеклеточное пространство характерен как для иммуногенного апоптоза, так и для некроза, сопровождающегося лизисом клетки. Однако между этими процессами есть несколько различий. В первую очередь, речь идет о количестве высвобождаемого АТФ. При апоптозе во внеклеточное пространство попадает менее 2% клеточного АТФ [96]. Характеризация АТФ как медиатора воспаления основана в значительной степени на его способности активировать ионотропный нуклеотидный рецептор P2X7, который, в свою очередь, приводит к активации инфламмосомы и высвобождению провоспалительных цитокинов [97]. Во время некроза именно огромный выброс АТФ активирует инфламмасому и процесс воспаления. Тем не менее, концентрация АТФ, необходимая для активации пуринергических рецепторов P2X7 составляет не менее 100 мкМ, что значительно выше концентрации АТФ, необходимой для активации хемотаксических рецепторов, таких как P2Y2 и составляет менее 1 мкМ [98]. Интересно, что более низкие концентрации АТФ, могут на самом деле иметь противовоспалительное действие, подавляя секрецию воспалительных цитокинов, а также содействовать высвобождению цитокинов противовоспалительного характера [53]. Таким образом, АТФ нельзя рассматривать как универсальный сигнал развития воспаления.

1.3.3. Негистоновый хроматин-связывающий ядерный белок HMGB1 и его функции при гибели клетки

Белки группы HMG (High mobility group) – это ядерные негистоновые белки, необходимые для поддержания архитектуры хроматина: они изменяют, изгибают или модифицируют структуру комплекса ДНК с транскрипционными факторами или гистонами. Белки HMG разделяют на 3 семейства: HMGA, HMGB, HMGN. HMGB-белки имеют молекулярный вес около

25 кДа и содержат белковые домены, называемые «HMG боксы». Белок HMGB1 довольно слабо связывается с ДНК в нормальной В-форме, однако обладает высоким сродством к искаженным структурам ДНК, таким как крестообразные структуры и выпуклости ДНК. Было показано, что HMGB1 может мигрировать между цитоплазмой и ядром клетки в зависимости от фазы клеточного цикла. Лимфоидные клетки содержат HMGB1 как в цитоплазме, так и в ядре [99]. Внутри клетки HMGB1 взаимодействует с p53, TBR, Oct14, Нох, стероидными рецепторами и многими вирусными белками, эффективно регулируя экспрессию генов [100].

Функции и клеточная локализация белка HMGB1 зависят от конкретных посттрансляционных модификаций. Наличие двух сайтов ядерной локализации, расположенных в А боксе HMG и в В боксе HMG, отвечают за попадание белка HMGB1 в ядро [101]. Ацетилирование лизинов в составе этих сайтов (четыре в одном и пять в другом) имеет решающее значение для перемещения HMGB1 из ядра в цитоплазму и секреции белка иммунными клетками. Кроме того, фосфорилирование серина и треонина протеинкиназой С в этих сайтах приводит к выходу HMGB1 из ядра в цитоплазму по кальций-зависимому пути. При метилировании 42-го лизина происходит ослабление ДНК-связывающей активности HMGB1, что приводит к выходу белка в цитоплазму из ядра путем пассивной диффузии [102]. В состав HMGB1 входит три цистеина: два в А боксе HMG (C23 и C45), которые могут образовывать дисульфидную связь, и один C106 в В боксе HMG [101]. Окислительное или восстановленное состояние этих цистеинов определяет внеклеточную активность HMGB1. Полностью восстановленная форма HMGB1 является хемоаттрактантом, тогда как HMGB1 с дисульфидной связью действует как провоспалительный цитокин. Дальнейшее окисление цистеина до сульфонов активными формами кислорода ведет к утрате обеих активностей [103].

HMGB1, содержащийся внутри ядра, не ацетилирован и полностью восстановлен. В цитозоле HMGB1 может существовать как в ацетилированной форме, так и в полностью восстановленной. HMGB1, высвобождаемый в процессе некроза, не ацетилируется, преимущественно восстановлен, но быстро окисляется до дисульфида. HMGB1, активно секретируемый иммунными клетками, ацетилирован и находится в двух формах: восстановленной и содержащей дисульфидную связь. Пока неизвестно секретируется ли белок в полностью восстановленной форме, а затем окисляется или секретируется сразу в дисульфидной форме [104].

Внеклеточная роль HMGB1 заключается в стимуляции к активной пролиферации и миграции стволовых клеток [105]. Появление HMGB1 в межклеточном пространстве является признаком внезапного повреждения или некроза, потому что в этих случаях хроматин повреждается необратимо и HMGB1 выходит из комплекса с хроматином. В очагах механического повреждения HMGB1 взаимодействует с рецептором конечных продуктов

гликирования (RAGE), что усиливает продукцию TNF, IL1, IL8, MCP1, CDF1 α и других факторов, привлекающих здоровые стволовые клетки в очаг повреждения [106]. HMGB1 может выделяться из клеток как активным, так и пассивным способом. Активная секреция HMGB1 связана с диссоциацией из комплекса с поврежденными хромосомами в результате ацетилирования гистонов, гиперацетилирования и монометиления HMGB1. Пассивная диффузия HMGB1 происходит при некрозе, и HMGB1 пассивно выделяется из некротических клеток. Однако при обычном, неиммуногенном апоптозе HMGB1 не выделяется из плотно упакованных ядер апоптотических клеток [107]. Большое значение HMGB1 имеет в процессах канцерогенеза. Белок HMGB1 активирует матриксные металлопротеазы (MMP 2, MMP 9), уменьшает степень адгезии стволовых опухолевых клеток, стимулирует миграцию и мобилизацию нормальных стволовых клеток, и фактически является проводником неопластической инвазии и метастазирования [108]. В работе [107] было показано, что высвобождение HMGB1 из некротических опухолевых клеток, обработанных доксорубицином, вызывающий некроз в высоких концентрациях [109], способствует возобновлению роста опухоли и метастазированию по пути активации системы RAGE.

1.3.4. Белки теплового шока HSP70, HSP90 и их функции при гибели клетки

Общим ответом на клеточный стресс, в том числе вызванным химиопрепаратами, является активация транскрипции ряда шаперонов, которые принадлежат к классу индуцибельных HSP-белков или белков теплового шока. HSP-белки представляют собой группу белков, функцией которых является предотвращение или ингибирование денатурации и реструктуризации клеточных белков в ответ на стресс, например, при высокой температуре. Белки теплового шока защищают клетку от гибели, проводя рефолдинг поврежденных белков или направляя испорченные белки в протеасомы для деградации [51]. Все HSP-белки можно условно разделить на несколько семейств, объединяющих сходные по молекулярным свойствам белки: HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 и большие HSP-белки. За исключением группы малых HSP, белки теплового шока являются АТФ-зависимыми и обладают АТФ-азной активностью [110].

Семейство белков HSP70 с молекулярной массой около 70 кДа кодируется группой генов HSPA и включает в себя 13 белков. Одним из наиболее изученных представителей этого семейства является белок HSP70 [111]. У млекопитающих HSP70 участвует в процессах формирования, стабилизации и транспорта белков через мембраны митохондрий и ядерную оболочку [112]. Как и многие из HSP белков HSP70 вовлечен в передачу сигналов, регулирующих апоптоз и клеточный цикл во время гаметогенеза [113]. Показано, что белки семейства HSP70 обладают способностью узнавать нарушенные конфигурации белков, связываться с ними и

поддерживать их в состоянии, необходимом для последующего восстановления, предотвращая образование случайных связей и формирование нефункциональных белковых агрегатов. В отличие от большинства шаперонов HSP70 не только предотвращает дальнейшую деградацию белков, но и восстанавливает поврежденные белки до исходного состояния в присутствии АТФ и кошаперона Hdj-1 [114]. Следует отметить, что функции белков HSP70 обусловлены наличием двух доменов в их структуре. С-терминальный пептид-связывающий домен не принимает участия в регуляции специфичности связывания с пептидами и важен для действия белков HSP70 *in vivo*. Напротив, N-терминальный АТФ-азный домен, по-видимому, определяет специфические функции белка в клетке [115]. HSP90 также является шапероном и выполняет ряд функций в клетке, включая фолдинг белков, стабилизацию белков при тепловом шоке, способствует деградации белков [116]. Шаперон HSP90 стабилизирует многие белки, ответственные за рост опухоли, участвует в регуляции адгезии, инвазии, метастазирования, ангиогенеза и апоптоза, поэтому ингибиторы HSP90 рассматривают в качестве противоопухолевых агентов [110].

Помимо этого, белки теплового шока HSP70 и HSP90 могут образовывать комплексы с пептидными антигенами, включая опухоль-специфические пептиды, что является необходимым и достаточным источником антигенов для презентации Т-клеткам. Было показано, что свободные пептидные антигены не способны вызывать Т-клеточный ответ CD8⁺ лимфоцитов, в отличие от антигенов, сопровождаемых белками теплового шока. В экспериментах на мышах *in vivo* было показано, что комплексы антигенов с HSP70 и HSP90 могут служить источниками антигенов для эффективной кросс-презентации дендритными клетками [117].

1.4. Индукция иммуногенной клеточной гибели *in vivo* при профилактической вакцинации

В настоящее время существует несколько общепринятых моделей для исследования ICD *in vivo*. «Золотой стандарт» для оценки способности гибнущих клеток инициировать адаптивный иммунитет включает профилактическую вакцинацию иммунокомпетентных сингенных животных [5]. При таком подходе опухолевые клетки *in vitro* подвергают воздействию потенциального индуктора ICD, а затем трансплантируют подкожно в качестве вакцины без каких-либо иммунологических адъювантов, которые могут усиливать иммунный ответ на вакцинацию [118]. Через одну-две недели животным повторно трансплантируют живые опухолевые клетки того же типа в минимальной дозе, необходимой для образования опухолевых узлов у животных, и наблюдают за ростом опухоли в течение 40–60 дней (Рис. 4) [4,52,119]. Для оценки эффективности вакцинации помимо процента мышей без опухоли обычно учитывают скорость роста опухолей, если опухоли развиваются, несмотря на индуцированный вакциной адаптивный иммунный ответ. Специфичность развития противоопухолевого ответа

подтверждается повторным заражением мышей из экспериментальной группы без опухолей в конце эксперимента другой линией сингенных раковых клеток, которая, как ожидается, вызовет прогрессирующие неопластические поражения у 100% мышей. Следует отметить, что вакцинацию можно проводить с антигенпрезентирующими клетками (АПК), подвергнутыми воздействию погибающих раковых клеток *in vitro*. Также индукцию ICD можно использовать в терапевтических (а не профилактических) условиях, то есть использовать активированные погибающими клетками АПК в качестве лечения сформировавшихся опухолей [120]. Усиление эффективности терапии любым индуктором регулируемой гибели опухолей, растущих в иммунокомпетентных мышах по сравнению с иммунодефицитными, указывает на потенциальную способность такого индуктора запускать ICD. Однако такая схема эксперимента не позволяет различить индукцию ICD и иммуностимуляцию, не связанную с ICD. Некоторые противоопухолевые препараты – доцетаксел, цисплатин, гемцитабин и др. – не вызывают ICD, однако опосредуют иммуномодулирующие эффекты в микроокружении опухоли, напрямую воздействуя на популяции иммунных клеток. Хотя такие иммуномодулирующие эффекты важны для максимальной эффективности терапии в клинике, они не связаны с индукцией ICD [55,121].



Рис. 4. Классическая схема противоопухолевой вакцинации опухолевыми клетками, обработанными потенциальным индуктором ICD с последующей ревакцинацией живыми опухолевыми клетками того же типа.

Равноценным подходом к оценке ICD *in vivo* в иммунокомпетентных сингенных системах может быть оценка роста опухоли, локализованной дистантно от обрабатываемого опухолевого образования при использовании локально направленного ионизирующего излучения или внутриопухолевой доставки терапевтических агентов [122]. Такой подход также эффективен, если опухоль недоступна для направленной терапии, но доступна только для цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), например, при метастазах в головном мозге у пациента, получающего химиотерапевтические препараты, которые не пересекают гематоэнцефалический барьер [123].

Модели так называемой «скрытой реакции», то есть регрессии опухолевых поражений, находящихся далеко от места обработки ионизирующим излучением первичного опухолевого очага у пациентов, оказались очень полезными в этой ситуации [124].

Для моделирования и оценки эффекта ICD иммунокомпетентным мышам либо прививают опухолевые клетки подкожно в двух и более отдаленных друг от друга местах, либо трансплантируют опухолевые клетки, склонные к метастазам, для получения пальпируемых подкожных опухолей или опухолей с отдаленными метастазами [122,125]. В обеих моделях только один из опухолевых узлов получает ионизирующее излучение (часто в присутствии иммуностимулирующего агента, который не оказывает системного эффекта самостоятельно). Эффективность данной схемы оценивается по динамике роста необлученного опухолевого узла или наличию метастазов, соответственно. Также учитывается общая выживаемость животных и активация адаптивного иммунитета путем оценки популяций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов [122,125,126]. Мышам, у которых произошло уменьшение, как облученных так и необлученных опухолей, можно повторно трансплантировать опухолевые клетки того же типа через 30-40 дней после исчезновения опухоли для подтверждения специфичности противоопухолевого иммунного ответа [127]. Аналогичным образом, можно использовать различные типы клеток для генерации первичных и вторичных поражений, чтобы убедиться, что эффект вакцинации, создаваемый индуктором ICD, является антиген-специфическим [128]. Наконец, модели одновременной интракраниальной и экстракраниальной трансплантации опухолевых клеток были использованы для оценки способности сфокусированного ионизирующего излучения, направленного на экстракраниальные опухолевые узлы, и системного введения химиотерапевтических агентов, которые не могут проникнуть через гематоэнцефалический барьер, вызывать противоопухолевый иммунный ответ в отношении модельных опухолей мозга. В этих моделях наблюдали стимуляцию транспорта цитотоксических Т-клеток в интракраниальные опухолевые узлы [129].

1.5. Препараты, вызывающие иммуногенную клеточную гибель

1.5.1. Химиотерапевтические препараты

Впервые индукция иммуногенной клеточной гибели была показана для препарата антрациклинового ряда – доксорубина [4]. Для некоторых других химиотерапевтических препаратов также была показана способность к индукции ICD [29,30,130,131], часть из которых представлена в таблице 2.

Таблица 2. Химиотерапевтические препараты, вызывающие иммуногенный апоптоз

Химиопрепараты	Типы опухолевых клеток	Признаки индукции ICD, DAMPs	Эффективность вакцинации, %
Антрациклины (доксорубин, даунорубин, идарубин), липосомы с доксорубином [4,132]	Карцинома кишечника мыши CT26	Экспозиция CRT, стресс ЭПР, фосфорилирование eIF2 α , высвобождение HMGB1, секреция АТФ	Доксорубин – 80% Даунорубин – 35% Идарубин – 45%
Оксалиплатин [29,133–135]	Карцинома кишечника мыши CT26, рак толстой кишки человека RKO и HCT116	Экспозиция CRT, высвобождение HMGB1	Оксалиплатин – 80%
Ингибиторы микротрубочек (колхицин, CMQ, FMQ, нокодазол, эпотилон В, таксотер) [130,131]	Карцинома кишечника мыши CT26	Стресс ЭПР, экспозиция CRT, PERK-зависимое фосфорилирование eIF2 α	Нокодазол – 80%
Сердечные гликозиды (дигоксин DIG, дигитоксин DIGT) [30,136]	Фибросаркома мыши MCA205, меланома мыши B16	Экспозиция CRT, высвобождение HMGB1, секреция АТФ	DIG/DIGT + цисплатин – 70-90% DIG/DIGT + митомицин – 60- 90%

1.5.1.1. Доксорубин

Доксорубин (Рис. 5) является противоопухолевым препаратом антрациклинового ряда, широко применяемым при раке молочной железы, эндометрия, легких, простаты, лимфомах и т.д. [137]. Действие доксорубина основано на его способности связывать и ингибировать топоизомеразу II, что нарушает репарацию ДНК и ведет к апоптозу [138].

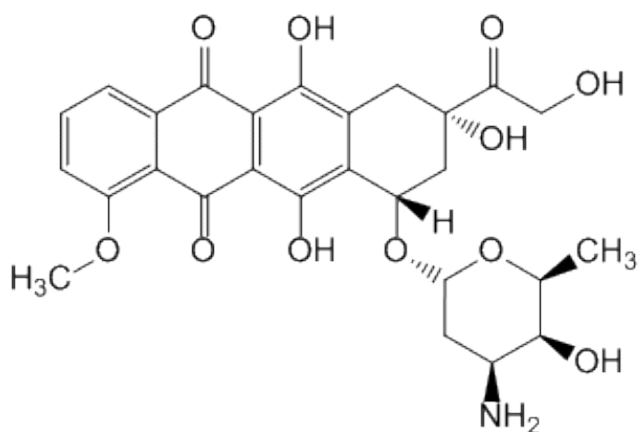


Рис. 5. Структурная формула препарата доксорубицин.

В работе [4] впервые было показано, что доксорубицин способен вызывать противоопухолевый иммунный ответ *in vivo*. Для оценки эффекта вакцинации использовали клетки карциномы кишечника мыши СТ26, предварительно обработанные доксорубицином *in vitro*. Одновременно тем же мышам в другой бок прививали подкожно живые клетки СТ26. Мыши, у которых не развились опухоли (у 30% на 120й день эксперимента), были также под иммунной защитой при последующей трансплантации живых клеток СТ26. Также исследователи показали, что эффективность противоопухолевой защиты может быть увеличена до 80%, если иммунизация доксорубицин-обработанными клетками происходит до трансплантации живых раковых клеток СТ26. Другие препараты антрациклинового ряда, такие как даунорубицин и идарубицин, также вызывали иммуногенную гибель клеток, и эффективность вакцинации для данных препаратов на 120й день после иммунизации погибающими клетками составила около 35% и 45%, соответственно.

1.5.1.2.Оксалиплатин

Оксалиплатин – противоопухолевый препарат на основе соединений платины, механизм действия которого заключается в образовании связей с пуриновыми основаниями ДНК, что запускает механизмы апоптоза [139]. Группа французских исследователей в работе [29] показала, что апоптоз, запускаемый оксалиплатином (Рис. 6) в культурах клеток рака толстой кишки RKO и HCT116 человека и клетках СТ26 мыши, носит иммуногенный характер.

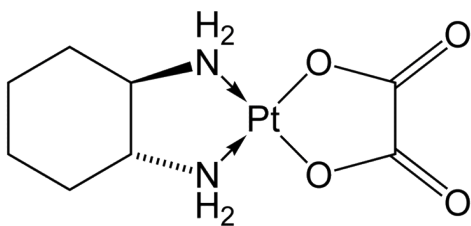


Рис. 6. Структурная формула препарата оксалиплатин.

Было показано, что оксалиплатин вызывает характерную для иммуногенного апоптоза экспозицию кальретикулина на поверхности клеточной мембраны, и оксалиплатин-индуцируемый апоптоз сопровождается увеличением содержания белка HMGB1 во внеклеточном пространстве. Клетки карциномы толстой кишки мыши СТ26, обработанные оксалиплатином и трансплантированные здоровым иммунокомпетентным мышам Balb/c, вызывали активацию специфического противоопухолевого иммунного ответа. Впоследствии, развитие противоопухолевого иммунного ответа при терапии оксалиплатином в комбинации с другими противоопухолевыми подходами и способами доставки было показано также в работах [133–135].

1.5.1.3. Ингибиторы микротрубочек

Некоторые препараты из группы ингибиторов микротрубочек, такие как колхицин и его аналоги CMQ (2-(3-хлорфенил)-6,7-метилendiоксихинолин-4-он), FMQ (2-(3-фторфенил)-6,7-метилendiоксихинолин-4-он), способны вызывать иммуногенную гибель клеток. В работе [130] была показана способность агентов, нарушающих полимеризацию микротрубочек (MDAs), например, колхицина (Рис. 7), вызывать иммуногенный апоптоз клеток меланомы мыши В16. Также индукция ICD была показана для нокодазола, эпотилона В, таксотера, которые вызывали экспозицию кальретикулина, стресс ЭПР, в том числе PERK-зависимое фосфорилирование eIF2 α на модели клеток карциномы кишечника СТ26. Однако способность вызывать эффективный противоопухолевый ответ *in vivo* была показана только для клеток СТ26, обработанных нокодазолом. Иммунизация клетками, обработанными нокодазолом, защищала мышей от последующих инъекций живых клеток СТ26 (до 80%) [131].

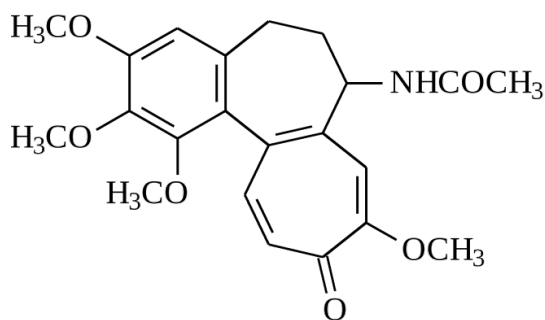


Рис. 7. Структурная формула колхицина.

Также было установлено, что лизаты раковых клеток, обработанных колхицином, в смеси со специально подготовленными дендритными клетками, могут формировать противоопухолевый иммунитет у мышей. Было отмечено заметное увеличение активности лимфоцитов под действием вакцин на основе дендритных клеток, активированных раковыми клетками после обработки колхицином [130].

1.5.1.4. Сердечные гликозиды

В 2012 году исследователи из Франции обнаружили, что еще один тип соединений – сердечные гликозиды: дигоксин и дигитоксин, способны индуцировать иммуногенный апоптоз *in vitro* (Рис. 8) [30]. Обычно эти соединения используют для лечения сердечной недостаточности и повышения работоспособности миокарда [140].

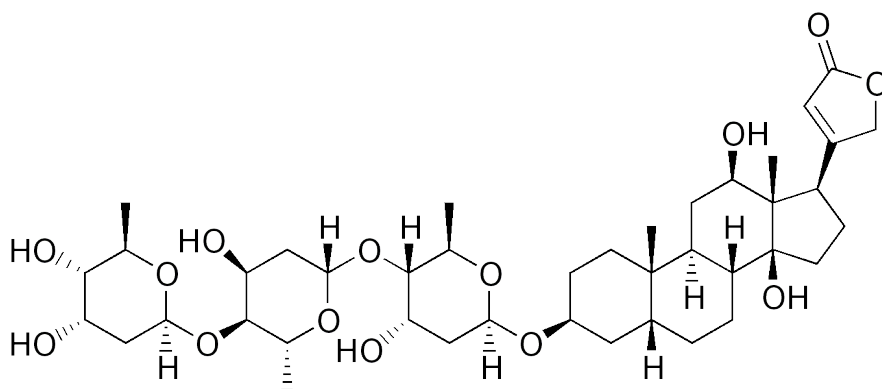


Рис. 8. Структурная формула препарата дигоксин.

В работе [30] было показано, что сердечные гликозиды стимулируют все три необходимых маркера для отнесения клеточной гибели к иммуногенному типу: экспонирование кальретикулина на поверхность клетки, секрецию АТФ и выход негистонового ядерного белка HMGB1. Для исследования способности индуцировать противоопухолевый иммунный ответ клетки фибросаркомы мыши MCA205 инкубировали с сердечными гликозидами, после чего

погибающие клетки трансплантировали подкожно иммунокомпетентным мышам. Через неделю животным перевивали интактные клетки МСА205. В качестве положительного контроля использовали клетки МСА205, обработанные доксорубицином и митомицином. У мышей, которым прививали опухолевые клетки, обработанные дигоксином или дигитоксином, развивались опухоли в месте первичной инъекции. Таким образом, дигоксин и дигитоксин не смогли вызвать эффективную противоопухолевую иммунную реакцию, хотя *in vitro* они индуцировали активацию маркеров ICD. Индукцию ICD под действием дигоксина также исследовали в комбинации с цисплатином, который не способен самостоятельно вызывать ICD. Было показано, что комбинация дигоксина и цисплатина усиливает экспозицию кальретикулина на внешнюю мембрану по сравнению с монообработкой клеток меланомы мыши В16 цисплатином. Стандартный анализ эффекта вакцинации показал, что в месте трансплантации живых опухолевых клеток образовывался опухолевый узел, однако скорость роста опухолей была значительно ниже в группе, которой трансплантировали клетки, обработанные комбинацией препаратов, по сравнению с контрольной группой или монообработкой [43]. Таким образом, не все препараты, индуцирующие иммуногенный тип гибели клеток *in vitro*, способны индуцировать противоопухолевый иммунный ответ *in vivo*.

1.5.2. Пептиды с противоопухолевой активностью

1.5.2.1. Пептид LTX-315

Для некоторых пептидов, обладающих противоопухолевой активностью, также показана способность к индукции ICD. Например, такой катионный амфифильный синтетический пептид LTX-315 пермеабиллизует внутреннюю митохондриальную мембрану, вызывая некротическую гибель клеток [141]. Было показано, что LTX-315 является мощным индуктором противоопухолевого иммунного ответа при введении в опухоли иммунокомпетентных мышей. Внутритропухолевые инъекции LTX-315 приводят к полному исчезновению опухолей меланомы мышей В16, причем такие мыши были устойчивы к последующим инъекциям живых опухолевых клеток В16. Таким образом, было сделано предположение, что LTX-315 способен вызывать иммуногенную клеточную гибель. Было показано, что данный пептид вызывает активацию всех основных молекулярных маркеров ICD (экспозицию CRT, высвобождение HMGB1 и АТФ, интерфероновый ответ) без активации клеточных каспаз, что говорит о пути гибели, отличной от апоптоза [142,143]. При введении в опухоль LTX-315 вызывает обширный некроз, сопровождающийся инфильтрацией иммунных клеток (CD3⁺ клетки). Таким образом,

противоопухолевые агенты, вызывающие некротическую гибель клетки, также могут являться индукторами ICD [143].

1.5.2.2. Противоопухолевый пептид RT53 класса CPP

Еще один синтетический противоопухолевый пептид RT53, относящийся к классу CPP (белки с высокой проникающей способностью), вызывающий гибель опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*, способен индуцировать ICD. Интересно, что цитотоксические эффекты пептида RT53 обусловлены в основном нерегулируемым некрозом, таким образом, RT53 вызывает апоптоз-независимую иммуногенную клеточную гибель [144]. Было показано, что RT53-обработанные клетки меланомы B16F10, обработанные RT53, обладали эффектом противоопухолевой вакцинации при повторных трансплантациях живых опухолевых клеток B16F10 иммунокомпетентным мышам, однако всего 25% мышей не имели опухолей в месте повторной трансплантации [145].

Формирование противоопухолевого иммунитета при действии пептида RT53 также было подтверждено на мышах C57BL/6 при профилактической вакцинации RT53-обработанными клетками фибросаркомы MCA205, что выражалось только в снижении темпа роста опухолей, но не приводило к полному отсутствию опухоли в месте повторной трансплантации. Однако иммуногенный эффект также был замечен при терапевтическом введении RT53 в опухоли MCA205. Было показано, что серия внутриопухолевых инъекций RT53 ведет к полной деструкции опухолей у 75% мышей. Иммуногистохимический анализ показал массивную инфильтрацию CD3⁺ лимфоцитами через 96 часов после инъекций, что также показывает иммуногенную составляющую действия RT53 [144].

1.5.2.3. RIG-I-подобные хеликазы

Среди пептидных индукторов ICD также можно отметить RIG-I-подобные хеликазы. В отличие от LTX-315 и RT53, RIG-подобные хеликазы вызывают гибель по пути апоптоза опухолевых клеток с признаками иммуногенной клеточной гибели после обработки опухолевых клеток поджелудочной железы мыши Panc02 белком RIG1. Помимо стандартного набора маркеров ICD было отмечено увеличение продукции IFN I и некоторых провоспалительных цитокинов. Погибающие опухолевые клетки, обработанные RIG-I-подобными хеликазами, вызывали активацию дендритных клеток (ДК), опосредованную IFN I из опухолевых клеток, тогда как передача сигналов TLR, RAGE или инфламмасом не требовалась для активации ДК. Важно отметить, что CD8a⁺ ДК из селезенки эффективно поглощали апоптотический опухолевый

материал после обработки RIG-1-подобными хеликазами и перекрестно представляли опухоль-ассоциированные антигены наивным CD8⁺ Т-клеткам. В экспериментах по профилактической вакцинации шесть из восьми мышей, вакцинированных обработанными геликазами опухолевыми клетками Panc02, были устойчивы к последующей трансплантации опухолевых клеток того же типа, а еще одна мышь показала задержку роста опухоли [146].

1.5.3. Онколитические вирусы

Способность некоторых вирусов уничтожать опухолевые клетки путем прямого лизиса, выработкой токсичных для раковых клеток белков или индукцией противоопухолевого иммунитета была обнаружена более 100 лет назад [147]. На основании этого факта онколитическими вирусами были названы вирусы, прямым или непрямым способом уничтожающие опухолевые клетки в ходе своей репликации.

С развитием генно-инженерных технологий стало возможно создание вирусов с модифицированными свойствами, что расширяет их терапевтическое значение. Терапия с применением онколитических вирусов имеет ряд преимуществ перед стандартными методами противораковой терапии. Показано, что терапия онколитическими вирусами эффективна при лечении метастазирующих опухолей, которые являются неоперабельными и/или плохо поддаются радиотерапии и обычной химиотерапии, а также в отношении лекарственно-устойчивых опухолей [148]. К настоящему времени различные онколитические вирусы успешно прошли испытания в доклинических и клинических исследованиях для лечения опухолей различного гистологического происхождения. Среди них в борьбе с онкологическими заболеваниями значительное внимание уделяют вирусам семейства *Poxviridae* (поксвирусы) (Рис. 9). В обзорной статье [149] было показано, что рекомбинантный вирус осповакцины *Реха-Vес*, экспрессирующий GM-CSF человека, способен вызывать противоопухолевую иммунную реакцию *in vivo*. В настоящее время препарат вируса *Реха-Vес* проходит третью фазу клинических испытаний, сравнивающую комбинацию *Реха-Vес* и сорафенибом с монотерапией сорафениба у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой без предшествующей системной терапии [150], что подтверждает его высокий противоопухолевый потенциал.

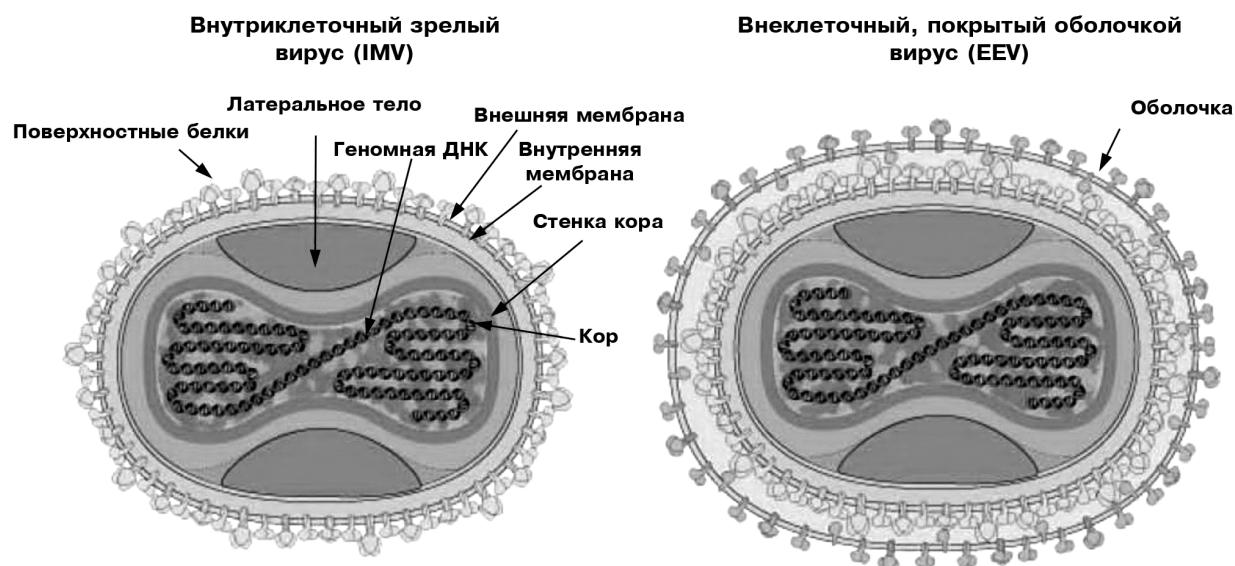


Рис. 9. Морфология вириона поксвирусов [151].

1.5.3.1. Онколитические вирусы как индукторы ICD

Недавние исследования продемонстрировали, что противоопухолевый иммунитет играет важную роль в общей эффективности онколитической виротерапии, что и усиливает ее эффективность [152]. Например, в случае онколитических реовирусов наличие противоопухолевого иммунитета существенно для общей эффективности онколитической виротерапии, а возможно, более важно, чем прямой лизис опухолевых клеток [153]. Для некоторых немодифицированных онколитических вирусов, например, вируса болезни Ньюкасла, вируса кори, вируса коксаки В3, вируса осповакцины (VV или BOB) было показано, что гибель зараженных клеток происходит с активацией типичных маркеров ICD [154–156]. В работе [157] было проведено сравнение способности аденовируса человека, вируса леса Семлики (ВЛС) и вируса осповакцины дикого типа вызывать иммуногенную клеточную гибель. Было обнаружено, что все три вируса стимулируют высвобождение маркеров ICD, активацию и созревание дендритных клеток, однако только SFV-инфицированные опухолевые клетки вызвали созревание Т-хелперов типа 1 (Th1) и индуцировали антиген-специфическую активацию Т-клеток. Было показано, что ДК, фагоцитирующие опухолевые клетки, инфицированные вирусом осповакцины, не могут индуцировать Т-клеточные ответы. С другой стороны, аттенуированные VVs активировали пути STING и Batf3 в ДК и индуцировали мощный противоопухолевый иммунитет [158]. Таким образом, модификация генома BOB может быть возможной стратегией преодоления иммуносупрессии, характерной для BOB дикого типа. Наиболее изученным терапевтическим рекомбинантным вирусом осповакцины является JX-594 (Pexa-Vec, Jennerex

Biotherapeutics), который показал многообещающие результаты в клинических испытаниях [159]. Парк с коллегами провел успешные испытания JX-594 при лечении пациентов с устойчивым первичным или метастатическим раком печени. Они показали, что внутриопухолевые инъекции поксвирусов способны вызывать значительную регрессию опухоли [160]. В работе [156] было показано, что JX-594 вызывает экспозицию кальретикулина, высвобождение HMGB1 и активацию/созревание дендритных клеток при инкубации с клетками меланомы человека, обработанными JX-594. На основе вируса осповакцины также были разработаны несколько рекомбинантных вирусов, несущих дополнительные вставки цитотоксических белков, например вирус VV-GMCSF-Lact, несущий делеции в генах тимидинкиназы и ростового фактора вируса и кодирующий GM-CSF человека и проапоптотический белок лактаптин [20].

Недавно было показано, что терапия глиомы вирусами болезни Ньюкасла индуцирует адаптивный иммунный ответ в отношении клеток глиомы, что является частью противоопухолевого ответа [161]. Подобные эффекты были также показаны для рекомбинантного аденовируса, несущего трансген CD-40, который вызывает апоптоз опухолевых клеток и запускает некоторые иммунные механизмы, в том числе Т-хелперный ответ 1 типа, который ведет к активации цитотоксических Т-клеток и снижению иммуносупрессии [162].

1.5.3.2. Недостатки виротерапии

Как и для других подходов противоопухолевой терапии, остаётся ряд проблем в иммунотерапии рака онколитическими вирусами. Сюда можно отнести относительную неэффективность доставки онколитических вирусов к опухолевым узлам и отдалённым метастазам, а также низкий уровень репликации вируса в пределах массы опухоли. На поздних стадиях рака микроокружение опухоли часто оказывает сильное иммуносупрессивное действие и подавляет активность лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TILs), как собственных, так и при CAR-Т-клеточной терапии [152]. Ещё одной проблемой при использовании онколитических вирусов является сама природа вирусов, против которой настроена иммунная система человека, в результате чего они могут быть уничтожены иммунной системой, прежде чем будут доставлены к опухоли. Это связано с тем, что в организме в ответ на введение вируса быстро образуются специфические нейтрализующие антитела, что сопровождается быстрым удалением вирусов из кровотока, особенно при повторных введениях. В сыворотке крови пациентов, которым вводили онколитические вирусы, обнаруживают нейтрализующие антитела против этих вирусов. В дальнейшем, такие циркулирующие в крови антитела могут практически полностью инактивировать вирус при внутривенных инъекциях [163]. Этот барьер можно частично

преодолеть, вводя вирус непосредственно в опухоль. В настоящее время находится в разработке метод «Троянского коня», который предполагает внутривенное введение предварительно зараженных вирусом восприимчивых клеток-носителей. Иммунная система организма не распознает вирусы, находящиеся внутри носителей, что позволяет зараженной клетке-носителю проникнуть в опухоль, где вирус реплицируется и заражает соседние опухолевые клетки [164]. В последнее время в доклинических экспериментах для доставки аденовирусов в мозг для лечения глиобластомы применяют нейральные стволовые клетки, зараженные вирусом, которые оказались более эффективными, чем суспензия вируса или зараженные мезенхимальные стволовые клетки [165]. Кроме клеток в качестве носителей используют и различные химические вещества для «обёртывания» вируса, например, полиэтиленгликоль. Также использование некоторых онколитических вирусов ограничено наличием у пациентов предсуществующего иммунитета. Для преодоления этого барьера применяют так называемые вирусы-химеры, у которых гены поверхностных белков, несущих эпитопы (рецепторы для антивирусных антител), заменены на таковые менее распространенных серотипов [153,164].

1.5.4. Физические способы индукции ICD

В настоящее время показано, что способностью вызывать гибель опухолевых клеток с признаками ICD обладают различные физические методы противоопухолевой терапии, такие как: ионизирующее излучение, экстракорпоральная фотохимиотерапия, фотодинамическая терапия, фотоиммунотерапия в ближнем инфракрасном диапазоне, высокое гидростатическое давление, тепловой шок, наноимпульсная стимуляция, гипертермия, облучение холодной плазмой и т.д. [55].

1.5.4.1. Радиотерапия

Радиотерапия является одним из направлений местного лечения опухолей, однако известно, что ионизирующее излучение также приводит к элиминации опухолей в отдаленных метастазах, что говорит о вовлеченности иммунной системы при применении радиации [166]. В экспериментах *in vitro* было показано, что радиотерапия способна вызывать дозозависимую гибель клеток трижды-негативной опухоли молочной железы с экспозицией CRT и высвобождением АТФ и HMGB1 [167]. Однако исследователи также отмечают, что ионизирующее излучение в режиме моно-терапии было неэффективным в клинике. *In vivo* и *in vitro* проиммуногенные эффекты, вызванные радиотерапией, часто могут быть замаскированы за счет подавляющего иммуносупрессирующего микроокружения опухоли, характерного для

солидных опухолей [168]. Тем не менее, иммуносупрессивный барьер может быть преодолен при использовании ингибиторов иммунных точек (ингибиторов, направленных на CTLA4 или PD1) для усиления местной радиотерапии, что ведет к усилению проиммуногенных эффектов ионизирующего излучения и способствуют иммуноопосредованному отторжению опухоли [126]. Для усиления иммуногенной составляющей радиотерапии также можно использовать комбинацию с клинически эффективными химиопрепаратами, вызывающими иммуногенную клеточную гибель, например, оксалиплатином или паклитакселом [167].

1.5.4.2. Гипертермия (ГТ)

Гипертермия изучается для лечения злокачественных заболеваний с 1970-х годов. В 2011 году применение ГТ до лучевой терапии было одобрено FDA для лечения пациентов с раком шейки матки. В настоящее время было показано, что тепловой шок выше 42°C (45-50°C) также способен запускать каскад ICD *in vitro* и вызывать иммуногенные эффекты на мышах. Так, профилактическая вакцинация опухолевыми клетками CT26, подвергнутыми тепловому шоку (47°C), приводила к значительному торможению роста опухоли, увеличению выживаемости вакцинированных животных, более того 30% вакцинированных мышей не имели опухолей в месте ревакцинации живыми клетками [169].

1.5.4.3. Наноимпульсная стимуляция (NPS)

Еще одним развивающимся методом противоопухолевой терапии является наноимпульсная стимуляция (NPS) злокачественных новообразований. В работе [170] исследователи показали, что воздействие наноимпульсной терапией приводит к полной регрессии слабоиммуногенной метастатической карциномы молочной железы мыши 4T1-Luc. Также интересно наблюдение, что спонтанные метастазы в отдаленные органы детектировались реже даже у тех животных, у которых опухоль не регрессировала полностью. После наноимпульсной стимуляции и регрессии опухоли все мыши были устойчивы к повторному заражению опухолевыми клетками, демонстрируя эффект, аналогичный вакцинации. Это говорит о том, что лечение NPS индуцировало противоопухолевый иммунитет, стимулировало созревание Т-клеток памяти, вело к разрушению микроокружения опухоли и снижало количество иммуносупрессорных клеток в микроокружении опухоли и крови. Также в экспериментах было показано, что клетки 4T1-Luc, обработанные NPS, высвобождали DAMPs, включая кальретикулин, HMGB1 и АТФ, и активировали дендритные клетки. Эти данные свидетельствуют о том, что NPS является мощным индуктором иммуногенной гибели клеток,

который вызывает противоопухолевый иммунитет для предотвращения отдаленных метастазов в дополнение к локальной ликвидации опухоли [170].

1.5.4.4. Холодная плазменная струя (ХПС)

Одним из новых перспективных направлений в лечении злокачественных образований является холодная плазменная струя (ХПС). В то время как тепловая (горячая) плазма, которая, обычно используется, например, для эндоскопической коагуляции тканей и разрушения тканей человека, холодная плазма может применяться без термического повреждения для обработанных тканей. Холодная плазма представляет собой ионизированный газ с температурой, близкой к температуре человеческого тела, что делает возможным ее применение в клинике. Такой возбужденный газ содержит свободные заряженные частицы, радикалы, УФ-излучение, электрические поля, которые обуславливают биологические эффекты холодной плазмы. При обработке плазмой формируются активные формы кислорода и азота, включая О, О₃, ОН, Н₂О₂, НО₂, NO, ONOOH и многие другие. Согласно современным представлениям, именно активные формы кислорода и азота (RONS), генерируемые холодной плазменной струей (ХПС), вызывают окислительное повреждение в клетке, что приводит к её гибели [171]. Холодная плазма нашла широкое применение в практике, включая дезинфекцию, заживление ран, лечение атопической экземы, зуда, боли, дисфункции кожного барьера и рубцов [172]. Показано, что ХПС способствует ускорению реэпителизации, механическому укреплению кожи, ангиогенезу, синтезу коллагена, а также сокращению длительности воспалительных процессов [173]. В последнее время все большее внимание уделяется потенциальному использованию ХПС для лечения рака. Было показано, что обработка холодной плазмой ведет к избирательной гибели клеток меланомы [174], опухолей кишечника [175], легкого [22,23], поджелудочной железы [176], желудка [177], молочной железы [178], глиобластомы [179] *in vitro*. В настоящее время применяют два подхода: прямую обработку ХПС, когда поток плазмы взаимодействует со средой, покрывающей монослой опухолевых клеток, и непрямую обработку, при которой осуществляется обработка чистой культуральной среды для последующей инкубации с клетками. Большая часть исследований посвящена прямой обработке опухолевых клеток ХПС, однако в настоящее время появляется много сообщений об использовании среды или других жидкостей, активированных холодной плазмой [176,177]. Эффективность противоопухолевого действия холодной плазмы на мышей с трансплантированными опухолями также была показана для целого ряда исследований [180–182].

Воздействие холодной плазмы на опухолевые клетки также запускает иммуногенную клеточную гибель. Показано, что гибель клеток меланомы Hmel1 MM и опухоли поджелудочной

железы PANC-1 под воздействием культуральной среды, облученной ХПС, сопровождается экспозицией кальретикулина и высвобождением АТФ, что предполагает потенциальное использование активированных плазмой сред в качестве индуктора гибели клеток через активацию иммунной системы [183]. Было установлено, что даже фосфатный буфер (PBS), облученный ХПС, способен запускать каскад иммуногенной клеточной гибели *in vitro* [184]. В статье [21] было показано, что прямая обработка опухолевых клеток ХПС *in vitro* также вызывает высвобождение DAMPs, характерных для ICD, и вакцинация мышей клетками СТ26, облученными ХПС, вела к тому, что у 30% мышей не развивалась опухоль в месте повторного введения живых опухолевых клеток, а 90% опухолей, развившихся в группе вакцинированных мышей, были меньше, чем средний размер опухолей в контрольной группе. Также было показано, что лечение опухолей СТ26 при помощи холодной плазменной струи усиливало инфильтрацию опухоли антигенпрезентирующими клетками, а также увеличивало уровень внеклеточного CRT и HMGB1 [21].

1.5.4.5. Другие физические способы индукции ICD

Другие физические методы воздействия на опухоль, способные вызывать ICD, также описаны в литературе: фотоиммунотерапия, высокое гидростатическое давление, фотодинамическая терапия, ультрафиолетовое излучение. В основном исследователи показывают запуск каскада ICD *in vitro* с подтверждением высвобождения DAMPs и моделированием презентации антигенов дендритными клетками при взаимодействии с опухолевыми антигенами [185–188]. Например, добавление к дендритным клеткам (ДК) опухолевых клеток, подвергнутых высокому гидростатическому давлению, приводило к увеличению скорости фагоцитоза ДК, повышению уровня поверхностных ко-стимуляторных молекул, характерных для зрелых дендритных клеток, таких как: CD83, CD86 и главного комплекса гистосовместимости HLA-DR, и высвобождению цитокинов IL-6, IL-12p70 и TNF- α . При инкубации таких дендритных клеток, активированных опухолевыми клетками после воздействия высокого гидростатического давления с аутологичными наивными CD4⁺ Т-клетками, происходило созревание опухолеспецифических Т-клеток [186].

Таким образом, методы физико-химического воздействия на опухоли также можно рассматривать в качестве индукторов ICD и оценивать вклад противоопухолевого иммунного ответа в эффективность такой терапии у пациентов.

1.6. Подавление противоопухолевого иммунного ответа при индукции ICD

Мишенями для распознавания при иммунном ответе на опухоль могут служить опухолеассоциированные антигены, измененные относительно нормальных клеток, комбинации поверхностных белковых ансамблей и их количества. Некоторые из генетических aberrаций в опухолевых клетках (мутации, амплификации генов, хромосомные делеции и транслокации) приводят к экспрессии измененных молекул или сверхэкспрессии неизмененных молекул. Среди известных опухоль-ассоциированных антигенов можно назвать, например, α -фетопротеин, который в норме отсутствует у взрослого организма, но продуцируется опухолевыми клетками печени. Тем не менее, слабым звеном в этой концепции является слабая иммуногенность специфических опухолевых антигенов, которые подвергаются процессингу и распознаванию иммунной системой [73].

Наряду с такими сигналами, как кальретикулин, которые привлекают клетки с фагоцитарной активностью, опухолевые клетки способны экспонировать на своей поверхности молекулы, являющиеся антагонистами сигналов «съешь меня» (молекулы CD47), что подавляет кальретикулин-опосредованный фагоцитоз. Взаимодействие CD47 с рецептором SIRP α на дендритных клетках служит сигналом, ингибирующим фагоцитоз [189]. Активация перечисленных механизмов, вероятно, может мешать реализации каскада ICD и защищать опухолевые клетки от атаки иммунной системы.

Недостаточная эффективность химиопрепаратов, способных активировать ICD *in vivo*, может также быть следствием общего иммуносупрессорного действия химиотерапии на клетки-предшественники в костном мозге. Подавление функций костного мозга является одним из распространенных дозозависимых побочных эффектов антинеопластической химиотерапии, включая тромбоцитопению, лейкопению и лимфопению [190]. Химиотерапия также может усиливать повреждение клеток костного мозга и стимулировать рост некоторых злокачественных клеток, что накладывает определенные ограничения на клиническое применение таких препаратов [191]. Несмотря на индукцию гибели клеток по иммуногенному типу традиционными химиопрепаратами, например, антрациклинами, на уровне организма такие химиопрепараты вызывают генерализованные иммуносупрессивные эффекты. У 70% пациентов, получающих курс терапии оксалиплатином, в результате миелосупрессии развивается тромбоцитопения [192,193]. Доксорубин также вызывает лейко- и тромбоцитопению [194,195]. Данные доклинических и клинических исследований свидетельствуют о том, что вызываемый доксорубином или препаратами платины противоопухолевый иммунный ответ часто неэффективен для ингибирования роста опухоли пациента из-за различных сопутствующих механизмов отрицательной обратной связи во время лечения, которые

усиливают экспрессию генов, связанных с иммуносупрессией, таких как PD-L1, CD47 и индоламин-2,3-диоксигеназа-1 [196–198].

1.6.1. Преодоление иммуносупрессии, вызванной микроокружением опухоли

Помимо эндогенных факторов, которые активируют иммунную систему, существует несколько механизмов супрессии иммунного ответа с помощью ингибирующих сигналов. Опухоль в процессе прогрессии приобретает ряд свойств, которые позволяют ей ускользать от иммунной системы [75]. Микроокружение опухоли препятствует проникновению инфильтрирующих лимфоцитов, ограничивая питательные ресурсы и выделяя ингибиторные сигналы. В развитии иммуносупрессивного микроокружения опухоли важное место занимают плазматоидные дендритные клетки, опухоль-ассоциированные макрофаги (ОАМ) и миелоидные супрессорные клетки (МСК), секретирующие противовоспалительные цитокины и экспрессирующие иммуносупрессорные метаболические ферменты, такие как: индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS), индоламин 2,3-диоксигеназа (ИДО), триптофан 2,3 диоксигеназа (ТДО) и аргиназа [13]. ИДО и ТДО являются основными ферментами в кинурениновом пути метаболизма триптофана. Поступая в организм с пищей, триптофан расходуется для синтеза белков, а остаточные количества метаболизируются до кинуренина с участием ИДО и ТДО [199]. Уменьшение количества триптофана под действием ИДО1 и одновременное увеличение уровня его метаболитов стимулирует иммуносупрессивные свойства опухоли и ее микроокружения преимущественно за счет развития толерантности АПК, иммунотолерантности Т-клеток и гибели иммунных клеток [12]. Такое подавление Т-клеточного метаболизма может ингибировать эффекторную активность Т-клеток, одновременно стимулируя регуляторные Т-клетки и выступая в качестве барьера для эффективной иммунотерапии. Для опухолей характерно быстрое истощение питательных веществ, например, глюкозы, и накопление продуктов метаболизма, таких как лактат или кинуренин, которые непосредственно ингибируют Т-клетки [200]. В качестве возможных путей преодоления иммунной толерантности используют ингибиторы ферментов, влияющих на пролиферацию иммунных лимфоцитов. Так в работе Васильевой [201] показано, что ингибиторы ИДО ослабляют резистентность опухолей по отношению к иммунной системе. Преодоление резистентности в этом случае возможно благодаря тому, что ингибиторы ИДО предотвращают формирование локального дефицита триптофана в области опухоли и, таким образом, способствуют функционированию иммунных лимфоцитов.

Заключение

Последнее десятилетие ознаменовались появлением концепции иммуногенной клеточной гибели (ICD), т.е. такой формы клеточной смерти, которая стимулирует иммунный ответ против антигенов погибающих клеток, и, в частности, раковых клеток. Эта модель была впервые предложена в контексте противораковой химиотерапии и была подкреплена клиническими данными, свидетельствующими о том, что специфический для опухоли иммунный ответ может определять эффективность противораковой терапии с использованием обычных цитотоксических препаратов. Поскольку онкологические заболевания являются одной из наиболее распространенных причин смертности трудоспособного населения во всем мире, новые подходы, направленные на улучшение методов борьбы со злокачественными новообразованиями, высоко актуальны.

В настоящее время показано, что в зависимости от инициирующего стимула гибель раковых клеток может быть иммуногенной или неиммуногенной. Иммуногенная клеточная гибель включает изменения в составе клеточной поверхности, а также высвобождение растворимых медиаторов, происходящие в определенной временной последовательности. Такие сигналы действуют на ряд рецепторов, экспрессируемых дендритными клетками, чтобы стимулировать презентацию опухолевых антигенов Т-клеткам. Таким образом, можно утверждать, что ICD представляет собой важный путь активации иммунной системы против опухолевых клеток, который, в свою очередь, определяет долгосрочный успех противораковой терапии. Неоптимальные схемы лечения (неспособные вызвать ICD), селективные изменения в раковых клетках (препятствующие выделению иммуногенных сигналов в процессе ICD) или дефекты в иммунных эффекторах (не позволяющие распознавать ICD иммунной системой) могут способствовать терапевтической неудаче. Поэтому, определение типа гибели, вызываемого противоопухолевыми схемами лечения, и их коррекция, направленная на индукцию гибели клеток опухоли именно по иммуногенному типу, рассматривают как возможность улучшить результат противоопухолевой терапии.

Исследование индукторов ICD различной природы позволило установить основные молекулярные события, позволяющие отнести гибель клеток именно к ICD. К этим событиям прежде всего относят экспозицию кальретикулина и белка теплового шока HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану клетки и высвобождение HMGB1 и АТФ в межклеточное пространство.

Поиск возможных путей предотвращения рецидивов новообразований после удаления опухолей возвращает исследователей к концепции «противоопухолевой вакцинации». Клетки опухоли, погибающие по пути ICD под действием терапевтических агентов, имитируют

«вакцинацию» организма против опухолевых антигенов, что позволяет надеяться на предотвращение развития метастазов. В то же время, иммунные факторы, необходимые для эффективного противоопухолевого надзора и приобретения долгосрочного противоопухолевого иммунитета при применении различных индукторов ICD, являются предметом изучения в каждом отдельном случае.

Несмотря на огромные усилия, направленные на определение значимых характеристик ICD, современные знания еще далеки от совершенства. Нерешенными остаются вопросы: что именно делает определенную модальность клеточной гибели иммуногенной, и какие факторы наиболее существенно влияют на иммуногенность погибающей клетки. Кроме того, поскольку большинство исследований ICD проводятся на раковых клетках и в моделях вакцинации, было бы крайне важно протестировать ICD моделях опухолей, приближенных к реальным условиям: с использованием ортотопических моделей опухолей человека у генно-модифицированных животных. Следует также отметить, что, хотя развитие ICD было показано при использовании модельных опухолей у животных в доклинических исследованиях, применение индукторов ICD у пациентов менее убедительно. Поэтому для изучения потенциала индукции ICD в клинических условиях необходимы дальнейшие исследования на пациентах. В частности, выявление биомаркеров, позволяющих стратифицировать пациентов в зависимости от возможной пользы применения у них индукторов ICD, позволит более полно раскрыть потенциал ICD. В любом случае, применение индукторов ICD расширяется, и необходимо уделять особое внимание дозировке и режимам лечения, чтобы избежать иммунотоксичности и возникновения резистентности.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы и оборудование

2.1.1. Реактивы и материалы

В работе были использованы следующие реактивы: натрий-фосфатный буфер PBS (Amresco, США), ростовая среда L15 (GIBCO, Life Technologies, UK), ростовая среда IMDM (GIBCO, Life Technologies, UK), ростовая среда DMEM (Invitrogen, UK), ростовая среда 199 (GIBCO, Invitrogen, США), ростовая среда RPMI (GIBCO, Invitrogen, США), эмбриональная бычья сыворотка FBS (GIBCO, Invitrogen, США), GlutaMAX™ (Invitrogen, France), Tryple-Express (GIBCO, Invitrogen, США), раствор антибиотиков-антимикотиков (GIBCO, Life Technologies, США), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (MTT) (Sigma-Aldrich, США), Trizol® (Thermo, США), агароза (ДиаМ, Россия), бромистый этидий (MP Biomedicals, США), акриламид (Медиген, Россия), N,N'-метиленабисакриламид (ICN Biomedicals Inc., США), TEMED (Helicon, Россия), персульфат аммония (Gerbu, Германия), белки с известной молекулярной массой (Thermo Scientific, Литва), ЭДТА (Gerbu, Germany), глицин (MP Biomedicals, Франция), SDS (ICN Biomedicals Inc., США), 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол (Трис) (Gerbu, Германия), HCl (Реахим, Россия), β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, Германия), бромфеноловый синий (Sigma-Aldrich, США), ксиленианол (Sigma-Aldrich, США), ингибитор протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, США), ингибитор фосфатаз Pierce Phosphatase Inhibitor (Thermo, США), бычий сывороточный альбумин BSA (ДиаМ, Россия), хлорид натрия (Gerbu, Германия), уксусная кислота (Реахим, Россия), краситель кумасси (Fermentas, Life Sciences, Литва), глицерин (Panreac, Испания), нитроцеллюлозная мембрана (Bio-Rad, США), Transfer Buffer NuPAGE (Life Technologies, США), субстрат пероксидазы WesternSure™PREMIUM Chemiluminescent Substrate (LI-COR, США), гепарин (Белмедпрепараты, Россия), CellTracker™ Green CMFDA Dye (Invitrogen, США), CellTracker™ Red CMTPX Dye (Invitrogen, США), этиловый спирт (Кемеровская фармацевтическая фабрика, Россия), раствор Рингера (Медполимер, Россия), этилпируват (Sigma, США), йодид пропидия (BD, США), 1-метилтриптофан (Sigma, США), метилцеллюлоза (Реахим, Россия), Tween 80 (Sigma, США), Histopaque®1083 (Sigma-Aldrich, США), 2,2,2-трибромэтанол (Sigma, США), 2-метилбутанол (Sigma, США), 10% забуференный формалин Histosafe (Biovitrum, Россия), монтирующая среда для флуоресцентной иммуноцитохимии Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich, США), рекомбинантный аналог лактапина RL2 был получен и очищен,

как было показано ранее [202], рекомбинантные вирусы осповакцины VV-GMSCF-dGF, VV-GMSCF-Apo и VV-GMSCF-Lact были предоставлены д.б.н. Кочневой Г.В. (ГНЦ «Вектор»).

Наборы и смеси: набор для проведения полимеразной цепной реакции MasterMix RT SyberGreen (Biolabmix, Новосибирск), набор для измерения концентрации общего белка в лизатах Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США), набор для проведения Вестерн-блота Ibind Solution Kit (Life Technologies, США), набор для детекции АТФ ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement (Promega, США), набор для изучения апоптоза с Annexin V FITC, PI (BD Biosciences Pharmingen, США), набор для детекции интерферона альфа мыши IFN alpha Mouse ELISA Kit (Invitrogen, США), набор для определения концентрации цитокинов ELISA Array Kit MEM-004A (Qiagen, США), набор для детекции HMGB1 IBL ELISA (IBL International, Германия),.

Первичные антитела: моноклональные антитела IgG кролика к белку человека кальретикулин (abcam®, Англия), моноклональные антитела IgG кролика к белку человека HMGB1 (abcam®, Англия), моноклональные антитела IgG мыши к белку человека GAPDH (abcam®, Англия), моноклональные антитела IgG мыши к белку человека HSP70 (RSD, США), моноклональные антитела IgG кролика или мыши к белку мыши, конъюгированные с флуорохромами: CD45-PerCP/Cy5.5 (Sony, США), CD19-APC (Sony, США), CD3-FITC (Sony, США), CD11b- PE-Cy7 (abcam®, Англия), CD11c-PE (Sony, США), CD80-APC (Sony, США), МНС II-FITC (Sony, США).

Вторичные антитела: антитела козы к Fab фрагментам IgG кролика, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 555 (abcam®, Англия), антитела козы к Fab фрагментам IgG мыши, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 555 (abcam®, Англия), антитела мыши к Fab фрагментам IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Биосан, Россия), антитела кролика к Fab фрагментам IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Биосан, Россия),

Материалы для культивирования клеток: флаконы для культивирования с площадью поверхности 25 см² (TPP, Швейцария), флаконы для культивирования с площадью поверхности 75 см² (TPP, Швейцария), 6-луночные планшеты для культивирования с площадью лунки 0.9 см² (TPP, Швейцария), 96-луночные планшеты для культивирования (TPP, Швейцария), 96-луночные белые непрозрачные планшеты для ИФА (Costar, США), предметное стекло с 4 лунками для культивирования (Eppendorf, США), вакутейнеры с гепарином (BD, США), планшеты E-Plates L8 для мониторинга в режиме реального времени на приборе iCELLigence (ACEA Biosciences Inc., США), клеточное сито-фильтр (BD, США).

2.1.2. Оборудование

Термостат (BIOSAN, Латвия), центрифуга Minispin (Eppendorf, Германия), центрифуга с охлаждением 5415 (Eppendorf, Германия), центрифуга для больших объемов 5810 (Eppendorf, Германия), CO₂-инкубатор Hera Cell 150 (Heraeus, Германия), счетчик клеток LUNA II™ (Logos, США), многоразовые слайды для подсчета клеток LUNA Reusable Slides (Logos, США), источник тока для электрофореза (ДНК-технология, Россия), низкотемпературный холодильник (GFL, Германия), шейкер-инкубатор (BIOSAN, Латвия), шейкер (Scientific Industries, США), спектрофотометр NanoVue Plus (GE Healthcare, США), амплификатор IQ™5 BioRad, США), многоканальный спектрофотометр (Biochrom, England), спектрофотометр SmartSpec Plus (BioRad, США), проточный цитофлуориметр FACS Canto II (BD, США), гель-документирующая система Gel Doc XR⁺ Imager (BioRad, США), камера для электропереноса (BIO-RAD, США), источник тока для электропереноса EPS-301 (GE Healthcare, Англия), инкубатор для нитроцеллюлозной мембраны iBind (Life Technologies, США), детекторы хемилюминесценции C-Digit (LI-COR, США) и Amersham Imager 600 (GE Healthcare, США), мультифункциональный люминометр/флуориметр CLARIOstar (BMG Labtech, Германия), флуоресцентный сортировщик клеток Sony SH-800 с возможностью отбора индивидуальных клеток (Sony Biotechnology Inc, США), флуоресцентный микроскоп Axioscop 2 PLUS (Carl Zeiss, GmbH), спектрофотометр Apollo LB912 (Berthold Technologies, США), клеточный анализатор iCELLigence (ACEA Biosciences, США), источник холодной плазменной струи (ИФП СО РАН, Новосибирск), стеклянный гомогенизатор Kimble Kontes Dual 21 (Kimble, США).

2.1.3. Буферы и растворы

- Лизирующий буфер RIPA: 1% NP-40, 150 мМ NaCl, 0.1% SDS, 50 мМ Трис-HCl, pH=7.4; ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, США) и ингибитор фосфатаз Pierce Phosphatase Inhibitor (Thermo, США);
- ПААГ разделяющий (для белкового электрофореза): 0.3 М Трис-HCl, 13% акриламид, 0.25% N,N'-метиленбисакриламид, 0.1% SDS, 0.06% TEMED, 2 мМ персульфат аммония, pH 8.8;
- ПААГ концентрирующий (для белкового электрофореза): 125 мМ Трис-HCl, 5% акриламид, 0.1% N,N'-метиленбисакриламид, 0.1% SDS, 0.03% TEMED, 0.4 мМ персульфат аммония, pH 6.8;
- ТГ (буфер для белкового электрофореза): 25 мМ Трис-HCl (pH 8.3), 192 мМ глицин, 0.1 % SDS;

- Буфер для нанесения образцов: 50 мМ Трис-HCl, 100 мМ β-меркаптоэтанол, 1% SDS, бромфеноловый синий (75 нг/мл), ксиленцианол (50 нг/мл), pH 6.8;
- Буфер для электропереноса: 50 мл NuPAGE Transfer Buffer, 1150 мл H₂O mQ (по протоколу производителя);
- Раствор Кумасси: 0.025% Кумасси ярко голубой R 250, 10% уксусная кислота;
- ТАЕ: 40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА, pH 8.4;
- Буфер 1 (промывочный для проточной цитометрии): PBS с 2% FBS;
- Буфер 2 (блокировочный буфер для проточной цитометрии): PBS с 10% FBS и 2% глицина;
- Раствор авертина (0.2% 2,2,2-трибромэтанол, 0.2% 2-метилбутанол в 0.9% NaCl).

2.1.4. Олигонуклеотиды

Синтетические олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН (Новосибирск) с помощью стандартного фосфитамидного метода. Для проведения обратной транскрипции в работе использовали олигонуклеотиды следующей последовательности:

Название праймера	Праймер	Длина продукта, п.о.
GAPDH	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' R: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'	226
CRT	F: 5'- GGGAACCCCCAGTGATTTCAG-3' R: 5'-CCAGACTTGACCTCCCAGAG -3'	190

2.1.5. Клеточные культуры

В работе использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-321 (коллекция клеточных культур ЗАО «Исследовательский Институт Химического Разнообразия», г. Химки, Московская область), аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 (#ACC 115, DSMZ, Германия), рабдомиосаркомы мыши MX-7 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург).

2.1.6. Лабораторные животные

В работе использовали 8-12-недельных самцов линии СЗН/Не средней массы 25-30 г развода вивария ИХБФМ СО РАН (Новосибирск). Животных содержали по 5-10 особей в клетке в помещении с режимом освещения 12:12. Мыши имели свободный доступ к пище и воде.

Все эксперименты с лабораторными животными выполнены в соответствии с рекомендациями и требованиями по использованию и уходу за лабораторными животными (ЕСС Directive 86/609/ЕЕС). Протоколы экспериментов были одобрены Комитетом по этике экспериментов на животных Администрации Сибирского отделения Российской академии наук (протокол № 40 - 2018).

2.2. Методы

2.2.1. Культивирование эукариотических культур клеток

Клетки MDA-MB-231, MCF-7, MX-7, перитонеальные макрофаги и дендритные клетки мышей СЗН/Не культивировали в культуральных флаконах площадью 25 см² или в 6-луночных планшетах в ростовой среде L15 для клеток MDA-MB-231, DMEM для клеток MX-7, IMDM для клеток MCF-7, среде 199 для перитонеальных макрофагов и RPMI для дендритных клеток в присутствии 2 мМ L-глутамина, 10% FBS и антибиотика-антимикотика – 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина сульфата, 0.25 мкг/мл амфотерицина (далее - полная ростовая среда) при температуре 37.0±1.0°C в атмосфере 5.0±0.5 % CO₂ (далее - стандартные условия).

Клетки открепляли от подложки добавлением 20 мкл/см² раствора Tryple-Express при достижении монослоя, предварительно промывая добавлением 100 мкл/см² раствора PBS. Открепленные клетки разбавляли полной ростовой средой, в соотношении 1:3 – 1:5 (V:V), для продолжения культивирования.

2.2.2. Анализ цитотоксического действия ХПС (MTT-тест)

Клетки MX-7 высевали в 96-луночные культуральные планшеты в количестве 2.5×10³ клеток на лунку в объеме 100 мкл и культивировали в стандартных условиях в полной ростовой среде RPMI. Через 24 ч клетки облучали ХПС в течение 1 мин, и продолжали культивирование в течение 24 ч, после чего среду в лунках заменяли на 200 мкл среды RPMI без сыворотки, содержащей МТТ (0.25 мг/мл), и продолжали культивирование в течение 4 ч при 37°C. Далее, среду из лунок удаляли, образовавшиеся в клетках кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на многоканальном

спектрофотометре Apollo LB912 ($\lambda = 570$ нм/ $\lambda = 620$ нм). Жизнеспособность клеток определяли относительно жизнеспособности контрольных необработанных клеток, принимаемых за 100%.

2.2.3. Определение жизнеспособности клеток в режиме реального времени на приборе iCELLigence

Опухолевые клетки MX-7 (2×10^4 клеток на лунку) высаживали на 8ми-луночные планшеты со встроенными микроэлектронными датчиками в полной ростовой среде DMEM в объеме 500 мкл и культивировали в стандартных условиях на приборе iCELLigence. Через 24 ч растущие в планшетах клетки облучали струей холодной плазмы, после чего продолжали культивирование в стандартных условиях на приборе iCELLigence. Мониторинг динамики роста клеток в режиме реального времени осуществлялся автоматически со снятием показаний каждые 20 мин. Клеточный индекс (CI) и графики с кривыми роста были сгенерированы при помощи коммерческого программного обеспечения RTCA 1.2 (Roche Diagnosis, Франция).

2.2.4. Выделение суммарной клеточной РНК

Клетки, растущие в лунках 6-луночного культурального планшета, промывали добавлением раствора PBS, лизировали добавлением 1 мл Trizol® и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Лизаты переносили в чистые пробирки, добавляли 200 мкл хлороформа на 1 мл Trizol® и перемешивали встряхиванием в шейкере-инкубаторе при комнатной температуре 2-3 мин, после чего смесь разделяли центрифугированием (13000g, 15 мин, 4°C). Верхнюю водную фазу переносили в чистые пробирки и осаждали РНК путем добавления изопропанола (0.5 мл на 1 мл Trizol®), далее оставляли для формирования осадков на 1 ч при 4°C. Образцы центрифугировали (13000g, 15 мин, 4°C), убирали супернатант, а осадок промывали 1 мл 75% EtOH. Осадок высушивали в термостате при 40°C с открытой крышкой. Высушенный осадок растворяли в 40 мкл деионизованной воды, для определения концентрации РНК оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре NanoVue Plus ($\lambda 260/280$). О степени чистоты РНК судили по величине отношения A_{260}/A_{280} . Приемлемой степенью очистки считали $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$. Сохранность выделенной РНК анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле.

2.2.5. Электрофорез в агарозном геле

К образцам РНК (~500 нг) добавляли 1/5 объема раствора состава: 50% глицерин, 0.05% бромфеноловый синий, 0.025% ксиленцианол. Качество образцов РНК анализировали

горизонтальным электрофорезом в 1% агарозном геле в буфере TAE при напряжении электрического поля 20 В/см. По окончании электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали РНК в геле на приборе Gel Doc XR⁺ Imager.

2.2.6. ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Для обратной транскрипции и амплификации кДНК использовали коммерчески доступную смесь для ОТ-ПЦР в режиме реального времени MasterMix RT SyberGreen. Реакцию ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе IQTM5 в следующих условиях: 45°C – 30 мин, 95°C – 5 мин (обратная транскрипция); денатурация 95°C – 15 с, отжиг – 61°C – 15 с, элонгация – 72°C – 25 с (синтез кДНК, всего 32-40 циклов). Каждая реакционная смесь содержала 200 пг исследуемой РНК, 30 пмоль каждого праймера и смесь MasterMix RT SyberGreen. В качестве внутреннего контроля, относительно которого проводилось нормирование продуктов амплификации исследуемого гена, был использован ген «домашнего хозяйства» глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы – GAPDH.

Порог детекции (Ct) для каждой реакции определялся автоматически программой для анализа результатов iQ5 software (BioRad, США). Данные были нормализованы согласно модели $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, где $\Delta\Delta Ct = (Ct_{CRT} - Ct_{GAPDH})_{\text{Время X}} - (Ct_{CRT} - Ct_{GAPDH})_{\text{Время 0}}$, где X – это время инкубации с препаратом [203].

2.2.7. Приготовление лизатов клеток и измерение концентрации общего белка

Клетки, растущие в лунках 6-луночного культурального планшета, промывали добавлением раствора PBS, открепляли от пластиковой подложки добавлением раствора Tryple-Express, после чего суспензию клеток переносили в пробирки объемом 1.5 мл и осаждали центрифугированием при 100 g 5 мин. К осадку добавляли 50 мкл лизирующего буфера RIPA, тщательно пипетировали и инкубировали 30 мин на льду, периодически перемешивая. Полученные образцы центрифугировали при 12000 g, супернатант переносили в чистые пробирки и хранили далее при -20°C. Концентрацию общего белка в лизатах определяли при помощи набора Modified Lowry Protein Assay Kit на спектрофотометре SmartSpec Plus. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли при длине волны $\lambda = 750$ нм. Для построения калибровочной кривой использовали образцы с известной концентрацией BSA (0.2–2 мг/мл). Полученные данные использовали для построения калибровочной кривой в координатах «оптическая плотность/концентрация», содержание общего белка в образцах рассчитывали по калибровочной кривой.

2.2.8. Электрофорез лизатов клеток в ПААГ

Лизаты клеток растворяли в буфере для нанесения и инкубировали 10 мин при 96°C. Для нанесения на гель использовали 15-20 мкг белка. Разделение белков проводили SDS-электрофорезом по Лэммли [204] в ПААГ (5% концентрирующий ПААГ, 110 В/см, 10% разделяющий ПААГ, 150 В/см) в буфере ТГ.

2.2.9. Электроперенос белков на мембрану и Вестерн-блот анализ

Белки лизатов, разделенные в ПААГ по молекулярной массе, переносили на нитроцеллюлозную мембрану в камере для электропереноса 1 ч в буфере для электропереноса при напряжении 150 В. По окончании электропереноса гель окрашивали раствором кумасси для проверки качества электропереноса. Для иммуноблоттинга использовали реагенты из набора Ibind Solution Kit. Нитроцеллюлозную мембрану после электропереноса предварительно инкубировали с раствором Ibind Solution в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего заменяли на раствор Ibind Solution с моноклональными антителами (2 мкг/мл) и конъюгатом вторичных антител с пероксидазой хрена (3 мкг/мл) и инкубировали мембрану 3 ч в приборе iBind. Далее, нитроцеллюлозную мембрану промывали H₂O mQ, инкубировали 1 мин с хемилюминесцентным субстратом пероксидазы WesternSure™ PREMIUM Chemiluminescent Substrate и визуализировали сигнал на детекторе хемилюминесценции C-Digit или Amersham Imager 600. Денситометрический анализ данных Вестерн-блота проводили с использованием программного обеспечения для анализа изображений Gel-Pro Analyzer версии 3.1 (Media Cybernetics, США).

2.2.10. Анализ белков на поверхности клеток методом проточной цитометрии

Клетки, растущие в лунках 6-луночного культурального планшета, промывали PBS, открепляли от пластиковой подложки добавлением раствора Tryple-Express, после чего суспензию клеток переносили в пробирки объемом 1.5 мл и осаждали центрифугированием при 100 g 5 мин. Осадок клеток промывали буфером 1 и повторяли процедуру центрифугирования. Далее клетки инкубировали с 200 мкл блокировочного буфера (буфер 2) в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего образцы центрифугировали при 100 g 5 мин, супернатант отбирали, а клетки инкубировали со 100 мкл раствора моноклональных антител в буфере 1 (разведения антител согласно инструкции производителя) в течение 30 мин при комнатной температуре. По завершении инкубации клетки дважды промывали буфером 1 и инкубировали

со 100 мкл раствора вторичных антител, конъюгированных с флуорохромом (разведение антител согласно инструкции производителя), в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации образцы промывали буфером 1, добавляли к клеточному осадку 500 мкл буфера 1 и анализировали на проточном цитометре FACS CantoII. Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного пакета FACSDiva Version 6.1.3. (BD, США) или FlowJo™ v10 Software (BD, США). Для каждого образца анализировали не менее 10000 событий.

2.2.11. Измерение уровня внеклеточного АТФ

Клетки в состоянии 70% монослоя инкубировали с исследуемыми потенциальными индукторами иммуногенной клеточной гибели и в процессе инкубации производили отбор образцов культуральной среды. Образцы среды центрифугировали при 200 g 5 мин и переносили надосадочную жидкость в отдельные пробирки. В белый непрозрачный 96-луночный планшет помещали по 100 мкл образца, каждый в трех повторах и автоматически добавляли в лунки ферментно-субстратную смесь из коммерческого набора (ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement), принцип действия которого основан на превращении люциферина в оксильюциферин в присутствии АТФ с испусканием кванта света, который может быть детектирован. Для определения фонового уровня сигнала в планшет помещали по 100 мкл среды для культивирования и воду «ATP-Free water» из набора ENLITEN ATP Assay System. Для построения калибровочной кривой использовали растворы АТФ с известной концентрацией, приготовленные методом последовательных разведений в диапазоне 5×10^{-8} - 1×10^{-11} М в среде для культивирования клеток. Анализ люминесценции проводили в приборе CLARIOstar.

2.2.12. Количественное определение интерферона альфа в культуральной среде

Концентрацию интерферона альфа анализировали в культуральной среде клеток, обработанных исследуемыми индукторами иммуногенной гибели, методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора IFN alpha Mouse ELISA Kit. Клетки в состоянии 50-70% монослоя инкубировали с исследуемыми потенциальными индукторами иммуногенной клеточной гибели. В процессе инкубации производили отбор образцов культуральной среды. Среду отбирали в отдельные пробирки, центрифугировали при 200 g 5 мин при комнатной температуре для отделения клеточного дебриса и переносили надосадочную жидкость в отдельные пробирки. В 96-луночный планшет для ИФА добавляли по 50 мкл образцов и антитела к IFN α , конъюгированные с биотином, и инкубировали 2 ч при комнатной температуре при

постоянном перемешивании на шейкере. Далее, в лунки планшета добавляли раствор, содержащий конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена и инкубировали 1 ч при комнатной температуре на шейкере. После инкубации в лунки добавляли раствор, содержащий субстрат пероксидазы тетраметилбензидин, инкубировали 30 мин в темноте, после чего останавливали реакцию добавлением раствора серной кислоты. Для построения калибровочной кривой использовали метод последовательных разведений калибровочных образцов с концентрацией IFN α (30-2000 пг/мл). Оптическую плотность растворов измеряли на многоканальном спектрофотометре Apollo LB912 при длине волны 450 нм (референсная длина волны 620 нм). Полученные данные использовали для построения калибровочной кривой в координатах оптическая плотность/концентрация, содержание IFN α в образцах рассчитывали по калибровочной кривой.

2.2.13. Выделение перитонеальных макрофагов из брюшной полости мышей

Мышей С3Н умерщвляли путем цервикальной дислокации, затем в условиях стерильного ламинарного бокса проводили забор перитонеальных макрофагов из брюшной полости животного. Для этого живот мыши обильно обрабатывали 70% этиловым спиртом, делали небольшой надрез и шприцом вводили в брюшную полость 3 мл среды 199 без фенолового красного, содержащей гепарин (5 МЕ/мл). Затем жидкость из брюшной полости отбирали, центрифугировали при 150 g 10 мин при температуре 4°C, отбирали супернатант, а клетки ресуспендировали в полной ростовой среде 199 и подсчитывали концентрацию клеток при помощи счетчика клеток. Макрофаги помещали в лунки 6-луночного планшета (5×10^5 клеток/лунку) и культивировали в стандартных условиях в полной ростовой среде 199 в течение 1 ч, после чего среду с неприкрепившимися клетками убрали, в лунки добавляли свежую порцию полной ростовой среды 199 и культивировали прикрепившиеся клетки 24 ч в стандартных условиях.

2.2.14. Исследование фагоцитирующей активности перитонеальных макрофагов

К перитонеальным макрофагам (2×10^5 клеток/лунку), растущим в 6-луночном планшете, в среде RPMI добавляли раствор зеленого флуоресцентного красителя компонентов цитоплазмы Cell Tracker Green (1 мкМ, $\lambda_{ex}=492$ нм, $\lambda_{em}=517$ нм) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C, после чего среду отбирали и промывали клетки раствором PBS.

К клеткам MX-7 (2×10^5 клеток/лунку), растущим в 6-луночном планшете, добавляли раствор красного флуоресцентного красителя компонентов цитоплазмы Cell Tracker Red (5 мкМ,

Ex=577 нм, Em=602 нм) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C, после чего среду отбирали и промывали клетки раствором PBS. После окрашивания клетки MX-7 инкубировали с исследуемыми индукторами иммуногенной клеточной гибели, после чего открепляли от подложки при помощи Tryple-Express, переносили в 6-луночный планшет с окрашенными перитонеальными макрофагами в полной ростовой среде 199, и со-культивировали в течение 1 ч в стандартных условиях при 37°C.

После со-культивирования клетки открепляли от подложки при помощи Tryple-Express и анализировали на проточном цитометре FACS CantoII. Популяцию перитонеальных макрофагов, меченых Cell Tracker Green, оценивали в флуоресцентном канале FITC, популяцию клеток MX-7, меченых Cell Tracker Red, оценивали в канале APC. Дважды положительная популяция (двойное зелено-красное свечение), соответствовала макрофагам, захватившим клетки MX-7. Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного пакета FACSDiva Version 6.1.3. (BD, США) или FlowJo™ v10 Software (BD, США). Для каждого образца анализировали не менее 10000 событий.

Для визуализации фагоцитоза перитонеальные макрофаги высаживали на 4-луночные предметные стекла и проводили инкубацию с клетками MX-7 в течение 1 ч в стандартных условиях. После инкубации среду с неприкрепившимися клетками отбирали, промывали PBS и фиксировали клетки на стекле добавлением 100% метанола на 10 мин при температуре 4°C, после чего метанол убрали, камеру с лунками снимали с покровного стекла. Образцы клеток на предметном стекле заключали в монтирующую среду для флуоресцентной иммуноцитохимии Fluoromount Aqueous Mounting Medium. Готовые препараты визуализировали с использованием микроскопа Axioscop 2 PLUS (Carl Zeiss, GmbH) в световом поле. Анализ проводили в ЦКП ИЦиГ СО РАН «Микроскопический анализ биологических объектов».

2.2.15. Выделение дендритных клеток из красного костного мозга мышей

Выделение дендритных клеток проводили аналогично протоколу, описанному ранее в статье [205]. Мышей С3Н умерщвляли путем цервикальной дислокации, затем в условиях стерильного ламинарного бокса бедренные и большие берцовые кости мыши очищали от прилегающих мышц и связок, обрабатывали 50% раствором этилового спирта, после чего проводили надрезы дистальных частей костей для того, чтобы открыть канал красного костного мозга. Клетки костного мозга из канала вымывали порциями холодного раствора PBS (+4°C) по 1 мл в чашку Петри при помощи шприца до тех пор, пока большая часть клеток не вымоется из кости. Для выделения мононуклеаров из суспензии клеток костного мозга в пробирку объемом 15 мл помещали 4 мл фикола Histopaque®1083, а сверху наслаивали 4 мл суспензии клеток

красного костного мозга в PBS, центрифугировали при 400g в течение 30 мин при комнатной температуре. Интерфазу, содержащую мононуклеары костного мозга, переносили в чистую пробирку и промывали раствором PBS, после чего центрифугировали при 300g 10 мин при комнатной температуре. Промывку и центрифугирование повторяли дважды. Далее осадок клеток суспендировали в 1 мл PBS и подсчитывали содержание клеток в растворе при помощи счетчика клеток. Дендритные клетки помещали в культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см² в концентрации 1×10^6 клеток/мл в полной ростовой среде RPMI с добавлением IL4 (50 нг/мл) и GM-CSF (50 нг/мл) и культивировали в стандартных условиях. Через 3 дня половину культуральной среды из флакона отбирали и заменяли на свежую ростовую среду RPMI также с добавлением IL4 и GM-CSF и продолжали культивирование в стандартных условиях в течение 3 дней. После этого культивируемые клетки (прикрепленные и свободно плавающие) считали незрелыми дендритными клетками.

2.2.16 Исследование фагоцитирующей активности дендритных клеток

Свободно плавающие и открепленные от подложки при помощи Tryple-Express незрелые дендритные клетки суспендировали в культуральной среде RPMI, добавляли зеленый флуоресцентный краситель компонентов цитоплазмы Cell Tracker Green (1 мкМ) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C, после чего клетки осаждали центрифугированием при 400g в течение 5 мин, промывали раствором PBS и повторяли центрифугирование.

Клетки MX-7, окрашенные красным флуоресцентным красителем цитоплазмы Cell Tracker Red, как описано в п. 2.2.14., инкубировали с исследуемыми индукторами иммуногенной клеточной гибели, после чего открепляли от подложки при помощи Tryple-Express и добавляли к окрашенным дендритным клеткам в соотношении 1:1 в полной ростовой среде RPMI в лунку 6-луночного планшета и инкубировали в течение 3 ч в стандартных условиях. После инкубации образцы клеток анализировали на проточном цитометре FACS CantoII. Популяцию дендритных клеток, меченых Cell Tracker Green, оценивали в флуоресцентном канале FITC, популяцию клеток MX-7, меченых Cell Tracker Red, оценивали в канале APC. Дважды положительная популяция (двойное зелено-красное свечение), соответствовала дендритным клеткам, захватившим клетки MX-7. Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного пакета FACSDiva Version 6.1.3. (BD, США) и FlowJo™ v10 Software (BD, США). Для каждого образца анализировали не менее 30000 событий.

2.2.17 Оценка созревания дендритных клеток

Свободно плавающие и открепленные от подложки при помощи Tryple-Express незрелые дендритные клетки суспендировали в полной ростовой среде RPMI, смешивали с клетками MX-7, обработанными индукторами иммуногенной клеточной гибели, в соотношении 1:1, суспензию клеток переносили в лунки 6-луночного планшета и инкубировали 18 ч в стандартных условиях. Далее, клетки открепляли от подложки с помощью Tryple-Express, инкубировали клетки с флуоресцентно-мечеными моноклональными антителами к CD11c и MHC II как описано в п. 2.2.10. Образцы клеток анализировали на проточном цитометре FACS CantoII. Данные анализировали с помощью программного пакета FACSDiva Version 6.1.3. (BD, США) и FlowJo™ v10 Software (BD, США). Для каждого образца анализировали не менее 30000 событий.

2.2.18 Анализ захвата опухолевых клеток MX-7 CD11c⁺-клетками селезенки *in vivo*

Клетки MX-7 в состоянии 50-70% монослоя окрашивали флуоресцентным красным красителем цитоплазмы Cell Tracker Red, как описано в п. 2.2.14. После окрашивания клетки MX-7 инкубировали с индукторами иммуногенной клеточной гибели или облучали ХПС, культивировали в течение 24-48 ч в стандартных условиях, после чего открепляли от подложки при помощи Tryple-Express. Открепленные клетки дважды промывали раствором PBS, суспендировали в физиологическом растворе (1.4×10^6 клеток/мл) и вводили мышам СЗН/Не внутривенно в дозе 7×10^5 клеток/мышь в 500 мкл. Через 3 ч мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации и извлекали селезенки. Селезенки взвешивали, после чего измельчали до состояния клеточной суспензии в среде 199, раздавливая стеклянным гомогенизатором (1 мл среды 199 на 50 мг ткани). Гомогенаты селезенки фильтровали через клеточное сито-фильтр и центрифугировали 5 мин, 200 g при комнатной температуре, дважды промывали PBS и фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре добавлением 200 мкл 10% формалина. Фиксированные клетки центрифугировали 5 мин при 200 g, дважды промывали раствором PBS и подсчитывали концентрацию при помощи счетчика клеток.

Для иммуноокрашивания клеток селезенки моноклональными антителами к CD11c, конъюгированными с фикоэритрином (PE), использовали 5×10^5 клеток/образец в 100 мкл буфера 1. Инкубацию с антителами проводили в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. После инкубации образцы клеток промывали буфером 1, добавляли к клеточному осадку 500 мкл буфера 1 и анализировали на проточном цитометре FACS CantoII. Долю клеток, окрашенных Cell Tracker Red, определяли от общего количества CD11c-положительных клеток селезенки. Данные анализировали с помощью программного пакета FACSDiva Version 6.1.3. (BD,

США) или FlowJo™ v10 Software (BD, США). Для каждого образца анализировали не менее 30000 событий.

2.2.19 Трансплантация мышам клеток MX-7, обработанных индукторами ICD, и последующая трансплантация живых клеток

2.2.19.1 Подготовка клеток для первой трансплантации мышам

Клетки MX-7 наращивали во флаконах для культивирования с площадью поверхности 75 см² в ростовой среде DMEM в стандартных условиях. Клетки в состоянии 50-70% монослоя культивировали в присутствии RL2 (0.3 мг/мл), доксорубицина (0.2 мкМ) в течение 24 ч, или в присутствии вируса VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку) в течение 48 ч. После этого, клетки промывали добавлением раствора PBS, открепляли от подложки добавлением раствора Tryple-Express, промывали полной ростовой средой DMEM, переносили в 15-мл пробирку и осаждали клетки центрифугированием при 100 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Среду отбирали, осадок клеток промывали добавлением 10 мл PBS и повторяли центрифугирование. Осажденные клетки ресуспендировали в физиологическом растворе до концентрации 7×10^6 клеток/мл и трансплантировали подкожно мышам СЗН/Не в дозе 7×10^5 клеток/мышь в объеме 100 мкл. Мышам контрольной группы аналогично вводили живые необработанные опухолевые клетки MX-7 в дозе 7×10^5 клеток/мышь. Размер опухоли измеряли штангенциркулем 1 раз в 3 дня.

2.2.19.2 Подготовка клеток для трансплантации с применением проточной сортировки

В случае использования проточной сортировки, к суспензии клеток MX-7, обработанной исследуемыми индукторами, как описано выше в п. 2.2.19.1, добавляли йодид пропидия (2 мкг/мл) и инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре. После этого анализировали образцы клеток на проточном сортере клеток Sony SH-800. Начальное гейтирование осуществляли в каналах размер/гранулярность (FSC/SSC) для исключения мелкого дебриса. Далее, клетки анализировали в канале PE (Ex=496 нм, Em=578 нм), и собирали PI⁺-клетки (1500 клеток/сек). Отсортированные клетки с заданным фенотипом центрифугировали для концентрирования суспензии при 100 g в течение 10 мин при комнатной температуре, осадок клеток разбавляли стерильным PBS до концентрации клеток 4×10^6 клеток/мл. Полученную суспензию клеток трансплантировали мышам в дозе 4×10^5 , как описано в п. 2.2.19.1.

2.2.19.3 Трансплантация живых опухолевых клеток (повторная трансплантация) и оценка вакцинирующего эффекта

Через 7-8 дней после первой трансплантации мышам СЗН/Не перевивали подкожно живые необработанные клетки МХ-7 в дозе 7×10^5 клеток/мышь в 100 мкл PBS в противоположный бок относительно первой трансплантации. Противоопухолевую иммунную реакцию оценивали по выживаемости животных в группе, динамике роста опухолевого узла в месте трансплантации живых опухолевых клеток (повторная трансплантация) и количеству животных без опухоли в месте трансплантации живых опухолевых клеток.

2.2.19.4 Введение ингибиторов ИДО экспериментальным животным

Для введения животным стоковый раствор этилпирувата разводили раствором Рингера до концентрации 2 мг/мл. Мышам СЗН/Не внутрибрюшинно вводили этилпируват (40 мг/кг) каждые 12 ч. Контрольной группе вводили раствор Рингера по аналогичной схеме.

1-МТ растворяли в 0.5% метилцеллюлозе с добавлением 0.5% Tween 80 до концентрации 25 мг/мл. Внутрижелудочное введение 1-МТ мышам проводили с помощью внутрижелудочного зонда в 200 мкл в дозе 200 мг/кг 2 раза в день. Всего животные получили 10 внутрижелудочных введений 1-МТ. Контрольной группе вводили раствор Рингера по аналогичной схеме.

2.2.20 Забор образцов крови и получение сыворотки крови

Забор крови у мышей СЗН/Не проводили стерильным стеклянным капилляром из ретроорбитального синуса в стерильные пробирки. Образцы крови инкубировали в термостате в течение 30 минут при температуре 37°C для коагуляции, после чего образцы крови центрифугировали при 1500 g 10 мин при комнатной температуре, сыворотку переносили в отдельные пробирки и хранили при -70°C.

2.2.21 Выделение и иммуноокрашивание мононуклеаров крови мышей

Кровь из ретроорбитального синуса забирали стерильным стеклянным капилляром в вакутейнеры с гепарином. Образцы крови разбавляли раствором PBS в соотношении 1:1 (V:V). В пробирку, содержащую 300 мкл фикола Histopaque®1083, сверху наслаивали 500 мкл разведенной раствором PBS крови, центрифугировали при 400g в течение 30 мин при комнатной температуре и собирали интерфазу, содержащую мононуклеары (PBMC), в отдельную пробирку. Клетки дважды промывали раствором PBS, центрифугируя после каждой промывки при 250g по

10 мин при комнатной температуре. Промытые клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с флуоресцентно-меченными антителами к IgG мыши, специфичными к CD45 (PerCP/Cy5.5), CD19 (APC), CD3 (FITC) и анализировали на проточном цитометре FACS CantoII. Первоначальное гейтирование осуществляли по популяции CD45-положительных клеток. Данные анализировали с помощью программного пакета FACSDiva Version 6.1.3. (BD, США). Для каждого образца анализировали не менее 100 000 событий.

2.2.22 Источник холодной плазменной струи

В работе использовали источник холодной плазменной струи, разработанный сотрудниками ИФП и ИТПМ СО РАН, описанный в работе [23]. При подаче напряжения на электроды и расходе гелия 1–10 л/мин разряд зажигался, образуя холодную плазменную струю. Типичные значения параметров разряда были следующие: расход газа $v = 9$ л/мин, амплитуда напряжения $U = 4.9$ кВ, ток разряда (I) - до 12 мА, энергия в импульсе до 12 мкДж.

2.2.23 Трансплантация опухолевых клеток мышам и облучение ХПС

Суспензию опухолевых клеток MX-7 (5×10^6 клеток/мл) в PBS трансплантировали подкожно мышам СЗН/Не в дозе 5×10^5 клеток/мышь в объеме 100 мкл физиологического раствора. Размер опухолей измеряли штангенциркулем 2 раза в неделю. По достижении опухолей среднего размера 50 мм³, опухолевые узлы облучали холодной плазменной струей. Для этого перед облучением ХПС мышей анестезировали инъекциями раствора авертина (400 мкл/мышь) внутривентрально, после чего животные погружались в сон через 5 минут. Обездвиженное животное помещали на предметный столик и направляли струю холодной плазмы непосредственно на зону опухолевого узла или аналогичную зону без опухоли у контрольных животных. Температуру струи контролировали тепловизором Testo 872 (Testo AG, Германия). После облучения проводили забор крови из ретроорбитального синуса и из образцов крови готовили сыворотку как описано в п. 2.2.20, которую хранили при -70°C .

2.2.24 Определение концентрации белка HMGB1 методом ИФА

В качестве образцов для анализа концентрации белка HMGB1 использовали сыворотку крови мышей и ростовую среду, в которой культивировались клетки. Образцы культуральной среды от клеток MX-7, культивируемых в 12-луночных планшетах, отбирали в отдельные пробирки, центрифугировали при 200 g в течение 5 мин при комнатной температуре и

переносили надосадочную жидкость в отдельные пробирки. Забор образцов крови мышей и приготовление сыворотки проводили как описано в п. 2.2.20.

Для определения концентрации белка HMGB1 методом ИФА в 96-луночный планшет с иммобилизованными антителами к HMGB1 из коммерческого набора HMGB1 ELISA KIT добавляли по 50 мкл образцов среды или сыворотки крови в трех повторах и инкубировали 24 ч при 37°C. После инкубации в лунки планшета добавляли конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к HMGB1 и инкубировали 2 ч при комнатной температуре, после чего добавляли раствор, содержащий субстрат пероксидазы тетраметилбензидин, на 30 мин, после чего останавливали реакцию добавлением раствора серной кислоты. Оптическую плотность растворов измеряли на многоканальном спектрофотометре Apollo LB912 при длине волны 450 нм (референсная длина волны 620 нм). Для определения концентрации целевого белка с помощью калибровочной кривой использовали метод последовательных разведений образцов HMGB1 с известной концентрацией (2.5-80 нг/мл). Содержание HMGB1 в целевых образцах рассчитывали по калибровочной кривой в координатах оптическая плотность/концентрация, содержание HMGB1 в образцах рассчитывали по калибровочной кривой.

2.2.25 Анализ цитокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 α , INF- γ , TNF- α , G-CSF и GM-CSF в сыворотке крови мышей методом ИФА

Образцы сыворотки крови мышей разбавляли в 8 раз для последующего анализа. Для анализа использовали реагенты из набора ELISA Array Kit MEM-004A. В 96-луночный планшет с иммобилизованными антителами помещали по 50 мкл разбавленных образцов сыворотки крови и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки промывали промывочным буфером, добавляли растворы антител, конъюгированных с биотином, для детекции исследуемых цитокинов, и инкубировали в течение 1 ч. После инкубации лунки вновь промывали промывочным буфером из набора и добавляли раствор, содержащий конъюгат авидина с пероксидазой хрена, и инкубировали 30 мин при комнатной температуре, после чего повторяли процедуру промывки. К лункам добавляли раствор, содержащий субстрат пероксидазы тетраметилбензидин, на 30 мин и останавливали реакцию добавлением раствора серной кислоты. В качестве положительного контроля использовали стандартные растворы из набора с известными концентрациями цитокинов. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Apollo LB912 при длине волны 450 нм (референсная длина волны 620 нм). Значения концентрации цитокинов в сыворотке крови мышей, облученных ХПС, были нормализованы к значениям концентрации цитокинов у контрольных здоровых мышей, не получавших облучения (100%) и представлены как относительное изменение уровня (разы от контроля).

2.2.26 Облучение клеток ХПС

Клетки МХ-7 высаживали в 96-луночные планшеты по 5×10^3 клеток/лунку в 100 мкл полной ростовой среды DMEM и культивировали 24 ч в стандартных условиях. Для обработки клеток планшеты извлекали из инкубатора, помещали на предметный столик установки, как изображено на рисунке 10, и обрабатывали струей холодной плазмы клетки в каждой лунке, не отбирая среду. После обработки продолжали культивирование клеток в стандартных условиях в течение 24 ч.



Рис. 10. Установка с газоразрядным устройством для обработки клеток ХПС.

2.2.27 Статистический анализ данных

Для статического сравнения данных между двумя группами, полученных в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, использовали параметрический t-критерий Стьюдента и непараметрический критерий хи-квадрат Пирсона. При $p \leq 0.05$ различия между группами считали достоверными. Кривые выживаемости Каплана-Майера и статистику Log-Rank рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prizm 8.0.1 (Сан-Диего, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки противоопухолевых подходов была поставлена основная задача исследования: провести изучение индукции иммуногенного типа клеточной гибели новых потенциальных противоопухолевых препаратов: рекомбинантного аналога лактапина RL2, рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующего GM-CSF человека и лактапин, и холодную плазменную струю, а также сравнить эффективность указанных воздействий с точки зрения индукции ICD. Эффективность индукции ICD оценивали по изменению молекулярных маркеров иммуногенной клеточной гибели *in vitro*, по реализации противоопухолевой вакцинации мышей опухолевыми клетками, обработанными индукторами ICD *in vivo*, и по функциональной активности иммунных клеток.

3.1. Рекомбинантный аналог лактапина RL2

Ранее сотрудниками ЛБТ ИХБФМ СО РАН из молока человека был выделен белок лактапин, вызывающий апоптотическую гибель ряда опухолевых клеток. Было показано, что исследуемый пептид является протеолитическим фрагментом каппа-казеина человека с 57 по 134 аминокислоту и имеет молекулярную массу 8,6 кДа [206]. Для исследования противоопухолевых свойств лактапина на основе последовательности природного белка был сконструирован его рекомбинантный аналог RL2, также индуцирующий гибель ряда раковых клеток человека в культуре (Рис. 11) [14].



Рис. 11. Структура протеолитического фрагмента к-казеина – лактапина и его рекомбинантного аналога RL2.

При исследовании механизма цитотоксического действия RL2 ранее было показано, что аналог лактапина вызывает гибель клеток аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7 с признаками апоптоза. При этом происходит экспозиция фосфатидилсерина на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны клеток, диссипация трансмембранного потенциала митохондрий, активация каспаз -3 и -7, подавление экспрессии противоапоптотического белка

BCL-2 и стимуляция экспрессии проапоптотического белка Bax [16]. Также было показано, что RL2 проникает в цитоплазму раковых клеток MCF-7 и взаимодействует с белками цитоскелета, например, α -актанином-1, и индуцирует апоптотическую гибель раковых клеток по митохондриальному и рецептор-опосредованному путям. Кроме того, в опухолевых клетках, обработанных RL2, было отмечено образование аутофагосом и активация молекулярных маркеров аутофагии [17]. Более подробные исследования RL2-зависимой клеточной гибели показали, что RL2 вызывает снижение клеточного АТФ и активирует определенную форму аутофагии – митофагию. Также было установлено, что митохондриальный белок TOM70 является белком-партнером аналога лактапина RL2 [15]. В экспериментах на мышах было показано, что аналог лактапина RL2 при внутривенном введении тормозит рост перевиваемых опухолей у экспериментальных животных [16,18].

3.1.1. Анализ активации маркеров иммуногенной гибели опухолевых клеток при воздействии рекомбинантного аналога лактапина RL2 in vitro

Для исследования индукции иммуногенной клеточной гибели рекомбинантным аналогом лактапина RL2 *in vitro* опухолевые клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, MCF-7 и рабдомиосаркомы мыши MX-7 инкубировали с RL2 и затем в них анализировали изменение характерных молекулярных маркеров ICD.

3.1.1.1. Исследование экспозиции кальретикулина на внешнюю плазматическую мембрану под действием RL2

Чтобы подтвердить процесс транслокации CRT из клетки на внешнюю мембрану и исключить RL2-зависимую регуляцию экспрессии CRT, сначала исследовали изменение экспрессии мРНК CRT методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Изменение уровня поверхностного кальретикулина может происходить не только за счет транслокации из ЭПР, но и вследствие изменения транскрипционной активности гена CRT с последующим изменением суммарного белка, что потенциально может влиять на изменение уровня транслокации CRT на внешнюю плазматическую мембрану из-за стресса ЭПР [207]. В качестве препарата сравнения был выбран хорошо изученный индуктор иммуногенной гибели клеток доксорубин (Dox) [4]. На рисунке 12 представлены данные по уровню экспрессии гена CRT в различных клеточных линиях после обработки RL2 или Dox. Для обработки клеток использовали концентрацию RL2 0.3 мг/мл, представляющую собой усредненное значение IC₅₀ для этих клеточных линий, определенное ранее [16].

В результате обработки клеток было обнаружено, что RL2 вызывает снижение экспрессии мРНК кальретикулина в клетках MDA-MB-231 и MX-7 через 5-24 ч по сравнению с необработанными клетками (Рис. 12 А, В). В RL2-обработанных клетках MCF-7 значение относительного уровня мРНК *CRT* достоверно не отличалось от значения для контрольных клеток (Рис. 12 Б). Обработка доксорубицином не вызывала достоверного изменения экспрессии уровня мРНК *CRT* по сравнению с уровнем мРНК в контрольных клетках MDA-MB-231 и MCF-7 после 5 ч инкубации, но вызывала снижение через 24 ч инкубации (Рис. 12 А, Б). Для клеток рабдомиосаркомы мышей MX-7 снижение экспрессии мРНК *CRT* наблюдали через 5-24 ч как для клеток, инкубированных с RL2, так и с доксорубицином (Рис. 12 В). Таким образом, в обработанных клетках не было отмечено увеличения уровня мРНК *CRT*, которое могло бы вести к увеличению уровня его белкового продукта в клетках, и потенциально увеличивать уровень поверхностного CRT. Кальретикулин – кальций-связывающий шаперон, участвующий в фолдинге белков, в депонировании и регуляции гомеостаза ионов Ca^{2+} , который необходим для нормального функционирования клетки [82]. Известно, что стимуляция экспрессии мРНК гена *CRT* происходит в условиях снижения запасов Ca^{2+} в ЭПР [208]. В то же время, негативная регуляция экспрессии кальретикулина ведет к накоплению внутриклеточного Ca^{2+} и последующей гибели клеток по пути апоптоза [209]. Наблюдаемое нами снижение экспрессии мРНК кальретикулина в процессе инкубации с цитотоксическими агентами может вносить вклад в индукцию клеточной гибели.

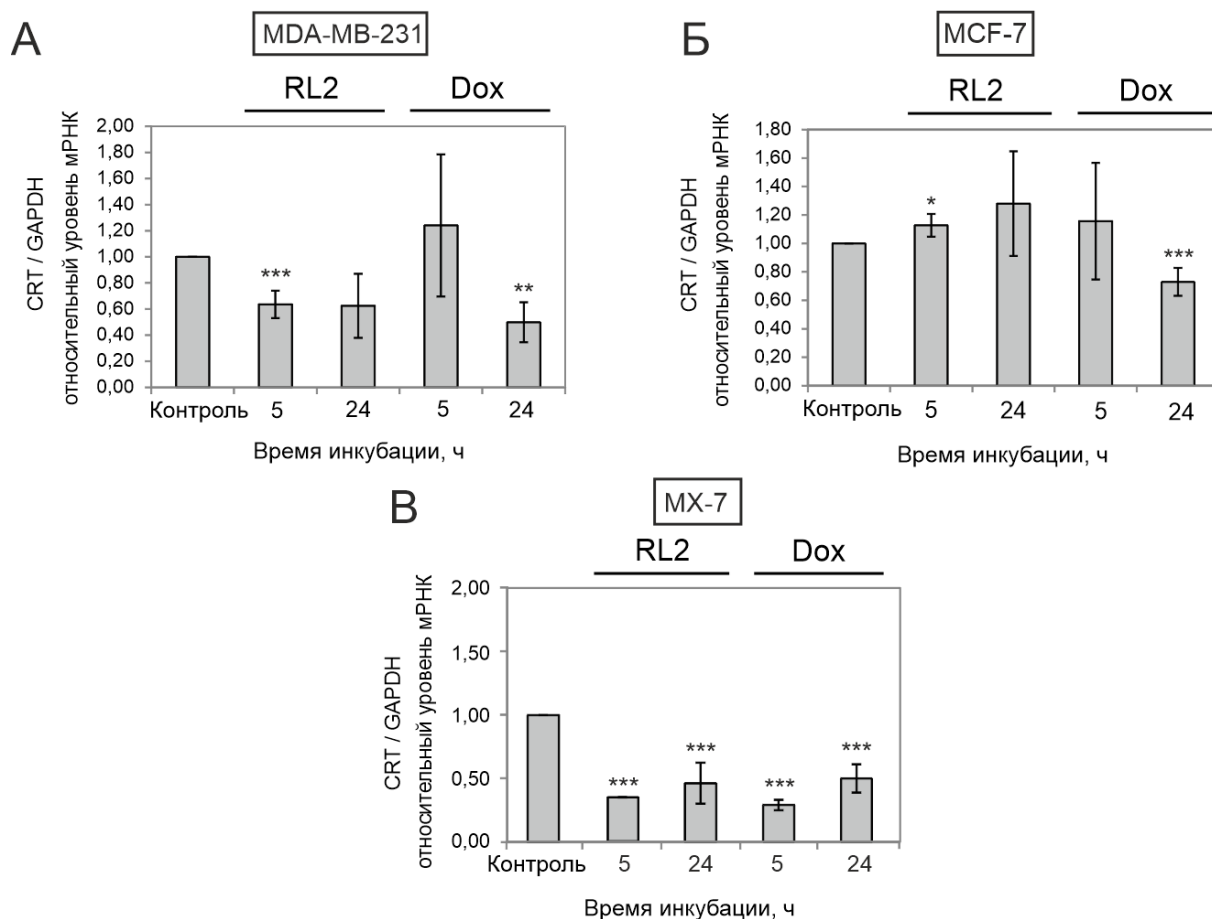


Рис. 12. Относительный уровень экспрессии мРНК *CRT* в культурах клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 (**А**), аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (**Б**) и рабдомиосаркомы мыши MX-7 (**В**), обработанных RL2 или доксорубицином (Dox). Клетки инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) или Dox (0.2 мкМ) в течение 5-24 ч. Уровень транскриптов анализировали методом ОТ-ПЦР со специфическими праймерами. Уровень мРНК *GAPDH* использовали в качестве внутреннего стандарта. Соотношение мРНК *CRT/GAPDH* в контрольных клетках принимали за единицу. Данные представлены как среднее значение соотношения $CRT/GAPDH \pm SD$. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$; ** для $p < 0.01$, *** для $p < 0.001$.

Исследование суммарного клеточного белка кальретикулина в клетках, обработанных RL2, проводили методом Вестерн-блота с использованием антител к кальретикулину. Для эксперимента использовали культуры клеток MDA-MB-231 и MX-7. В результате обработки RL2 уровень белка CRT незначительно снижался через 8 ч инкубации как в клетках MDA-MB-231, так и в клетках MX-7 (Рис. 13). Таким образом, в клетках, обработанных рекомбинантным лактаптином RL2, не было отмечено увеличения уровня белка CRT, что согласуется с данными по экспрессии мРНК *CRT*.

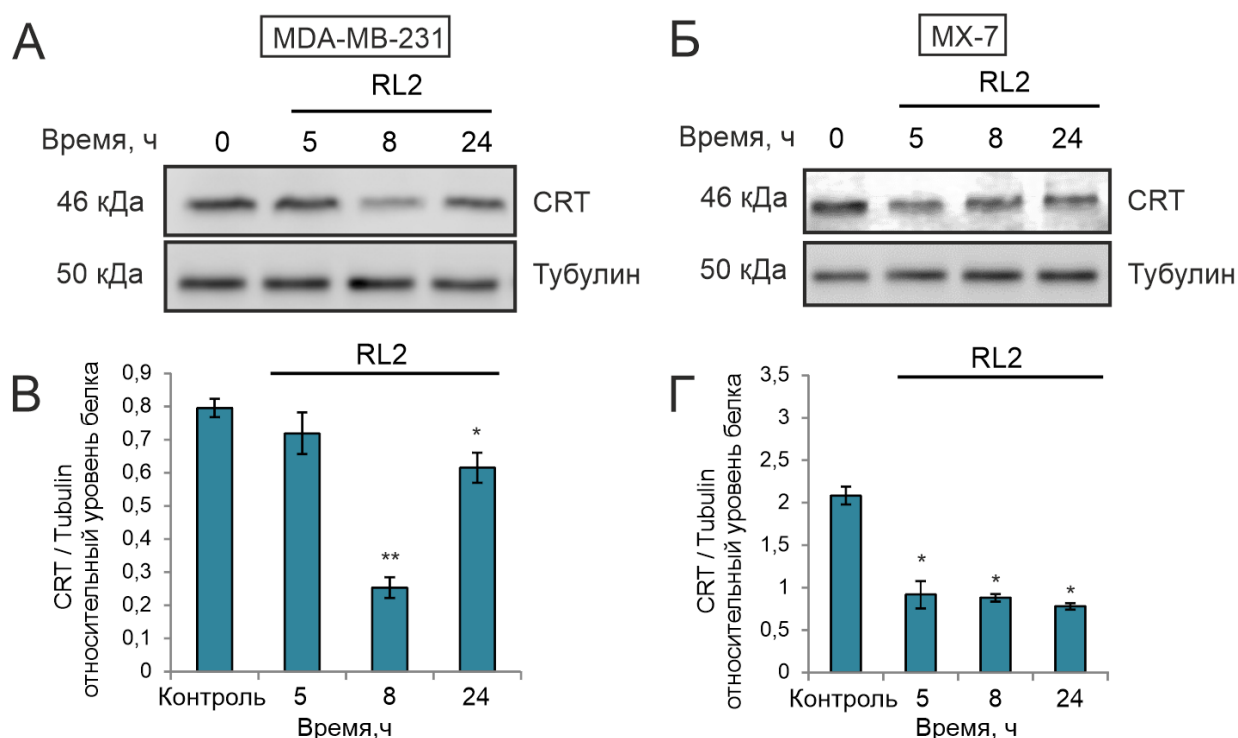


Рис. 13. Относительный уровень общего белка кальретикулина (CRT) в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и рабдомиосаркомы мыши MX-7, обработанных RL2 (0.3 мг/мл) в течение 5-24 ч. **А, Б.** Репрезентативные изображения Вестерн-блот анализа лизатов клеток MDA-MB-231 (**А**) и MX-7 (**Б**), обработанных RL2. **В, Г.** Денситометрический анализ данных Вестерн-блотов лизатов клеток MDA-MB-231 (**В**) и MX-7 (**Г**) с использованием программного пакета Gel-Pro Analyser 3.1. Данные представлены как относительное среднее значение $\pm$ SD, нормализованное к уровню β -тубулина.

Анализ транслокации CRT на внешнюю клеточную мембрану проводили на линиях клеток MDA-MB-231, MCF-7 и MX-7 методом проточной цитометрии без предварительной пермеабиллизации клеток перед инкубацией с антителами. В качестве отрицательного контроля использовали цисплатин, для которого показано, что он не вызывает индукцию ICD, в отличие от другого препарата платины – оксалиплатина [43,133]. Концентрацию цисплатина (150 мкМ) для обработки клеток выбирали на основании данных по IC₅₀, доступных из литературы [43]. При анализе поверхностного кальретикулина при обработке клеток MDA-MB-231, MCF-7 и MX-7 можно видеть, что инкубация с RL2 ведет к увеличению доли клеток с фенотипом CRT⁺ (популяция P2) до 46%, что указывает на RL2-индуцированную транслокацию CRT на внешнюю плазматическую мембрану. Инкубация в течение 4 ч с цисплатином (150 мкМ) не вела к увеличению CRT⁺-популяции (Рис. 14 А).

Транслокация CRT происходит более эффективно в клетках MDA-MB-231 и MX-7 и менее эффективно – в клетках MCF-7 (Рис. 14 Б). Это может быть связано в том числе с особенностями

базового стрессового ответа ЭПР в разных клетках [210]. Такое предположение подтверждают наши данные о том, что наименьшее количество CRT⁺-клеток в образцах, обработанных доксорубицином, также наблюдается в клетках MCF-7 (Рис. 14 Б). Кроме того, анализ базового уровня CRT в этих клеточных линиях показал, что уровень CRT в клетках MCF-7 был наименьшим (Рис. 14 В, Г). Авторы, исследующие различные индукторы ICD, уже демонстрировали, что базовый уровень CRT важен для достижения вакцинирующего эффекта *in vivo* и эффективности всего каскада ICD *in vitro* [31]. Мы предполагаем, что клетки MCF-7 с меньшим уровнем транслокации CRT при инкубации с RL2 (Рис. 14 Б) могут вызвать менее выраженный эффект вакцинации *in vivo*. Помимо более низкого базового уровня кальретикулина известно, что в клетках аденокарциномы MCF-7 снижена экспрессия каспазы 3, необходимой для запуска гибели клеток по классическому пути апоптоза [211], что также может негативно сказываться при индукции иммуногенной клеточной гибели под действием RL2, для которого показано, что он вызывает гибель опухолевых клеток с активацией каспаз 3 и 7 [16].

Увеличение времени инкубации клеток с RL2 (или с доксорубицином) ведет к увеличению популяции CRT⁺-клеток во всех исследованных культурах клеток (Рис. 14 Б). Поскольку инкубация клеток с рекомбинантным аналогом RL2 не ведет к увеличению экспрессии CRT как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции, можно сделать вывод, что увеличение популяции клеток с поверхностным CRT является результатом его RL2-стимулированной транслокации из эндоплазматического ретикулума (ЭПР), что является необходимым условием индукции иммуногенной клеточной гибели [212]. CRT-положительные погибающие клетки, могут быть распознаны дендритными клетками через рецептор CD91 с последующей презентацией антигенов и активацией Т-клеточного ответа [45].

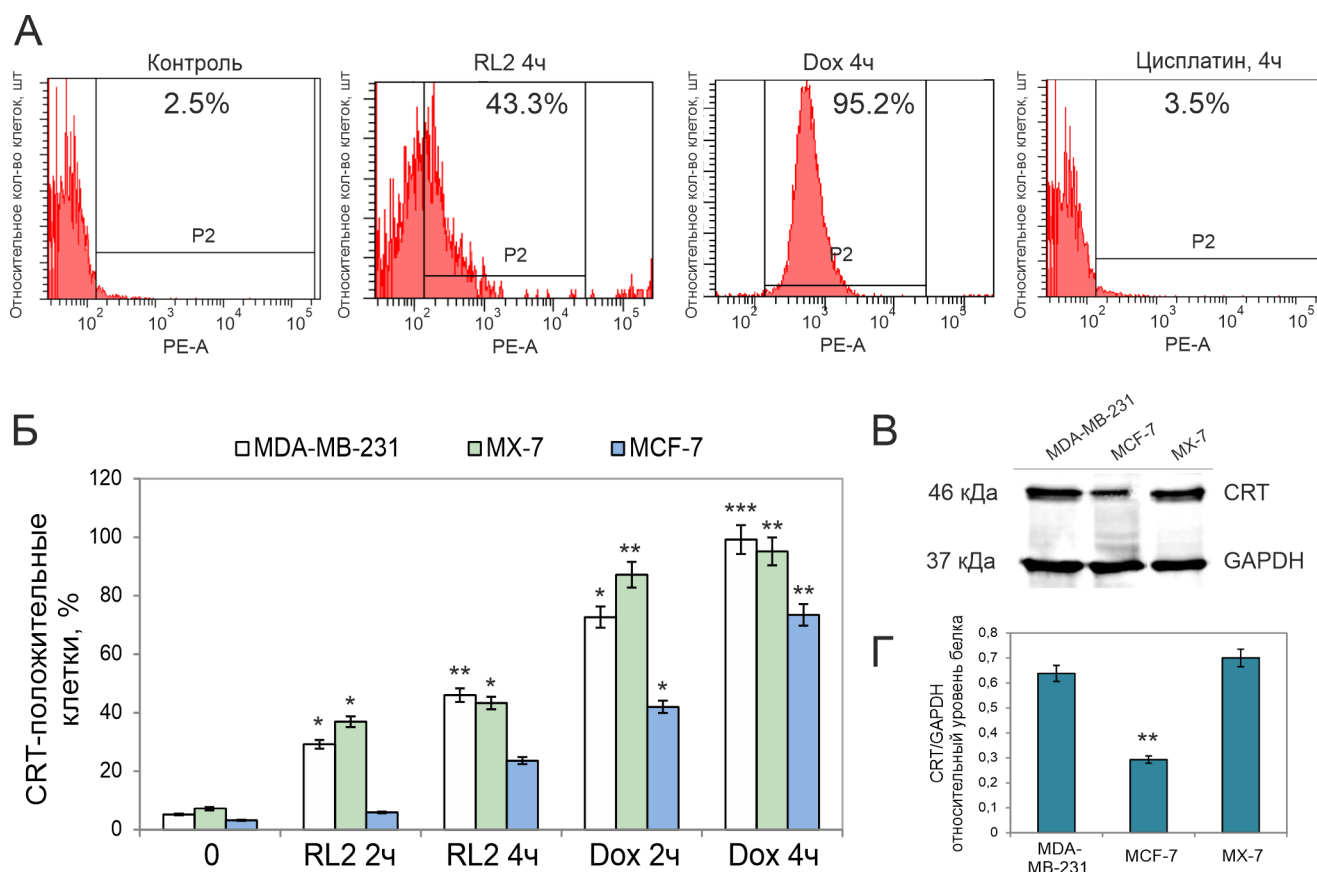


Рис. 14. Изменение уровня кальретикулина в RL2-обработанных клетках. Клетки MDA-MB-231, MCF-7 и MX-7 обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл), доксорубицином (Dox, 0.2 мкМ) или цисплатином (150 мкМ) в течение 2-4 ч. **А.** Репрезентативные изображения анализа поверхностного кальретикулина клеток методом проточной цитометрии (популяция P2) на примере линии MDA-MB-231 через 4 ч инкубации с препаратами. Исходное гейтирование (популяция P1) проводили по параметрам размера клеток/гранулярности для исключения из анализа клеточного дебриса. **Б.** Относительное количество CRT-положительных клеток (популяция P2) согласно данным проточной цитометрии для клеточных линий MDA-MB-231, MCF-7 и MX-7 при инкубации с RL2 или Dox. **В, Г.** Репрезентативное изображение Вестерн-блот анализа лизатов клеток (**В**) и относительная количественная оценка CRT/GAPDH (**Г**); Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$; ** для $p < 0.01$, *** для $p < 0.001$.

Таким образом, показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 вызывает характерную для иммуногенной клеточной гибели транслокацию кальретикулина из ЭПР на внешнюю клеточную мембрану в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, рабдомиосаркомы мышей MX-7 и в меньшей степени в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Поэтому для дальнейших экспериментов по изучению

индукции ICD при обработке RL2 в качестве клеточных моделей были оставлены только MDA-MB-231 и MX-7.

3.1.1.2. Экспозиция белка теплового шока HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану под действием RL2

Транслокация белка теплового шока HSP70 на внешнюю клеточную мембрану при гибели клеток также является маркером ICD. Известно, что белки теплового шока группы HSP, в том числе HSP70, могут пассивно выделяться в межклеточное пространство и выполнять различные функции, отличные от функций шаперонов, взаимодействуя с соседними клетками [110]. Также показано, что HSP70 может быть экспонирован на внешней плазматической мембране клетки, где он взаимодействует с рецепторами CD91 на поверхности дендритных клеток, как и кальретикулин, что необходимо для созревания дендритных клеток [51]. Экспонированные молекулы HSP70 опосредуют взаимодействие опухолевых клеток с иммунными клетками, связывая рецепторы TLR дендритных клеток и NKG2A натуральных киллеров [50].

RL2-зависимую транслокацию HSP70 на внешнюю клеточную мембрану оценивали методом проточной цитометрии с применением специфических антител к HSP70. В образцах клеток, инкубированных с RL2, уже через 6 ч инкубации HSP70-позитивные популяции составили 55.1 % для MDA-MB-231 и 80.6 % для клеток MX-7 (Рис. 15). Дальнейшая инкубация клеток MX-7 с RL2 не вела к увеличению доли HSP70⁺-клеток. Возможно, часть белка HSP70 в клетках MX-7 при длительной инкубации с RL2 начинает секретироваться во внеклеточное пространство, поскольку известно, что HSP70 способен не только транслоцироваться на поверхность клетки, но и секретироваться во внеклеточное пространство при стрессовом воздействии на клетку [213]. В то же время, ранее было показано, что при обработке клеток MDA-MB-231 существует популяция, не чувствительная к RL2, и при лечении препаратом RL2 животных-носителей опухоли MDA-MB-231 не удавалось достигнуть полного торможения роста опухоли [17]. В этом случае, закономерно наблюдать быстрый ответ в виде транслокации HSP70 в чувствительных клетках и дальнейшее отсутствие усиления ответа через продолжительное время. Тем не менее, как при кратковременной инкубации, так и при продолжительной инкубации с RL2 доля HSP70⁺-клеток была существенной.

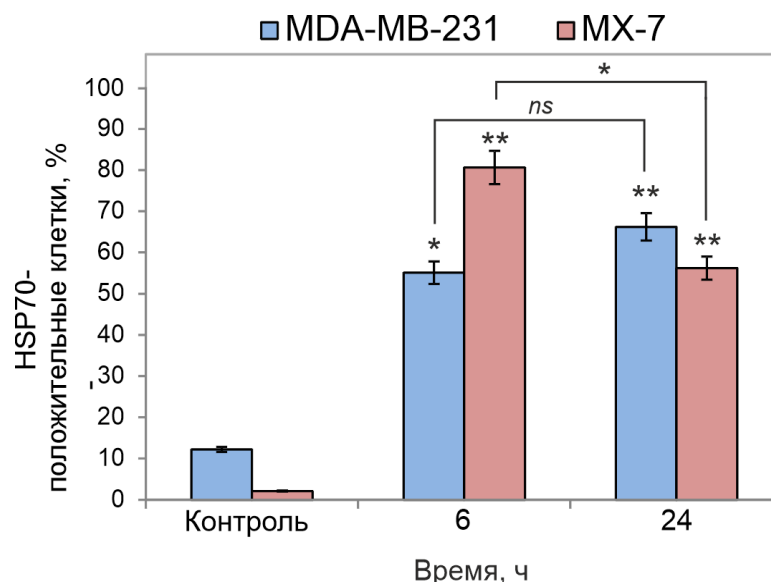


Рис. 15. Экспозиция белка теплового шока HSP70 под действием RL2. Клетки MDA-MB-231 и MX-7 обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл) в течение 6-24 ч и анализировали методом проточной цитометрии. Данные представлены как среднее значение количества HSP70-положительных клеток по двум независимым экспериментам $\pm$ SD. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$; ** для $p < 0.01$.

3.1.1.3. Изменение уровня внеклеточного АТФ под действием RL2

Молекулы АТФ являются мультифункциональными регуляторами гомеостаза клетки и ее взаимодействия с окружающими клетками. Выход АТФ во внеклеточное пространство является одним из признаков иммуногенной клеточной гибели. Для анализа уровня внеклеточного АТФ, клетки MDA-MB-231 и MX-7 инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) в течение 4-24 ч, после чего образцы культуральной среды отбирали и анализировали методом иммуноферментного анализа. Инкубация опухолевых клеток с RL2 в течение 4 ч не вызывала достоверного увеличения количества внеклеточного АТФ (Рис. 16). Более продолжительная инкубация с RL2 (20-24 ч) вела к достоверному увеличению концентрации внеклеточного АТФ для обеих клеточных линий. Ранее уже было показано, что RL2 вызывает митофагию опухолевых клеток, которая сопровождается снижением митохондриального потенциала клеток и уровня клеточного АТФ, что дополнительно свидетельствует в пользу того, что RL2 стимулирует выход АТФ вследствие нарушения целостности митохондрий [15,214].

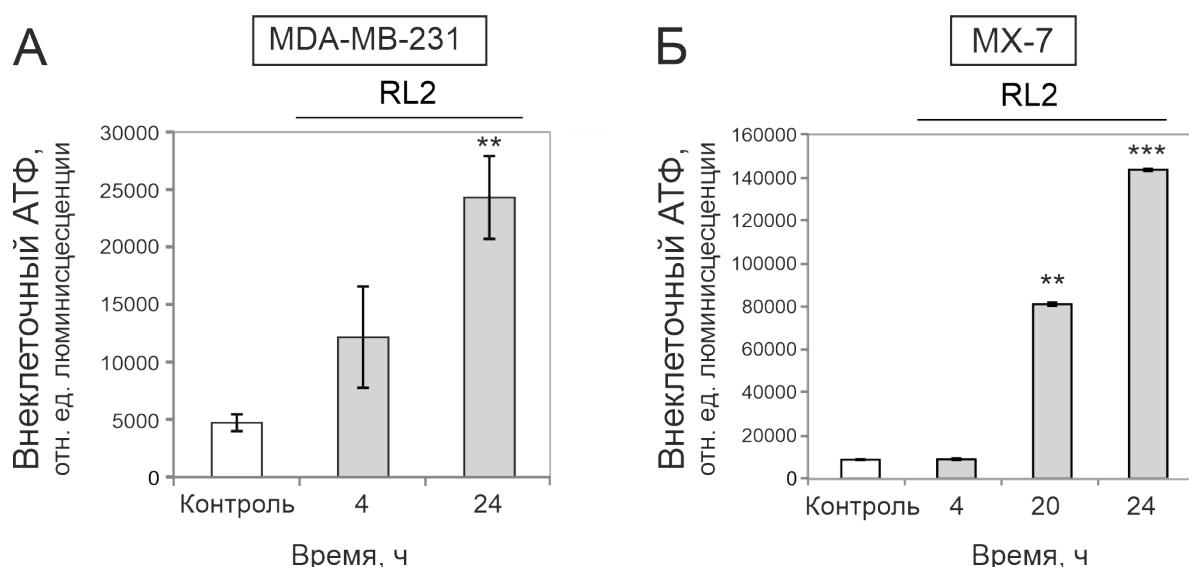


Рис. 16. Относительное количество АТФ в среде при культивировании клеток в присутствии RL2. Клетки MDA-MB-231 (**А**) и MX-7 (**Б**) инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) в течение 4-24 ч. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены ** для $p < 0.01$, *** для $p < 0.01$.

3.1.1.4. Изменение уровня внеклеточного и клеточного HMGB1 под действием RL2

В процессе гибели клетки по иммуногенному типу происходит выход ядерного негистонового белка HMGB1 во внеклеточное пространство. HMGB1 представляет собой сигнал опасности, который может стимулировать фагоцитоз погибающих опухолевых клеток дендритными клетками. Выход HMGB1 может быть детектирован как по изменению количества HMGB1 в культуральной среде методом иммуноферментного анализа (ИФА), так и по изменению суммарного клеточного HMGB1 после обработки индуктором ICD методом Вестерн-блота. При высвобождении HMGB1 при индукции ICD противоопухолевыми препаратами показано, что уровень внутриклеточного белка HMGB1 также снижается [5].

Динамика изменения содержания HMGB1 в культуральной среде клеток MDA-MB-231 и MX-7 после обработки RL2 показала, что инкубация в течение 3 ч недостаточна для стимуляции выхода HMGB1 из клеток. Более продолжительная инкубация (12-24 ч) с RL2 вызывала увеличение концентрации HMGB1 в культуральной среде в 5-7 раз по сравнению с контрольными необработанными клетками (Рис. 17 А, Б). Можно видеть, что доксорубин также стимулировал увеличение концентрации HMGB1 в культуральной среде клеток через 24 ч обработки, однако менее эффективно, чем RL2. Анализ общего клеточного HMGB1 методом Вестерн-блота показал снижение внутриклеточного HMGB1: в процессе инкубации с RL2 происходило линейное уменьшение количества внутриклеточного HMGB1 (Рис. 17 В-Е).

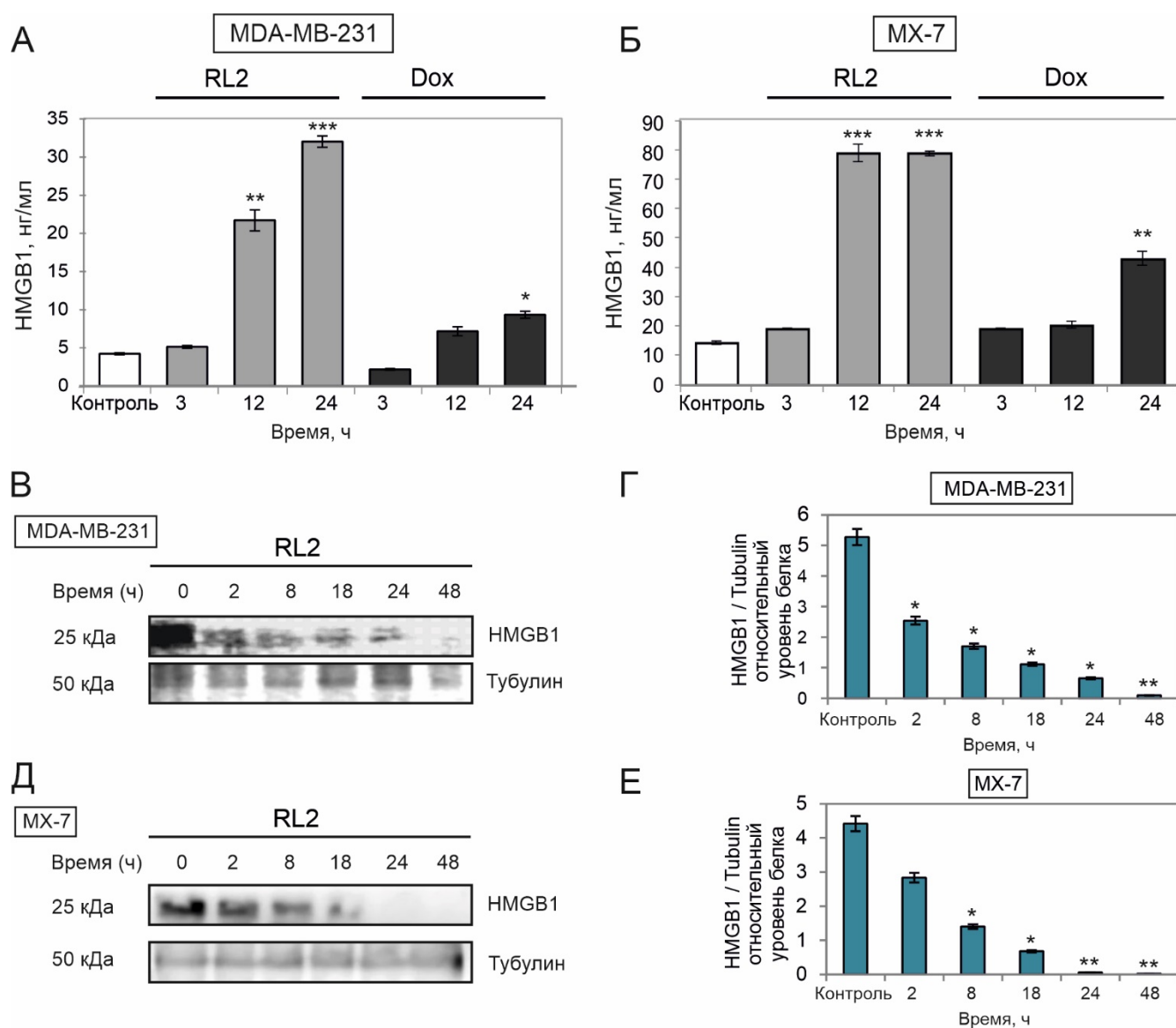


Рис. 17. Изменение уровня HMGB1 под действием RL2. Клетки MDA-MB-231 и MX-7 обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл) или доксорубицином (Dox, 0.2 мкМ) в течение 2-48 ч. **А, Б.** Внеклеточный HMGB1 измеряли в культуральной среде клеток MDA-MB-231 и MX-7, обработанных RL2 и Dox. Культуральную среду от обработанных клеток отбирали и анализировали методом ИФА при помощи набора HMGB1 ELISA KIT. **В, Д.** Репрезентативные изображения Вестерн-блот анализа лизатов клеток MDA-MB-231 (**В**) и MX-7 (**Д**), обработанных RL2 в течение 2-48 ч. В качестве контроля использовали β -тубулин. **Г, Е.** Денситометрический анализ данных Вестерн-блотов с использованием программного пакета Gel-Pro Analyser 3.1. Данные представлены как относительное среднее значение $\pm$ SD, нормализованное к уровню β -тубулина. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$; ** для $p < 0.01$.

Таким образом, продемонстрировано уменьшение клеточного HMGB1, связанное с его высвобождением из RL2-обработанных клеток. Высокий уровень высвобожденного HMGB1 предпочтителен для ICD, поскольку позволяет эффективно активировать рецепторы TLR4 и RAGE на иммунных клетках, что является важным критерием, необходимым для запуска ICD [215]. Однако нужно учитывать, что выход большого количества HMGB1 также является маркером прогрессирующего некроза или внезапного повреждения, поскольку в этих случаях хроматин повреждается необратимо, и HMGB1 пассивно выделяется из клетки, стимулируя продукцию провоспалительных цитокинов и усиливая воспалительные процессы [106]. Активная секреция HMGB1 при иммуногенном апоптозе происходит за счет выхода HMGB1 из комплекса с поврежденными хромосомами в результате процессов ацетилирования гистонов, гиперацетилирования и монометилирования HMGB1. Таким образом, межклеточный сигналинг посредством внеклеточного HMGB1 неоднозначен при индукции клеточной гибели как маркер эффективности противоопухолевого препарата [107].

Таким образом, показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 вызывает активацию основных молекулярных маркеров, позволяющих говорить о иммуногенном типе клеточной гибели: транслокацию кальретикулина и HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану, выход АТФ и HMGB1 во внеклеточное пространство.

3.1.2. Исследование эффекта вакцинации клетками, обработанными рекомбинантным аналогом лактапина RL2, in vivo

Клетки, погибающие с активацией маркеров иммуногенной гибели, должны вызывать эффект противоопухолевой вакцинации с развитием специфического противоопухолевого иммунного ответа. Поскольку было обнаружено, что препарат RL2 вызывает в клетках изменение маркеров иммуногенной гибели в культуре, важно было исследовать вакцинирующий эффект опухолевых клеток, предварительно обработанных RL2. Эксперименты проводили согласно стандартной схеме, которая рекомендована для исследования эффекта вакцинации (Рис. 4) [55]: клетки *in vitro* инкубируют с индуктором ICD и трансплантируют иммунокомпетентным животным подкожно. Следующим этапом является вторая трансплантация живых опухолевых клеток той же линии; контрольным животным дважды трансплантируют живые опухолевые клетки. Ревакцинацию опухолевыми клетками чаще всего проводят через 7-10 дней после иммунизации погибающими клетками [43,144,146,187]. Это связано с тем, что иммунокомпетентные опухоли обычно растут быстро, и масса опухоли увеличивается экспоненциально, поэтому нецелесообразно ждать 14 дней для формирования полной иммунной реакции на опухолевые антигены, когда опухоли в контрольной группе,

которым перевели живые опухолевые клетки, станут слишком большими для продолжения эксперимента. Такая схема позволяет моделировать ситуацию, когда при терапии индуктором ICD *in vivo* любого опухоленосителя, гибнущие уже в организме опухолевые клетки позволяют активировать специфический иммунный ответ в отношении их антигенов.

Поскольку в экспериментах *in vitro* мы показали, что RL2 вызывает активацию маркеров иммуногенной клеточной гибели в опухолевых клетках рабдомиосаркомы мыши MX-7 и опухолевых клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, эти клеточные модели были предпочтительны для дальнейших экспериментов *in vivo*. Клетки MDA-MB-231 являются опухолевыми клетками человека, поэтому могут быть трансплантированы только иммунодефицитным мышам, не имеющим полноценно работающей иммунной системы, что делает невозможным оценить эффект вакцинации при индукции ICD. Таким образом, опухолевую линию рабдомиосаркомы мыши MX-7, опухоленосительную при трансплантации сингенным иммунокомпетентным мышам СЗН/Не, можно считать подходящей моделью для исследования вакцинирующего эффекта клеток, погибающих под действием RL2 *in vivo*.

3.1.2.1. Анализ жизнеспособности опухолевых клеток, трансплантируемых животным после индукции в них иммуногенного апоптоза

Для исследования эффекта вакцинации опухолевыми клетками с индуцированной в них ICD, важно, чтобы максимальное количество трансплантируемых клеток находилось в стадии гибели. Жизнеспособность клеток рабдомиосаркомы мыши MX-7 после обработки RL2 (0.3 мг/мл) или доксорубицином (0.2 мкМ) анализировали методом проточной цитометрии с окрашиванием Аннексином V-FITC, который связывается с фосфатидилсерином, экспонированным на внешней клеточной мембране погибающих клеток. Результаты анализа представлены на рисунке 18.

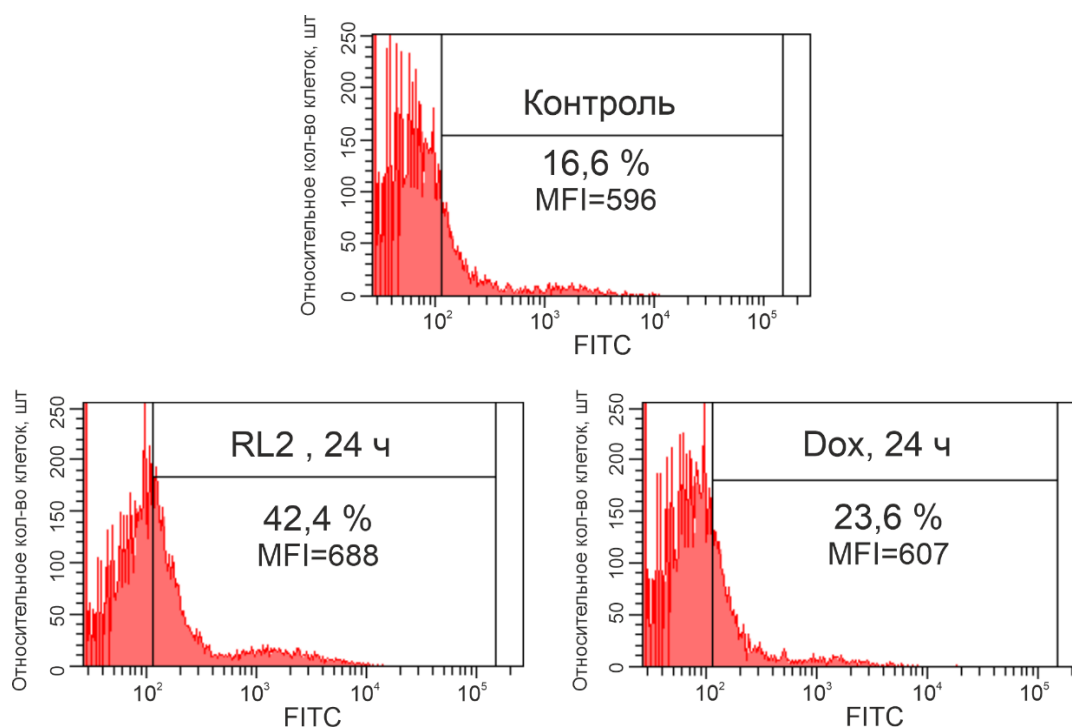


Рис. 18. Анализ апоптоза в клетках MX-7, обработанных RL2 или доксорубицином (Dox) и предназначенных для вакцинации мышей СЗН/Не. Клетки MX-7 инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) или Dox (0.2 мкМ) в течение 24 ч, затем образцы окрашивали конъюгатом FITC-Annexin-V, после чего анализировали на проточном цитометре. Анализ доли клеток MX-7 с экспонированным фосфатидилсеринном после обработки RL2 или Dox в канале FITC ($E_x=494$ нм, $E_m=520$ нм). MFI – средняя интенсивность флуоресценции в канале FITC. Характерный пример анализа.

Можно видеть, что среди клеток, инкубированных с RL2 и предназначенных для трансплантации, 42% клеток экспонировали фосфатидилсерин (Annexin V-положительные) и 23% среди клеток, инкубированных с доксорубицином (Рис. 18). Таким образом, для трансплантации использовали популяцию клеток, в которых только часть была Annexin V-положительной.

3.1.2.2. Оценка эффекта вакцинации при трансплантации клеток MX-7, обработанных RL2

Для анализа вакцинирующего эффекта трансплантации опухолевых клеток MX-7, обработанных RL2, клетки были трансплантированы подкожно мышам СЗН/Не. Экспериментальной группе подкожно вводили клетки MX-7, обработанные RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч), а контрольным мышам вводили живые клетки (Рис. 19 А). Животных, которым трансплантировали клетки, обработанные доксорубицином (0.2 мкМ, 24 ч), использовали в качестве положительного контроля. Через 8 дней после трансплантации погибающих клеток, всем мышам трансплантировали живые клетки MX-7 в противоположный бок. Было обнаружено,

что к 70-му дню после первой трансплантации выживаемость мышей в группе RL2 составила 70%, в группе Dox все мыши были живы (Рис. 19 Б). У 50% мышей в обеих экспериментальных группах – RL2 и Dox, не было обнаружено опухолей в месте трансплантации живых опухолевых клеток (Рис. 19 В). Таким образом, трансплантация опухолевых клеток MX-7, погибающих под действием RL2 и доксорубидина, вызывает частичную иммунизацию, и мыши, которым трансплантировали обработанные клетки, были частично защищены от роста опухолевого узла, сформированного повторной трансплантацией опухолевых клеток. Однако, выживаемость мышей, которым трансплантировали клетки, обработанные доксорубицином, была выше, чем в группе с RL2.

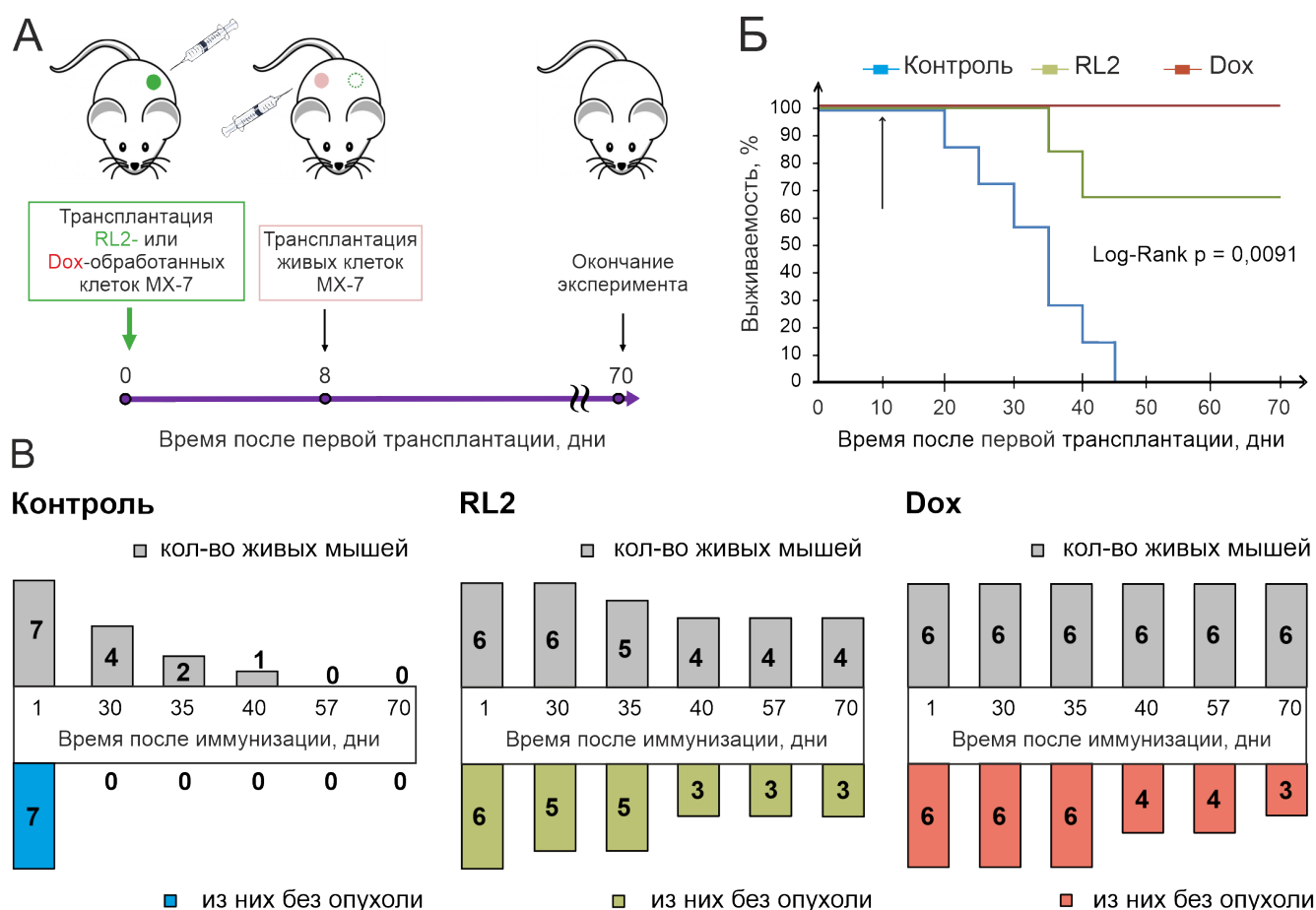


Рис. 19. Оценка эффекта вакцинации мышей СЗН/Не клетками MX-7, обработанными рекомбинантным аналогом лактапина RL2 (0.3 мг/мл) или доксорубицином (Dox, 0.2 мкМ) в течение 24 ч. **А.** Схема иммунизации. Мышей СЗН/Не иммунизировали обработанными RL2 или Dox клетками MX-7 (7×10^5 клеток/животное) – точка «0» на оси абсцисс. Через восемь дней мышам вводили живые клетки MX-7 (7×10^5). **Б.** Количество живых мышей и мышей без опухолей в группах в динамике. **В.** Продолжительность жизни вакцинированных мышей. Различия между группами рассчитаны с использованием непараметрической статистики, критерия хи-квадрат Пирсона, достоверно при $p < 0.05$. Кривые выживаемости Каплана-Майера

и статистику Log-Rank рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (Сан-Диего, США).

Показанная вакцинная эффективность RL2 была сравнима с таковыми у описанного белкового индуктора ICD – RIG-I-подобной геликазы (RLH), по данным литературы [146]. Дьювел с соавторами продемонстрировали, что вакцинация мышей C57BL/6 RLH-обработанными опухолевыми клетками Panc02 индуцировала защитный противоопухолевый иммунитет у шести из восьми мышей [146]. Более того, клетки, обработанные RL2, были более эффективными в модели профилактической вакцинации, чем, например, пептидный индуктор ICD – RT53 (синтетический противоопухолевый пептид, относящийся к классу CPP). Было показано, что вакцинация клетками, обработанными RT53, приводила только к торможению роста опухоли в месте трансплантации живых клеток по сравнению с контрольной группой, и все мыши имели опухоли в сайте повторной трансплантации [144]. Эффективность активации противоопухолевого иммунного ответа RL2-обработанных клеток сравнима с эффективностью, показанной для других пептидных индукторов ICD.

Таким образом, полученные *in vivo* результаты подтверждают активацию противоопухолевого иммунного ответа при трансплантации опухолевых клеток, обработанных RL2, причем количество мышей без опухоли было одинаковым в группе с RL2 и доксорубицином, однако выживаемость мышей в группе с доксорубицином была выше на 30%.

3.1.2.3. Оценка эффекта вакцинации при трансплантации клеток MX-7, обработанных RL2, сортированных по йодиду пропидия

Противоопухолевую вакцинацию можно осуществлять как суммарным пулом обработанных клеток, так и частью клеток, в которых подтверждено состояние гибели. Для оценки вклада некротической популяции клеток в индукцию иммуногенной клеточной гибели, клетки рабдомиосаркомы мыши MX-7 *in vitro* инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) в течение 24 ч и, далее, методом проточной сортировки FACS, отбирали популяцию клеток, положительных по йодиду пропидия (PI⁺-клетки) (Рис. 20). При любом типе клеточной гибели PI⁺-клетки оценивают как клетки в состоянии истинной гибели. Изначально для выявления PI⁺-клеток выделяли популяцию P1 (Рис. 20) по размеру клеток и гранулярности для исключения клеточного дебриса, после чего внутри популяции P1 выделяли P2, положительную по PI, и собирали такие клетки в отдельную пробирку. Клетки популяции P2 трансплантировали иммунокомпетентным животным подкожно в количестве 4×10^5 клеток/мышь, поскольку показано, что для активации

эффекта вакцинации погибающими клетками *in vivo* достаточно использовать дозу от 1×10^5 до 3×10^6 клеток/мышь в зависимости от типа опухолевых клеток [4,216,217].

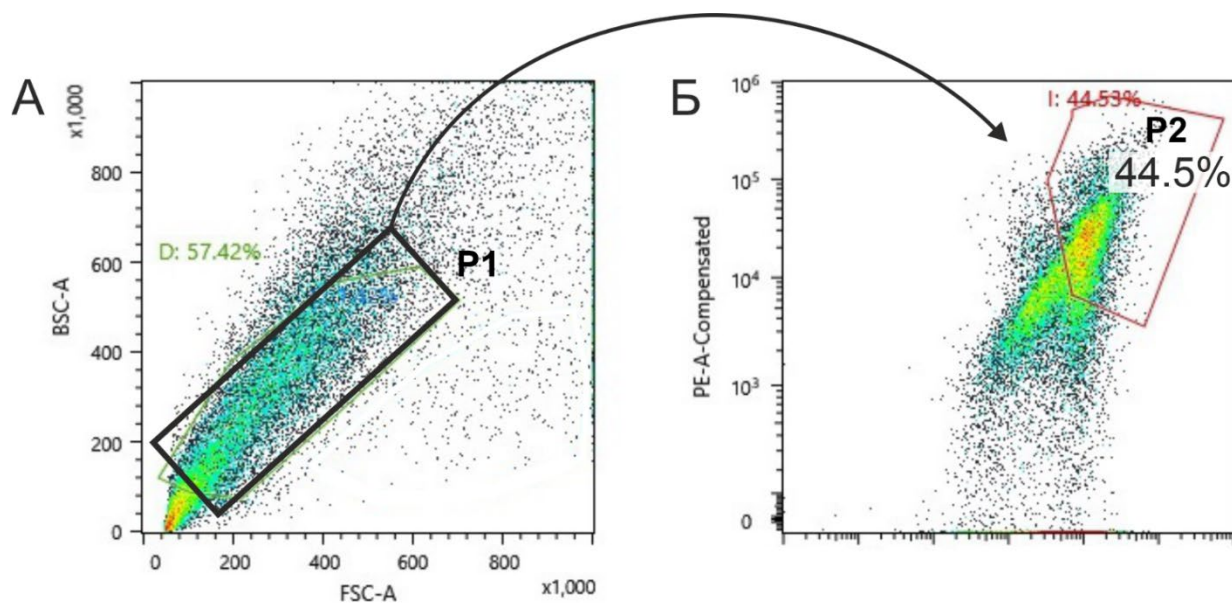


Рис. 20. Выбор популяции для проточной сортировки клеток MX-7, обработанных RL2. Клетки MX-7 инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) в течение 24 ч, после чего окрашивали йодидом пропидия (PI) и анализировали на проточном клеточном сортере. **А.** Выбор анализируемой популяции клеток (P1) по параметрам прямого (FSC) и бокового (BSC) светорассеивания. **Б.** Выбор популяции (P2) для сортировки по интенсивности флуоресценции PI в канале PE (Ex=496 нм, Em=578 нм).

Контрольным животным трансплантировали живые опухолевые клетки. Через 7 дней после первой трансплантации проводили повторную трансплантацию живых опухолевых клеток (4×10^5 клеток/мышь) всем животным в противоположный бок и наблюдали за ростом опухоли. Эксперимент был остановлен после начала гибели животных в контрольной группе, что соответствовало 25-му дню после трансплантации живых опухолевых клеток. Через 25 дней после повторной трансплантации живых клеток, в группе RL2 у 3х из 8 мышей не развилась опухоль.

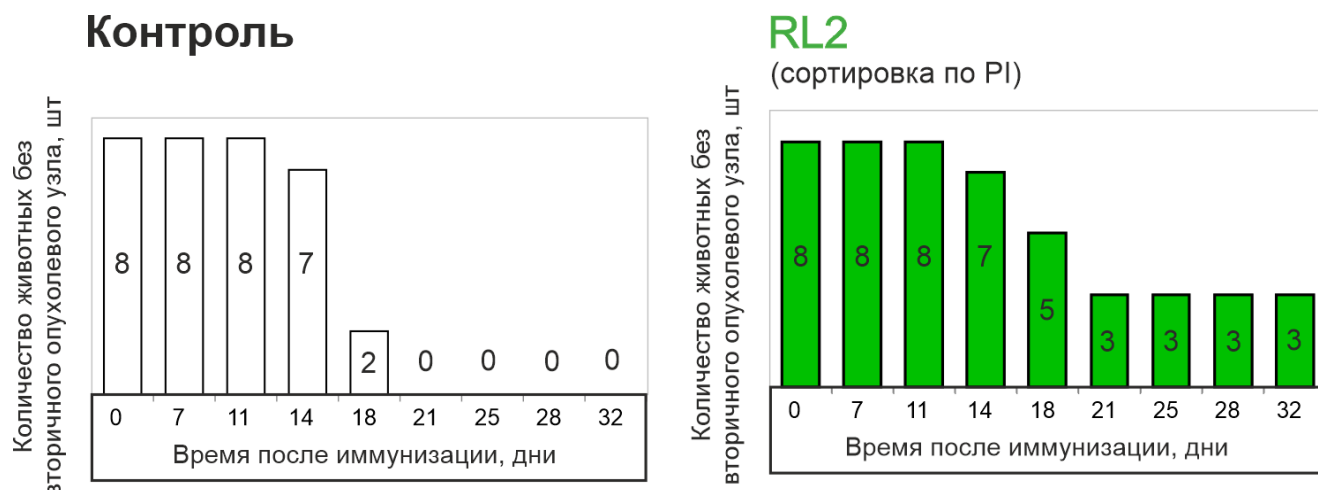


Рис. 21. Оценка эффективности противоопухолевой вакцинации мышей СЗН/Не клетками МХ-7 в состоянии позднего апоптоза/некроза, индуцированного обработкой RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч). Показана динамика появления опухолевого узла экспериментальных животных в сайте второй трансплантации (живых опухолевых клеток). Различия между группами рассчитаны с использованием непараметрической статистики, критерия хи-квадрат Пирсона, достоверно при $p < 0.05$.

Таким образом, было установлено, что эффект вакцинации при иммунизации клетками, обработанными рекомбинантным аналогом лактапина RL2 в состоянии позднего апоптоза/некроза (PI^+ популяция), составил 37%. По сравнению с эффектами вакцинации суммарным пулом RL2-обработанных клеток, описанными в предыдущих экспериментах, в этом эксперименте эффект вакцинации был ниже (37% против 50%).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что вакцинация суммарным пулом клеток, как в состоянии раннего апоптоза (PI^-), так и клетками в состоянии позднего апоптоза/некроза (PI^+) является предпочтительной с точки зрения индукции противоопухолевого иммунитета. В литературе уже описаны результаты сравнения вакцинации опухолевыми клетками в состоянии некроза и апоптоза. Шеффер с соавторами [28] трансплантировали погибающие опухолевые клетки, в одних из которых γ -облучением был индуцирован апоптоз, а в других – последовательными процедурами замораживания/оттаивания индуцирован некроз. Они показали, что только у животных, вакцинированных апоптотическими клетками, не происходило развития опухоли в 75%-100% случаев при последующей трансплантации живых клеток. У животных, вакцинированных некротическими клетками по той же схеме, лишь 0-30% животных оставались без опухоли при трансплантации живых опухолевых клеток. Более того, они показали, что *in vivo* дендритные клетки в сайте инъекции погибающих опухолевых клеток более эффективно захватывали опухолевые антигены и активировали $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки в случае клеток в состоянии апоптоза, чем некроза. Такие результаты можно объяснить тем, что

некротические клетки быстрее подвергаются фагоцитозу макрофагами, не способными осуществлять кросс-презентацию опухолевых антигенов, чем апоптотические клетки [67]. Некротические клетки стимулируют секрецию макрофагами IL-10 и TGF- β , что подавляет системный Т-клеточный иммунный ответ [218].

Таким образом, полученные данные для RL2-обработанных клеток подтверждают ослабление вакцинирующего потенциала некротических/вторично некротических клеток по сравнению с суммарным пулом апоптотических и некротических клеток при использовании одного и того же индуктора ICD.

3.1.2.4. Влияние этилпирувата, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО), на эффективность вакцинации RL2-обработанными клетками

Для преодоления надзора иммунной системы опухоли реализуют различные механизмы супрессии иммунной системы или толерантности к ее воздействию. Наряду с экспрессией CD31 и CD47, предотвращающих захват антигенпрезентирующими клетками, секрецией иммуносупрессорных цитокинов (TGF β , IL-10), метаболические ферменты опухоли также могут регулировать иммуносупрессию в микроокружении [8–11]. К метаболическим ферментам микроокружения опухоли с функцией иммуносупрессии относят индуцибельную NO-синтазу, индоламин 2,3-диоксигеназу (ИДО), триптофан 2,3 диоксигеназу, аргиназу и другие [12,13]. Индоламин-2,3-диоксигеназа является одним из основных ферментов кинуренинового пути метаболизма триптофана. Повышенная экспрессия ИДО снижает количество триптофана и приводит к накоплению кинуренина и его метаболитов, которые могут блокировать пролиферацию Т-лимфоцитов, одновременно стимулируя регуляторные Т-клетки, негативно влияющие на развитие иммунной реакции [12]. Ингибиторы ИДО предотвращают формирование локального дефицита триптофана в области опухоли и способствуют функционированию Т-лимфоцитов [219], что также может содействовать развитию более эффективного противоопухолевого иммунного ответа в результате вакцинации клетками, погибающими по пути ICD.

В данном исследовании было проанализировано, может ли ингибирование индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО), усиливать эффект противоопухолевой вакцинации клетками, обработанными RL2. Для этого мыши, которым трансплантировали клетки, обработанные RL2 (0.3 мг/мл), до момента второй трансплантации живых опухолевых клеток, дополнительно получали инъекции этилпирувата (ЭП), неспецифического ингибитора ИДО, в соответствии с режимом, изображенном на рисунке 22 А. Сравнение опухолеобразования показало, что две из пяти мышей в группе RL2 были без опухоли, в группе RL2/ЭП – три из пяти, в контрольной

группе опухоли развились у всех пяти мышей (Рис. 22 Б). Анализ выживаемости вакцинированных животных показал, что в группе RL2/ЭП были живы все животные, в то время как в группе RL2 за время эксперимента погибла одна мышь с крупным опухолевым узлом, развившимся в месте первой трансплантации RL2-обработанных клеток.

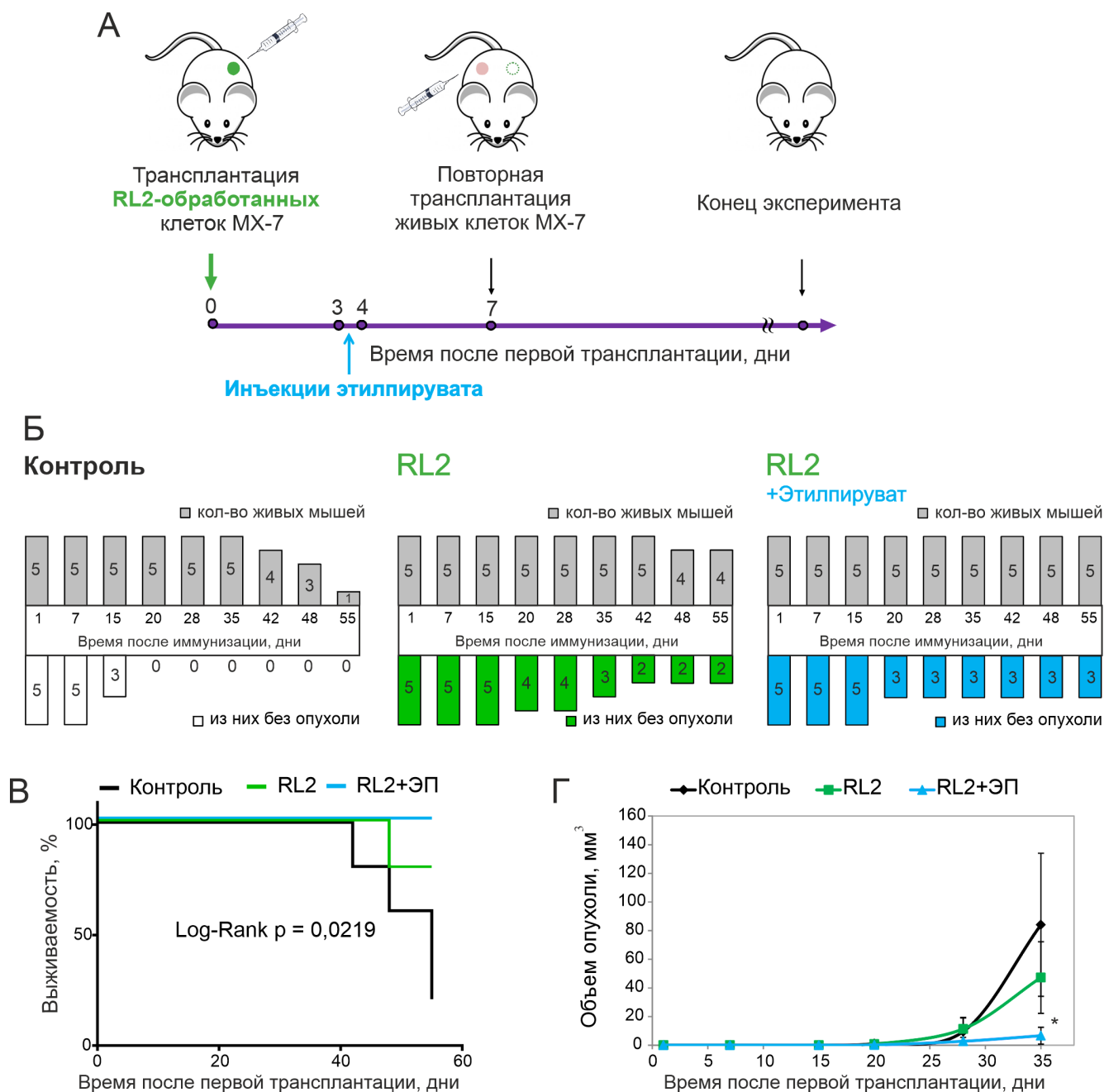


Рис. 22. Этилпируват (ЭП) усиливает эффективность противоопухолевой вакцинации клетками MX-7, обработанными RL2 (0.3 мг/мл). **А.** Схема иммунизации мышей СЗН/Не клетками MX-7, обработанными RL2 и ЭП (40 мг/кг). **Б.** Динамика количества живых мышей в группах и мышей без опухолей при трансплантации 7×10^5 клеток/мышь. **В.** Выживаемость вакцинированных мышей. **Г.** Динамика роста второго опухолевого узла. Различия между группами по количеству мышей без опухоли были рассчитаны с использованием

непараметрической статистики критерия хи-квадрат Пирсона, достоверно при $p < 0.05$. Кривые выживаемости Каплана-Майера и статистику Log-Rank рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prizm (Сан-Диего, США).

Развитие крупного опухолевого узла в месте введения RL2-обработанных клеток, наиболее вероятно, происходило вследствие присутствия живых клеток, устойчивых к RL2, среди общего пула клеток, примененных для вакцинации. Средний объем развившихся опухолей для групп RL2 и RL2/ЭП был достоверно меньше по сравнению с таковым в контрольной группе (Рис. 22 Г). Следует также отметить, что несмотря на то, что различия в количестве мышей без опухолей для RL2 и RL2/ЭП статистически недостоверны, средний размер опухолей в группе RL2/ЭП был наименьшим и был примерно в четыре раза ниже, чем в контрольной группе (Рис. 22 Г). Таким образом, ЭП оказывал положительное влияние на противоопухолевый вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток.

3.1.2.5. Влияние ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО) – 1-метилтриптофана на вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток

Для того, чтобы более полно оценить влияние ингибирования индоламин-2,3-диоксигеназы на эффект вакцинации RL2-обработанными клетками рабдомиосаркомы мыши MX-7, проводили дополнительный эксперимент на большей выборке мышей СЗН/Не, в котором мыши, иммунизированные RL2-обработанными клетками, получали 2 ингибитора: либо неспецифический – этилпируват (ЭП), либо специфический – 1-метилтриптофан (1-МТ).

Аналогично предложенной ранее схеме для ЭП, мышей СЗН/Не подкожно иммунизировали погибающими клетками MX-7, обработанными RL2 (0.3 мг/мл), и через 7 дней трансплантировали живые опухолевые клетки. 1-метилтриптофан мышам вводили через желудочный зонд после трансплантации живых клеток (всего 10 введений, каждая доза 200 мг/кг). Инъекции этилпирувата проводили аналогично предыдущему эксперименту (Рис. 23 А).

В группе RL2 в финальной точке эксперимента у четырех из десяти мышей не было опухоли в месте второй трансплантации опухолевых клеток, и только одна мышь погибла. В группе RL2/ЭП у шести из десяти мышей не было опухоли, и все животные были живы. В группе RL2/1-МТ из десяти животных четыре мыши были без опухоли, как и в группе RL2 (Рис. 23 Б). Достоверные различия по количеству мышей без опухолей было обнаружены как между контрольной группой и группами RL2 и RL2/ЭП, так и между группами RL2 и RL2/ЭП. В выбранном режиме введения 1-метилтриптофан не оказывал положительного эффекта на противоопухолевую вакцинацию клетками, обработанными RL2.

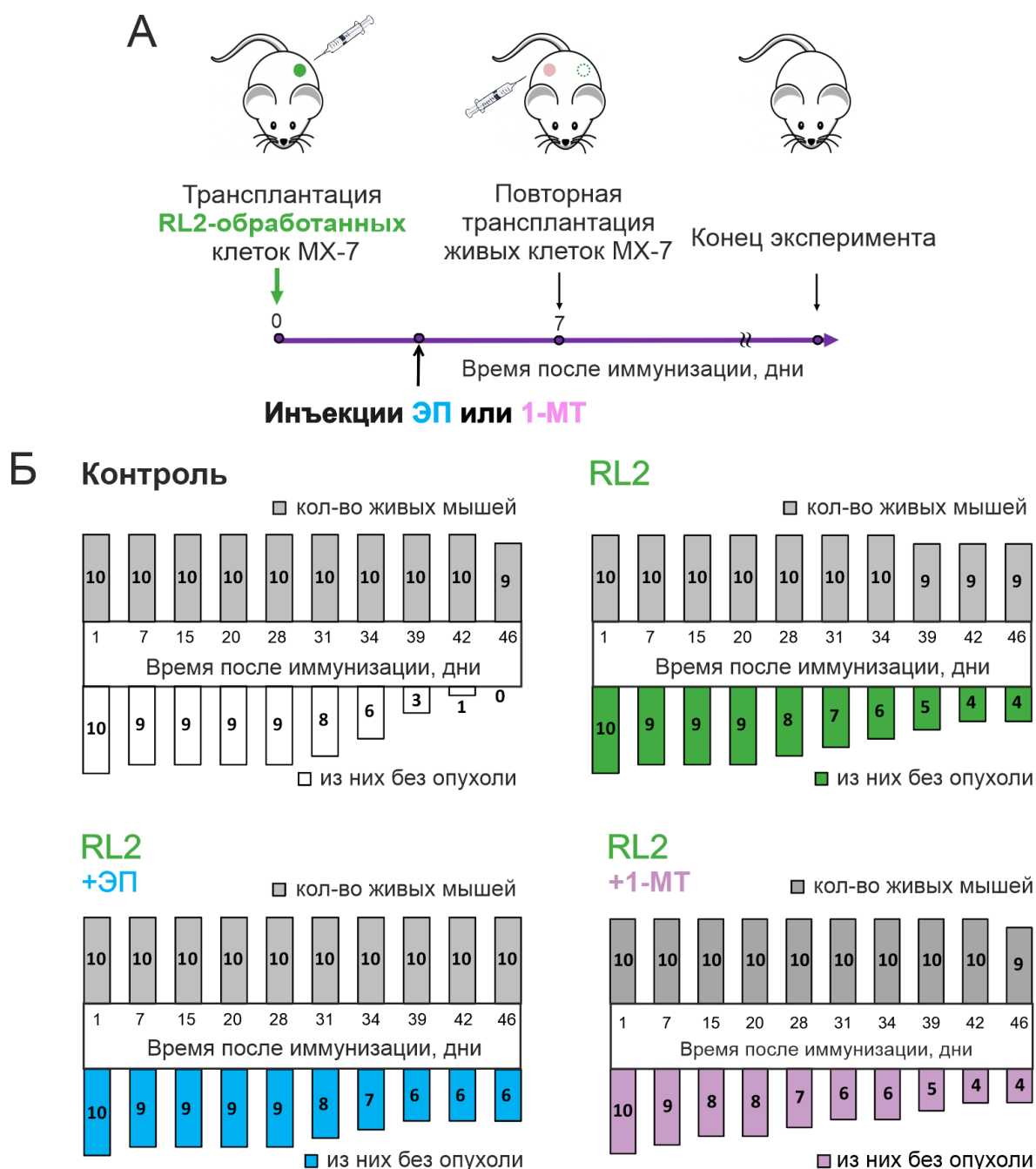


Рис. 23. Влияние этилпирувата (ЭП) и 1-метилтриптофана (1-МТ) на эффективность противоопухолевой вакцинации клетками рабдомиосаркомы MX-7, обработанными RL2 (0.3 мг/мл). **А.** Схема иммунизации мышей СЗН/Не клетками MX-7, обработанными RL2, в комбинации с ЭП (40 мг/кг) или 1-МТ (200 мг/кг). **Б.** Динамика количества живых мышей в группах и мышей без опухолей при трансплантации 7×10^5 клеток на мышь для вакцинации. Различия между группами по количеству мышей без опухоли были рассчитаны с использованием непараметрической статистики критерия хи-квадрат Пирсона, достоверно при $p < 0.05$.

Разница в эффекте, который вызывает этилпируват в отличие от 1-метилтриптофана, может быть связана с различным механизмом действия данных ингибиторов. Индоламин-2,3-диоксигеназа – это фермент, который отвечает за распад триптофана до кинуренина. 1-метилтриптофан и этилпируват ингибируют индоламин-2,3-диоксигеназу по механизму конкурентного ингибирования, однако, данные препараты также имеют другие мишени, которые могут влиять на вакцинирующий эффект погибающих клеток. Этилпируват – это производное пировиноградной кислоты, а 1-метилтриптофан – это метилированное производное триптофана. Так, например, известно, что лечение этилпируватом ингибирует ангиогенез в опухолях путем ингибирования сигнального пути NF- κ B, подавляет рост рака желудка посредством регуляции путей HMGB1-RAGE и Akt, а также показана его эффективность для лечения других, не связанных с онкологией заболеваний. Например, этилпируват является перспективным средством для лечения больных с множественными воспалительными поражениями органов [220]. Напротив, 1-метилтриптофан – это более селективный ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы, и в литературе описаны его противоопухолевые эффекты в основном за счет ингибирования этого фермента [219]. Возможно, этилпируват усиливает вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток не только за счет ингибирования ИДО, но через другие механизмы, например, подавляя воспалительные реакции в месте трансплантации гибнущих клеток.

Таким образом, согласно трем независимым экспериментам по трансплантации суммарного пула клеток, погибающих под действием RL2, описанным выше, вакцинирующий противоопухолевый эффект в среднем развился у 43.3% вакцинированных мышей в группе RL2. Среди двух выбранных ингибиторов ИДО только этилпируват оказывал положительное влияние на вакцинацию RL2 обработанными клетками. В группе RL2/ЭП вакцинирующий противоопухолевый эффект развился в среднем у 60% мышей. В группе, получавшей 1-метилтриптофан, усиления эффекта вакцинации RL2-обработанными клетками не было обнаружено.

3.1.2.6. Влияние ингибирования индоламин-2,3-диоксигеназы на Т- и В-лимфоциты иммунизированных мышей

Чтобы оценить влияние ингибирования ИДО на динамику Т- и В-клеток в крови мышей, были проанализированы образцы крови иммунизированных животных. Для анализа брали образцы, взятые через день после иммунизации опухолевыми клетками, а также через день и через восемь дней после трансплантации живых клеток (Рис. 24). Мононуклеары крови типировали методом проточной цитометрии с применением антител к CD45, CD3 и CD19. Фенотипирование CD3 и CD19-положительных клеток проводили среди CD45⁺-положительных

клеток (Рис. 24 А, Б). Обнаружено, что трансплантация живых клеток МХ-7 приводила к уменьшению популяции В-клеток ($CD3^+/CD19^+$) в крови мышей через восемь дней после их трансплантации в группах RL2/ЭП и контрольной по сравнению с группой здоровых мышей (Рис. 24 В). Уменьшение популяции В-клеток в группе RL2/ЭП началось раньше, чем в контрольной группе, уже в первый день после заражения живыми клетками МХ-7. Таким образом, инъекции этилпирувата стимулировали уменьшение популяции В-клеток. Доля Т-клеток ($CD3^+/CD19^-$) среди мононуклеаров крови не различались между группами с трансплантированными опухолевыми клетками и для всех групп наблюдалось увеличение доли этих клеток по сравнению с контрольными здоровыми животными без трансплантаций (Рис. 24 Г). Известно, что активность ИДО и образующиеся в результате ее ферментативной активности продукты метаболизма являются основными иммуносупрессорными факторами в незрелых миелоидных супрессорных клетках (MDSC), которые представляют собой популяцию миелоидных клеток-предшественников [221]. Было показано, что ИДО необходима для иммуносупрессивной активности MDSC в отношении Т-клеток, которая может блокироваться ингибитором ИДО 1-метилтриптофаном [222]. Поскольку во всех группах с трансплантацией опухолевых клеток относительное количество $CD3^+/CD19^-$ было увеличено по сравнению с таковыми у здоровых животных без опухоли, мы полагаем, что такое увеличение стимулировалось реакцией на трансплантацию клеток с небольшим развитием локального воспаления, а не было опосредовано регуляцией ИДО. В этом случае, общее количество Т-клеток не отражает напрямую Т-клеточный ответ на активность ИДО. В целом, указанный дуализм функции ИДО должен быть принят во внимание для дальнейшего рассмотрения его роли в активации иммунной системы клетками, гибнущими по пути ICD.

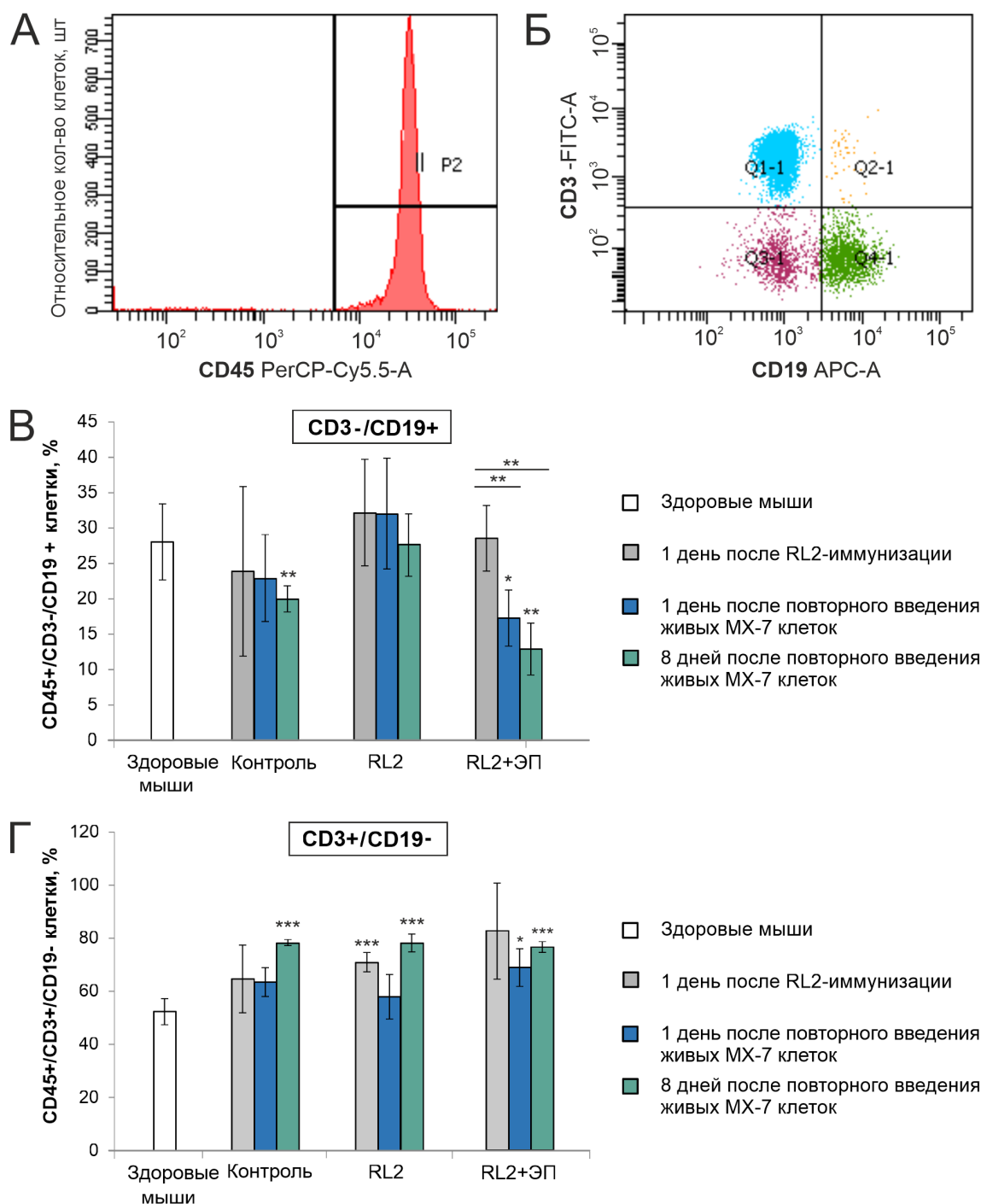


Рис. 24. Распределение популяций иммунных клеток среди мононуклеаров периферической крови (PBMC). PBMC выделяли из образцов цельной крови, окрашивали флуоресцентно-меченными моноклональными антителами к CD45, CD3 и CD19 и анализировали методом проточной цитометрии. Доля положительных клеток показана в процентах от общего количества CD45-положительных клеток. **А, Б.** Гейтирование по CD45⁺-клеткам для анализа CD3⁺/CD19⁻-популяций (квадрант Q1-1) и CD3⁻/CD19⁺-популяций (квадрант Q4-1) на примере образца от здоровой мыши. **В.** В-лимфоциты. **Г.** Т-лимфоциты. Статистические различия между контрольной (здоровые мыши) и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$; ** для $p < 0.01$.

3.2. Рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующий GM-CSF человека и лактаптин, как индуктор ICD

Онколитические вирусы, такие как: аденовирусы, реовирусы, парвовирусы, коксаки вирусы, вирусы осповакцины, вирус болезни Ньюкасла, вирус простого герпеса, вызывают гибель клетки-хозяина с высвобождением DAMPs, соответствующих маркерам ICD, и представлением репертуара опухоль-ассоциированных антигенов дендритным клеткам, что необходимо для формирования адаптивного противоопухолевого иммунного ответа [152].

Для усиления противоопухолевых свойств вируса осповакцины (BOB) на основе штамма Л-ИБП вируса осповакцины генно-инженерным путем были сконструированы рекомбинантные вирусы осповакцины VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo, кодирующие гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) человека и проапоптотические белки лактаптин и апоптин, соответственно [20,223]. Апоптин описан как неструктурный белок вируса анемии кур с выраженными апоптоз-индуцирующими свойствами в отношении более чем семидесяти опухолевых линий клеток в культуре и модельных опухолей у животных [224]. Ген GM-CSF человека был встроен в геном рекомбинантных вирусов в структурной части гена тимидинкиназы вируса для усиления противоопухолевого иммунного ответа. При заражении рекомбинантными вирусами GM-CSF секретируется во внеклеточное пространство, привлекая гранулоциты и макрофаги в очаг опухоли. Показано, что встройка GM-CSF в рекомбинантные онколитические вирусы способна усиливать активацию маркеров иммуногенной гибели клеток [225].

Рекомбинантные вирусы содержали встройку гена лактаптина или апоптина в районе гена *C11R*, кодирующего ростовой фактор (VGF) вируса. Для оценки вклада трансгенов апоптоз-индуцирующих белков в составе рекомбинантного вируса в индукцию ICD использовали контрольный рекомбинант VV-GMCSF-dGF, имеющий встройку гена GM-CSF человека в гене тимидинкиназы вируса, но несущий делецию гена ростового фактора вируса VGF без встройки апоптоз-индуцирующих белков (Рис. 25) [20]. Таким образом, объектами исследования были три рекомбинантных вируса: VV-GMCSF-dGF, VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo.

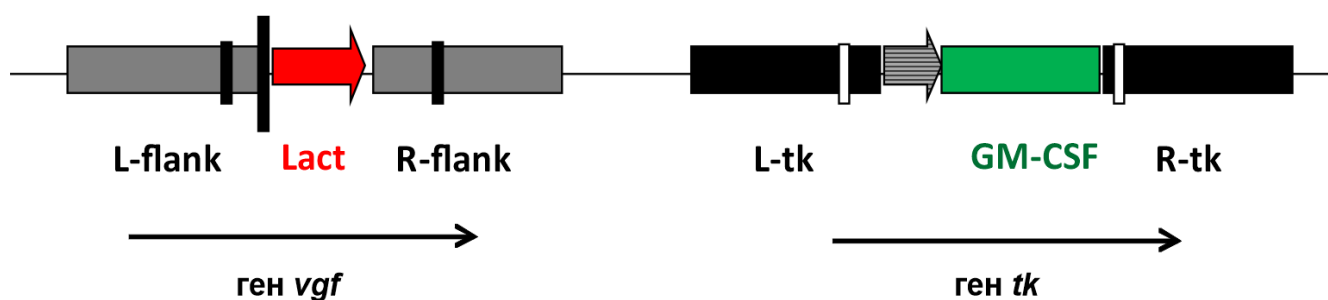


Рис. 25. Схематичное изображение структуры рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact. L/R-flank – фрагменты генома L-IVP штамма BOB, фланкирующие ген *vgf*, L/R-tk – фрагменты генома L-IVP штамма BOB, фланкирующие ген *tk*, Lact – ген лактапина, GM-CSF – ген *gmcsf* человека, *vgf* – ген вирусного ростового фактора, *tk* – ген тимидинкиназы [20].

3.2.1. Анализ активации маркеров иммуногенной гибели опухолевых клеток, зараженных рекомбинантными вирусами осповакцины, *in vitro*

Для исследования индукции иммуногенной клеточной гибели рекомбинантными вирусами осповакцины (BOB): VV-GMCSF-Lact, VV-GMCSF-Apo и VV-GMCSF-dGF, *in vitro* опухолевые клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и рабдомиосаркомы мыши MX-7 инкубировали с рекомбинантными вирусами и затем в них анализировали изменения количества и локализации характерных молекулярных маркеров ICD: кальретикулина, HSP70, АТФ и HMGB1.

3.2.1.1. Экспозиция кальретикулина на внешнюю плазматическую мембрану под действием рекомбинантных вирусов осповакцины

Для оценки изменения уровня поверхностного кальретикулина в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и рабдомиосаркомы мыши MX-7 клетки заражали тремя рекомбинантными BOB со множественностью инфекции 0.5 и 0.05 БОЕ/клетку и анализировали изменение поверхностного кальретикулина через 24-48 ч после заражения. Результаты анализа представлены на рисунке 26. Можно видеть, что все рекомбинантные вирусы (VV-GMCSF-Lact, VV-GMCSF-Apo и контрольный вирус VV-GMCSF-dGF) вызывают транслокацию CRT на внешнюю мембрану клетки.

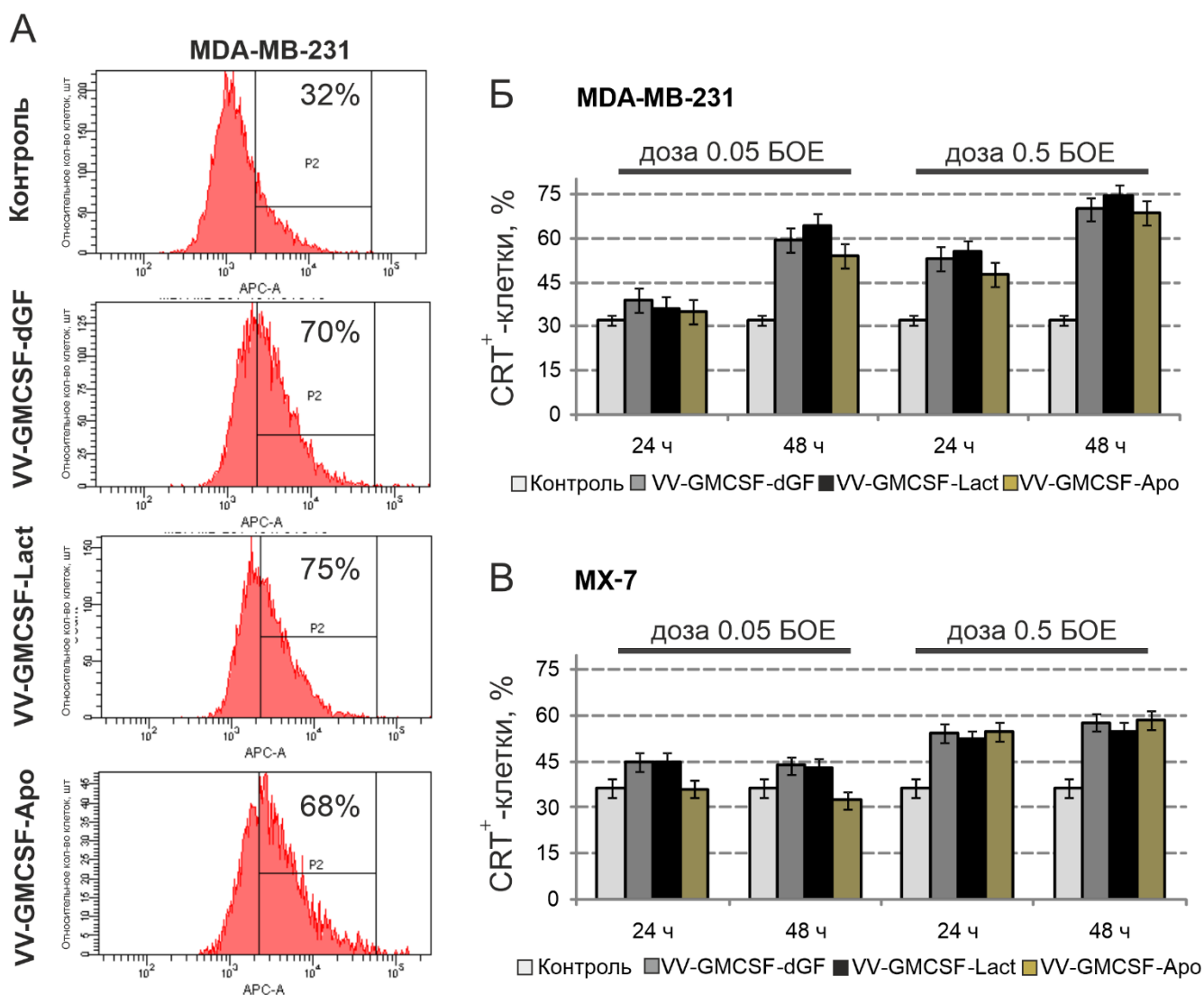


Рис. 26. Изменение уровня кальретикулина (CRT) в опухолевых клетках, зараженных рекомбинантными BOB: VV-GMCSF-dGF, VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo. **А.** Пример распределения CRT-положительных популяций в клетках MDA-MB-231 через 48 ч инкубации с рекомбинантными вирусами (множественность инфекции – 0.5 БОЕ/клетку). **Б.** Гистограммы распределения CRT-положительных клеток (популяция P2) после обработки вирусами (множественность инфекции: 0.05 и 0.5 БОЕ/клетку), относительно контрольных необработанных клеток.

Достоверных различий по уровню экспозиции CRT между образцами клеток, зараженными указанными рекомбинантными вирусами, не обнаружено. В случае клеточной линии MX-7, экспозиция CRT происходит только при высоком титре вирусных частиц (0.5 БОЕ/клетку), а при низком титре (0.05 БОЕ/клетку) экспозиции кальретикулина не происходит даже при длительной вирусной инфекции (48 ч). В случае клеток MDA-MB-231 можно видеть, что экспозиция кальретикулина зависит как от множественности вирусной инфекции, так и от длительности

инкубации: увеличивается с увеличением титра вирусных частиц (0.05 БОЕ/клетку) и с продолжительностью вирусной инфекции: после 48 ч инфекции популяция клеток с фенотипом CRT⁺ была выше, чем после 24 ч инкубации.

Таким образом, при заражении опухолевых клеток рекомбинантными вирусами осповакцины VV-GMCSF-Lact, VV-GMCSF-Apo, VV-GMCSF-dGF происходит экспозиция CRT на внешней плазматической мембране, и уровень экспозиции CRT не зависит от наличия цитотоксического белка-трансгена.

3.2.1.2. Экспозиция белка теплового шока HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану под действием рекомбинантных вирусов осповакцины

Для анализа транслокации белка теплового шока HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану клеток, зараженных вирусами, в качестве препарата сравнения (индуктора ICD) использовали рекомбинантный аналог лактапина RL2. Клетки MDA-MB-231, зараженные вирусами, анализировали методом проточной цитометрии с применением антител к HSP70 без предварительной пермеабиллизации. Можно видеть, что инфицирование рекомбинантными вирусами, кодирующими лактапин и апоптин, вызывает экспозицию HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану через 24 ч вирусной инфекции (Рис. 27 А, Б). Экспозиция HSP70 была детектирована только при высокой дозе вирусной нагрузки – множественности инфекции 0.5 БОЕ/клетку. В то же время, следует отметить, что под действием рекомбинантного аналога лактапина экспозиция HSP70 происходит более эффективно, чем после инкубации с рекомбинантными вирусами (Рис. 27), что указывает на более высокий потенциал RL2 как индуктора ICD и может влиять на эффективность вакцинирующего эффекта погибающих клеток.

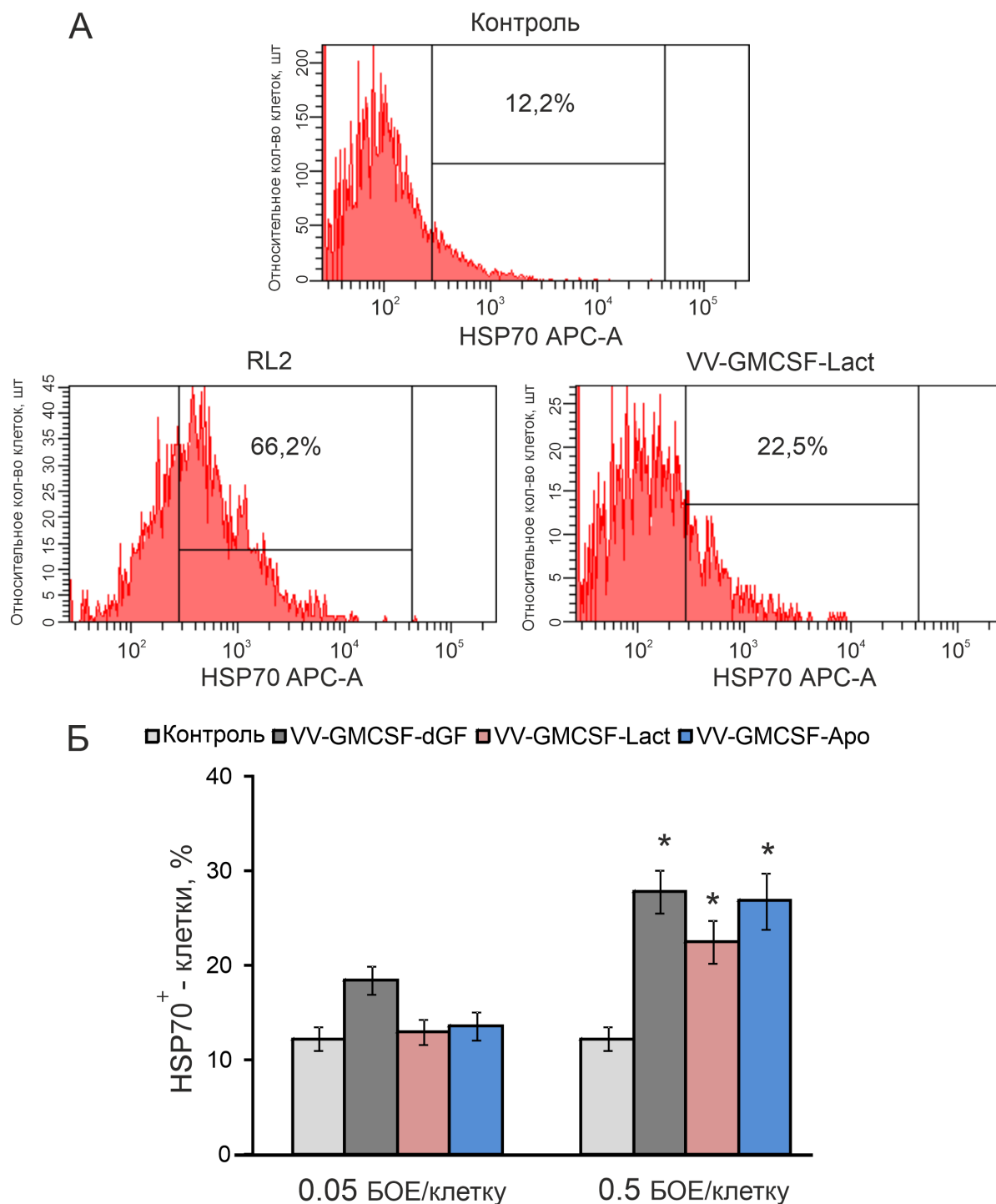


Рис. 27. Изменение экспозиции белка HSP70 на внешней плазматической мембране в опухолевых клетках MDA-MB-231. **А.** Исследование поверхностного HSP70 в обработанных клетках методом проточной цитометрии на примере распределения HSP70-положительных популяций под действием RL2 (0.3 мг/мл) и VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку) по сравнению с контролем через 24 ч инкубации. **Б.** Гистограммы распределения HSP70-положительных клеток (популяция P2) после обработки вирусами (0.05 и 0.5 БОЕ/клетку), относительно контрольных необработанных клеток. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$.

Сравнение уровня транслокации HSP70 в клетках MDA-MB-231, зараженных тремя рекомбинантами, показало, что уровень активации маркеров ICD в опухолевых клетках при заражении рекомбинантными BOB не зависит от апоптоз-индуцирующих белков апоптина и лактапина.

3.2.1.3. Изменение уровня внеклеточного АТФ при инфекции рекомбинантными вирусами осповакцины

Заражение рекомбинантными вирусами осповакцины клеток MDA-MB-231 вело к увеличению уровня внеклеточного АТФ в культуральной среде (Рис. 28). Уровень АТФ в образцах через 44 ч возрастал в ряду образцов клеток, инфицированных вирусами VV-GMCSF-Lact < VV-GMCSF-Apo < VV-GMCSF-dGF. Поздний выход АТФ связан с особенностями гибели клеток, зараженных вирусами осповакцины. Гибель клеток происходит через ~72 ч инфекции, после достаточной репликации вирусных частиц. На ранних этапах инфекции экспрессируется целый набор вирусных белков-ингибиторов программируемой клеточной гибели [226]. Стоит отметить, что свободный рекомбинантный аналог лактапина RL2 вызывал более ранний выход внеклеточного АТФ – через 20-24 ч инкубации, чем рекомбинантные вирусы осповакцины, как было показано выше, что указывает на более высокий потенциал RL2 как индуктора ICD и может влиять на эффективность вакцинирующего эффекта гибнущих клеток.

Можно заключить, что все три рекомбинантных вируса осповакцины стимулировали высвобождение АТФ во внеклеточное пространство, что говорит об их потенциале к индукции ICD вне зависимости от наличия апоптоз-индуцирующего белка.

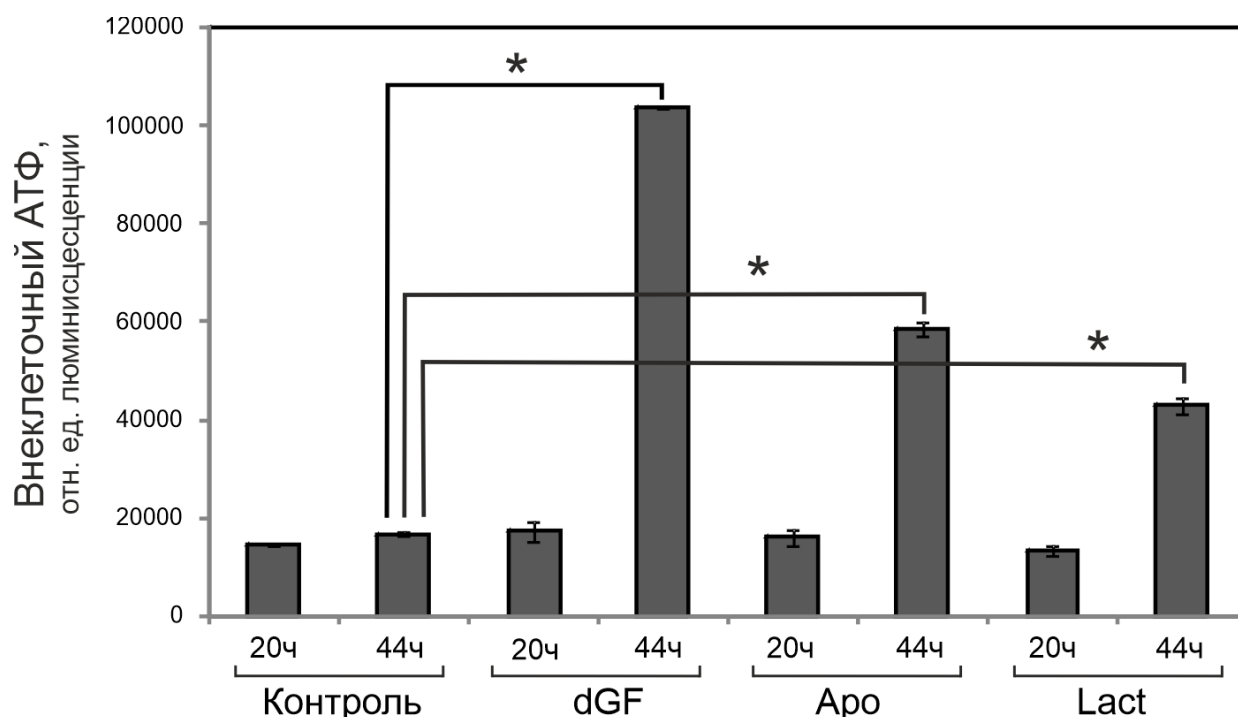


Рис. 28. Относительное количество АТФ в культуральной среде клеток MDA-MB-231, зараженных рекомбинантными вирусами осповакцины: dGF – VV-GMCSF-dGF, Apo – VV-GMCSF-Apo, Lact – VV-GMCSF-Lact. Анализ проводили через 20 и 44 ч после заражения вирусами (0.05 БОЕ/клетку). Статистические различия между контрольными и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$.

3.2.1.4. Изменение клеточного HMGB1 под действием рекомбинантных вирусов осповакцины

Для исследования изменения HMGB1, клетки MDA-MB-231 инкубировали с тремя рекомбинантными вирусами осповакцины в течение 3-48 ч, после чего клетки лизировали и анализировали белковый состав образцов методом Вестерн-блота с применением антител к HMGB1. В качестве внутреннего контроля анализировали уровень белка глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) (Рис. 29).

Из литературных данных известно, что снижение уровня внутриклеточного HMGB1 в гибнущих клетках коррелирует с высвобождением белка в межклеточное пространство [5]. Из данных, представленных на рисунке 29, можно видеть, что под действием рекомбинантных BOB – VV-GMCSF-dGF, VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo, суммарное содержание клеточного HMGB1 через 24 ч и 48 ч уменьшается относительно его уровня в контрольных незараженных клетках. Наиболее вероятно, что снижение клеточного HMGB1 происходит за счет его выхода во внеклеточное пространство, что является маркером ICD.

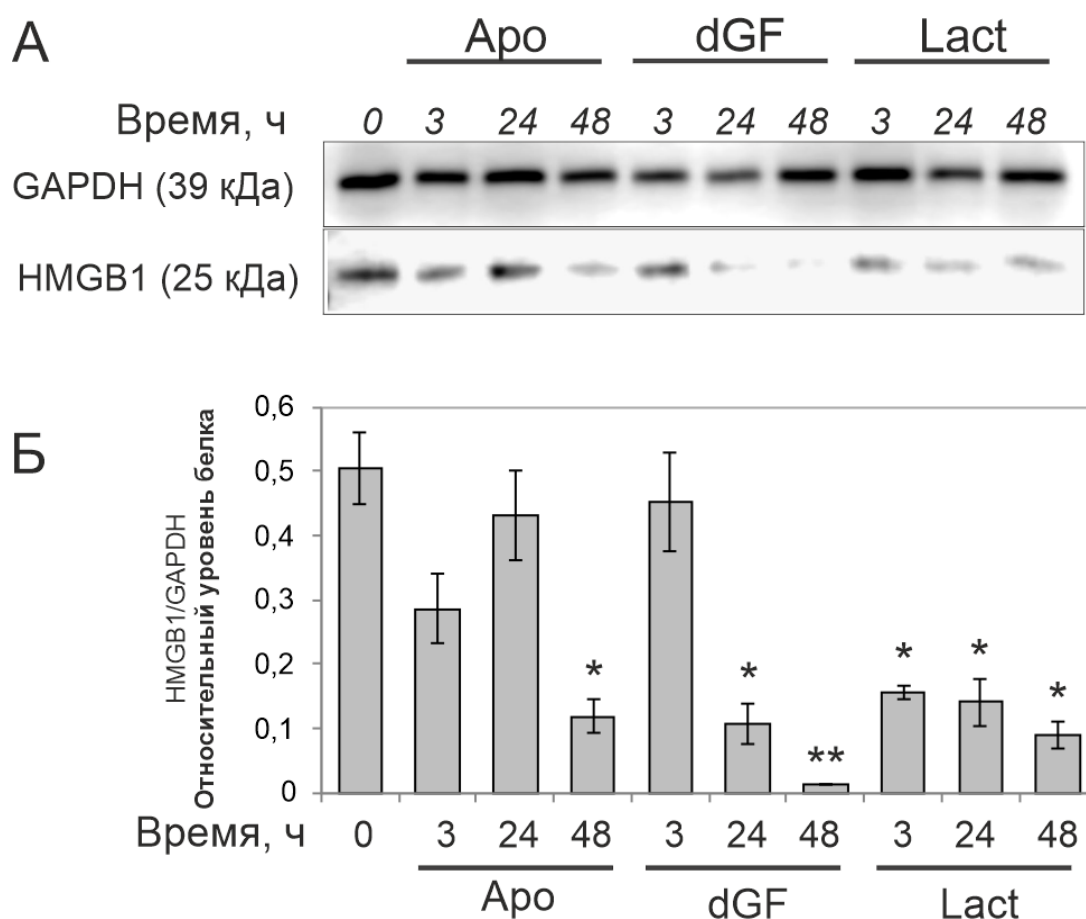


Рис. 29. Изменение HMGB1 в опухолевых клетках MDA-MB-231, зараженных рекомбинантными вирусами осповакцины: dGF – VV-GMCSF-dGF, Apo – VV-GMCSF-Apo, Lact – VV-GMCSF-Lact через 3-48 ч после обработки (0.05 БОЕ/клетку). **А.** Репрезентативные изображения Вестерн-блот анализа лизатов MDA-MB-231, зараженных вирусами осповакцины **Б.** Денситометрический анализ данных Вестерн-блотов с использованием программного пакета Gel-Pro Analyser 3.1. Данные представлены как относительное среднее значение $\pm$ SD, нормализованное к уровню GAPDH. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$; ** для $p < 0.01$.

Можно заключить, что эффективность активации всех исследованных маркеров ICD не зависела от продукции апоптоз-индуцирующих белков рекомбинантными BOB. Наиболее вероятно, что активация маркеров ICD происходит как общий ответ на вирусную инфекцию, маркирующий зараженную клетку к захвату фагоцитирующими клетками. Механизм захвата гибнущих клеток, зараженных патогенами, для предотвращения дальнейшего распространения инфекции в организме относят к древним неспецифическим механизмам иммунной системы многоклеточных организмов [227]. В случае вирусных инфекций эффективный фагоцитоз зараженных клеток прежде всего обусловлен экспонированием ими фосфатидилсерина на внешней мембране [228]. Параллельно, фагоциты могут интегрировать сигналы, получаемые от

инфицированных погибающих клеток для того, чтобы вызвать наиболее подходящий эффекторный ответ против инфицирующего патогена [229]. Этот шаг важен для стадии формирования последующего адаптивного противовирусного ответа с формированием долгосрочной иммунологической памяти.

3.2.2. Исследование эффекта вакцинации клетками, зараженными рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact, in vivo

Для анализа вакцинирующего эффекта опухолевых клеток MX-7, зараженных рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку, 48 ч), инфицированные клетки были трансплантированы подкожно мышам СЗН\Не аналогично эксперименту с рекомбинантным аналогом лактапина RL2. Через 7 дней после иммунизации, всем мышам трансплантировали живые клетки MX-7 в противоположный бок (Рис. 30 А). Было обнаружено, что к 111-му дню иммунизации только у двух из 10 мышей в группе с BOB не было опухолей в месте трансплантации живых опухолевых клеток (Рис. 30 Б). Различия между экспериментальной и контрольной группами были недостоверными. Выживаемость мышей в группе BOB составила 30%. Как в случае контрольной группы, так и в случае вакцинации вирус-зараженными клетками, снижение числа животных без опухоли началось на 9й день после трансплантации живых клеток, что указывает на проблемы развития специфического противоопухолевого ответа.

Данное исследование показало, что вероятно, противоопухолевая активность вируса VV-GMCSF-Lact связана с литическими способностями вируса и не связана с формированием специфического противоопухолевого иммунного ответа в отношении антигенов погибающих опухолевых клеток, поскольку такие клетки не предотвращали рост опухоли при последующих инъекциях живых опухолевых клеток. Показанная ранее эффективность виротерапии как у иммунокомпетентных, так и у иммунодефицитных животных (ТРО до 94%) также указывает на низкий вклад иммунной системы в противоопухолевое действие VV-GMCSF-Lact [20,230], поскольку формирование специфического противоопухолевого иммунного ответа возможно лишь у иммунокомпетентных животных.

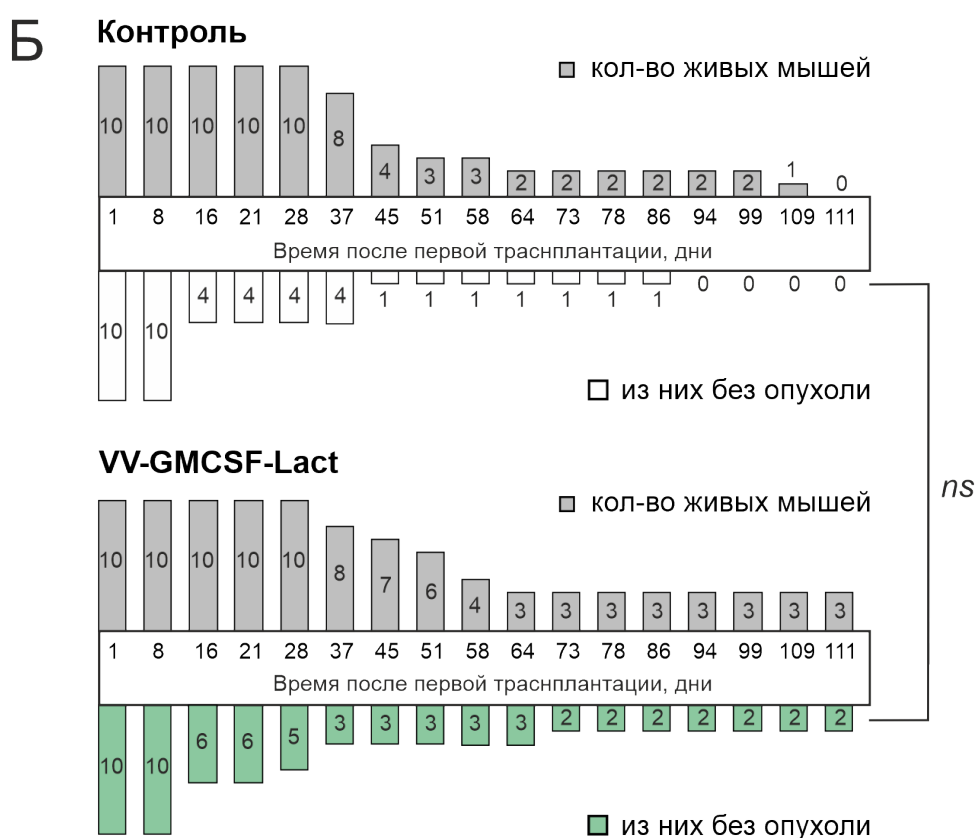
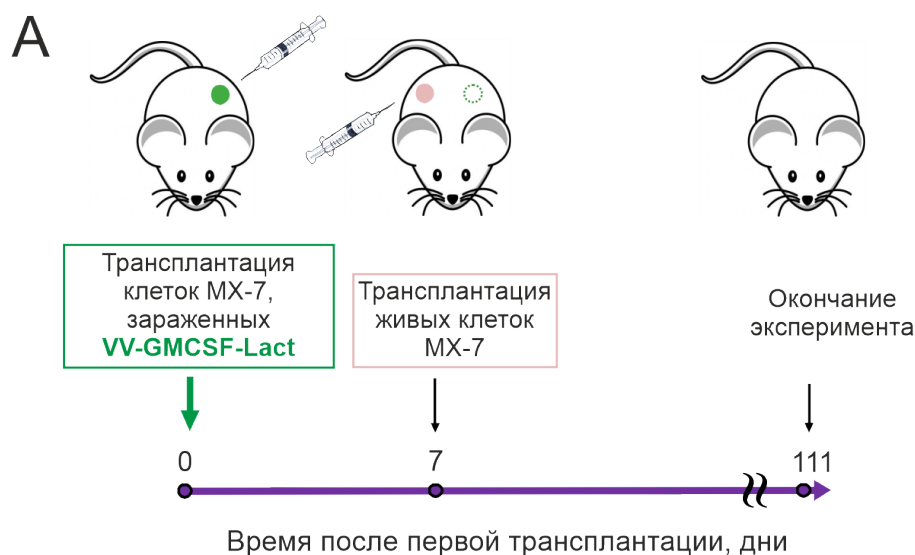


Рис. 30. Иммунизация мышей СЗН/Не клетками MX-7, обработанными рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку). **А.** Схема эксперимента. Мышей СЗН/Не иммунизировали обработанными VV-GMCSF-Lact клетками MX-7 (7×10^5 клеток/животное) – точка «0» на оси абсцисс. Через 7 дней мышам вводили живые клетки MX-7 (7×10^5). **Б.** Количество живых мышей и мышей без опухолей в группах в динамике. Различия между группами по количеству мышей без опухолей были рассчитаны с использованием непараметрической статистики критерия хи-квадрат Пирсона. ns – различия между группами не существенные.

В случае трансплантации мышам клеток, зараженных вирусом, происходит как фагоцитоз погибающих клеток, так и выход из клеток зрелых вирусных частиц, которые также захватывают клетки, способные к фагоцитозу. Этот процесс стимулирует в первую очередь активацию противовирусного ответа, поскольку вирусные антигены не попадают под центральную толерантность иммунной системы организма в отличие от антигенов погибающих сингенных опухолевых клеток мыши [231]. Указанная активация иммунитета в отношении вирусной инфекции снижает активацию специфического иммунного ответа в отношении опухолевых антигенов клеток, погибающих под действием вируса VV-GMCSF-Lact, что проявляется в слабом эффекте вакцинации такими клетками.

Таким образом, несмотря на активацию маркеров ICD под действием рекомбинантного вируса VV-GMCSF-Lact *in vitro*, мыши, иммунизированные клетками MX-7, зараженными рекомбинантным BOB, не были защищены от роста опухолевого узла, инициированного повторной трансплантацией живых опухолевых клеток. В сравнении с данными по вакцинации животных RL2-обработанными клетками, в случае вакцинации клетками, инфицированными BOB, выживаемость животных была хуже, а доля животных без опухоли ниже. С учетом более низкой эффективности в активации маркеров ICD *in vitro* под действием BOB по сравнению с RL2-обработанными клетками, можно заключить, что разница в уровне индукции молекулярных маркеров ICD может влиять на формирование противоопухолевого иммунитета *in vivo*.

Полученные в исследовании данные позволяют говорить о том, что по сравнению с рекомбинантным BOB, несущим ген лактапина, RL2 является более эффективным индуктором ICD *in vitro*, а клетки, гибнущие под действием RL2, являются индукторами противоопухолевого вакцинирующего эффекта *in vivo*. Можно заключить, что рекомбинантные вирусы осповакцины вызывают изменение молекулярных маркеров ICD *in vitro* без реализации противоопухолевой вакцинации зараженными ими клетками *in vivo*.

3.3. Холодная плазменная струя (ХПС) как индуктор ICD

Наряду с химио- и иммунопрепаратами физико-химические подходы также могут стимулировать гибель клеток по пути ICD. Одним из новых перспективных направлений в лечении злокачественных образований является холодная плазменная струя (ХПС) [232]. Газоразрядная неравновесная плазма, применяемая в плазменной медицине, состоит из низкоэнергетичных ионов и высокоэнергетичных электронов, ионизирующих газ и генерирующих активные радикалы. В то время как тепловая (горячая) плазма, которая, обычно используется, например, для эндоскопической коагуляции тканей и разрушения тканей человека, холодная плазма не оказывает термического повреждения при обработке [171]. Индукция гибели раковых

клеток при облучении ХПС зависит от интенсивности взаимодействия ХПС с биологическим объектом, которая, в свою очередь, определяется частотой и амплитудой приложенного напряжения, расстоянием до объекта, скоростью и типом рабочего газа, а также влажностью воздуха. При исследовании цитотоксического действия ХПС показано, что плазмостимулированные химические реакции в жидкости и клетке ведут к повышению в клетках кислород- и азот-содержащих активных радикалов и ионов, которые взаимодействуют с клеточными структурами и молекулами, повреждая их и приводя к клеточной гибели [233].

ХПС представляет собой последовательность стримеров, генерируемых в инертных газах в диэлектрическом канале плазменного устройства и распространяющихся по струе газа в окружающем воздухе при атмосферном давлении. В данном исследовании использовали оригинальное устройство, генерирующее плазменную струю, которое позволяет в широких пределах изменять режимы стримерного пробоя в диэлектрическом канале и варьировать динамику распространения последовательности стримеров по струе инертных газов (Рис. 31). Газоразрядное устройство представляет собой кварцевую трубку длиной 100 мм и внутренним диаметром 8 мм, в которую соосно вставлены капилляр длиной 6 мм с внутренним диаметром 2.6 мм и медный электрод длиной 50 мм и диаметром 2 мм. Снаружи кварцевой трубки располагается медный электрод кольцевой формы. Таким образом, разрядная зона представлена внутренним и внешним электродами (Рис. 31). При использовании данного устройства ранее было показано, что при определенных режимах облучения ХПС эффективно индуцирует гибель опухолевых клеток A549 и A431 в культуре [22,23].

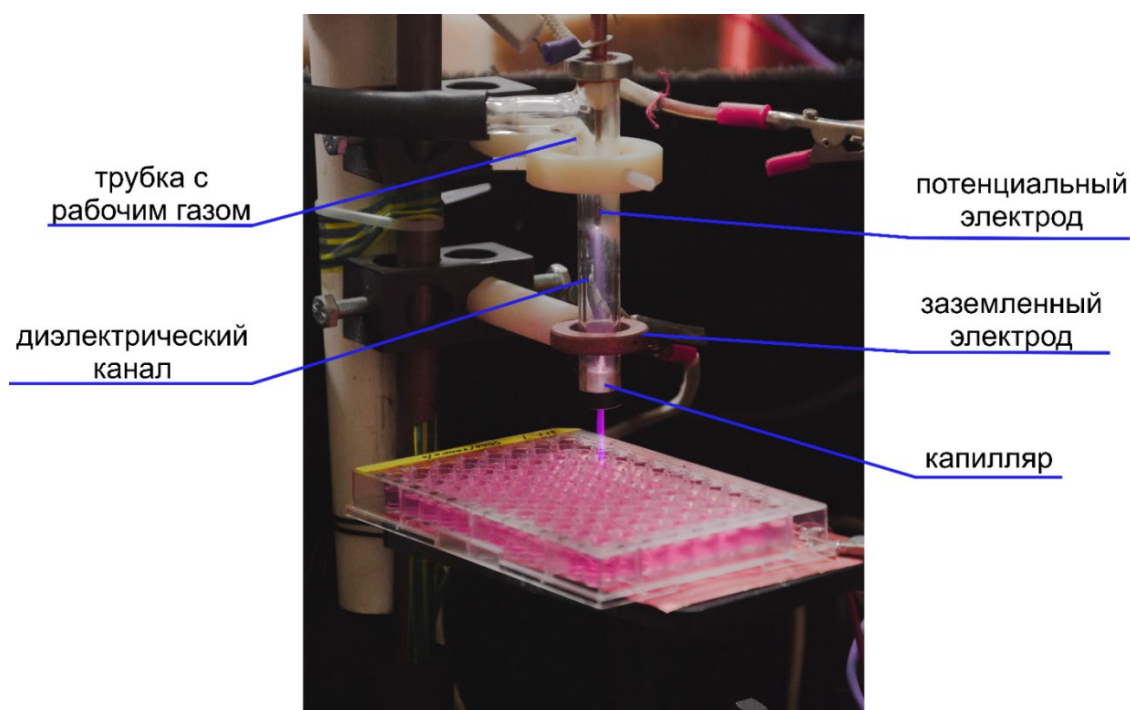


Рис. 31. Установка с газоразрядным устройством для облучения растущих клеток.

В данном исследовании анализировали активность ХПС в отношении опухолевых клеток мыши МХ-7 (Рис 32 А, Б). Клетки МХ-7 подвергали прямому облучению ХПС в течение 5-60 сек (параметры облучения: синусоидальное напряжение с частотой ~ 40 кГц и амплитудой тока $I = 7$ мА, скорость потока гелия составляла 9 л/мин, разрядное напряжение 4.9 кВ и энергия импульса ~ 8 мкДж), после чего клетки продолжали культивировать в стандартных условиях в течение 24 ч. Анализ жизнеспособности клеток методом МТТ показал, что наибольший эффект холодной плазменной струи на клетки МХ-7 достигался при 60 сек прямого облучения (Рис. 32 А). Анализ цитотоксической активности ХПС в отношении клеток МХ-7 также проводили в режиме реального времени, используя прибор iCELLigence. На рисунке 32 Б можно видеть, что при длительном облучении клеток ХПС (2 и 4 мин), клетки погибают почти сразу после облучения, что можно интерпретировать как неспецифическую цитотоксическую активность ХПС при указанных параметрах. Несмотря на то, что температура струи не превышала 40 градусов, известно, что продолжительное облучение увеличивает риск термического повреждения клеток и повреждений, вызванных сопутствующим УФ-излучением, которое относят к неспецифическим факторам ХПС [234]. Поэтому большое значение имеет коррекция продолжительности облучения ХПС. Облучение клеток в течение 1 мин подавляла пролиферацию клеток (Рис. 32 Б), и с учетом данных МТТ (Рис. 32 А) эти результаты позволили выбрать обработку продолжительностью 1 мин при указанных параметрах струи в качестве оптимальных условий облучения для последующих экспериментов.

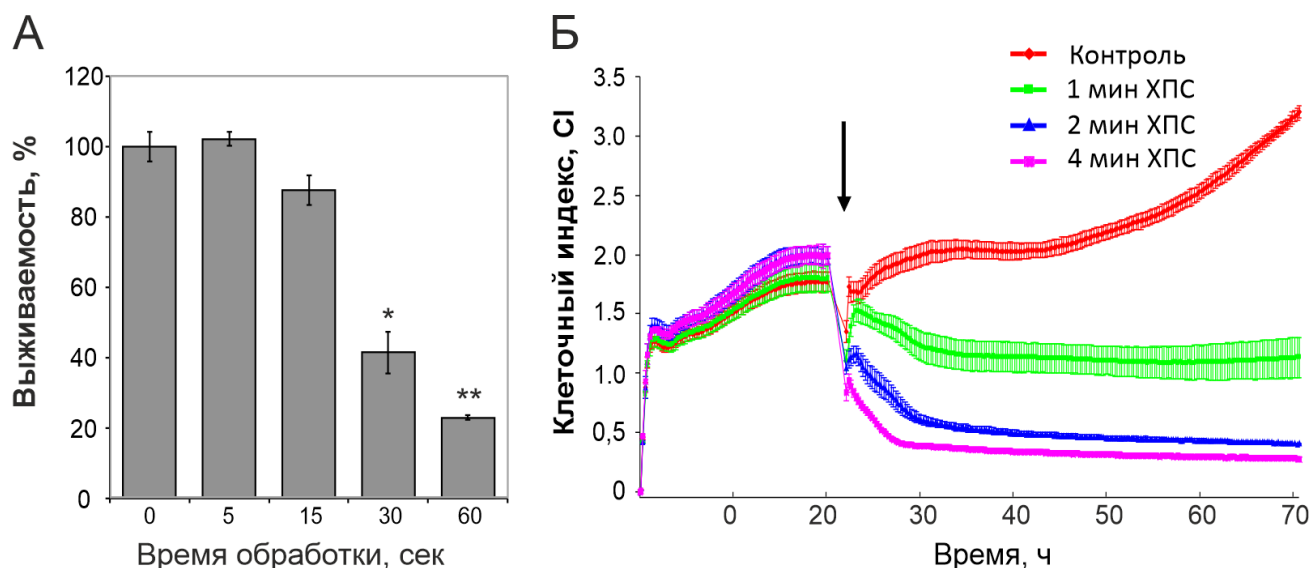


Рис. 32. Оценка цитотоксической активности холодной плазменной струи (ХПС) в гелии в отношении клеток рабдомиосаркомы мыши МХ-7. Для генерации ХПС к электродам было приложено синусоидальное напряжение с частотой ~ 40 кГц и амплитудой тока $I = 7$ мА, скорость потока гелия составляла 9 л/мин, разрядное напряжение 4.9 кВ и энергия импульса ~ 8 мкДж.

А. Клетки MX-7 облучали ХПС в течение 5-60 сек в 96-луночном планшете. Анализ жизнеспособности клеток (МТТ-тест) проводили через 24 ч после обработки ХПС. Данные представлены в виде доли от необработанных клеток (100%). Статистические различия между контрольной (0) и экспериментальной группами обозначены: * для $p < 0.05$, ** - для $p < 0.01$. **Б.** Динамика роста клеток MX-7, обработанных ХПС в течение 1-4 мин, в режиме реального времени на приборе iCELLigence. Черная стрелка указывает момент облучения клеток ХПС.

Используя параметры облучения, индуцирующие гибель клеток MX-7, далее был проведен анализ активации маркеров ICD в этих клетках после воздействия ХПС.

3.3.1. Экспозиция CRT и HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану под действием ХПС

Транслокацию кальретикулина и HSP70 в клетках рабдомиосаркомы мыши MX-7 детектировали с помощью иммуноцитометрического анализа через 6 ч и 24 ч после обработки ХПС. Через 6 ч после облучения не было отмечено увеличения CRT⁺-популяции и HSP70⁺-популяции в образцах ХПС-обработанных клеток по сравнению с контрольными необработанными клетками (Рис. 33).

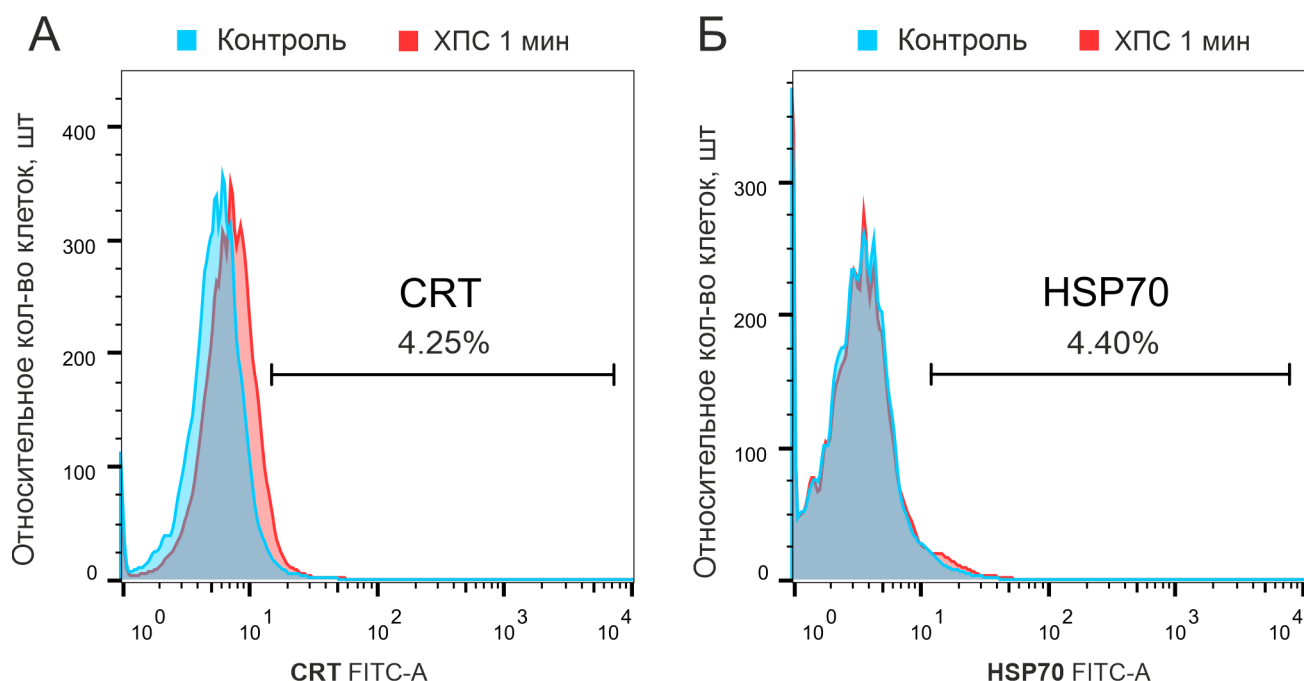


Рис. 33. ХПС-зависимая транслокация CRT и HSP70. Клетки MX-7 облучали ХПС в течение 1 мин (скорость потока геля 9 л/мин, напряжение 4.9 кВ) и через 6 ч оценивали поверхностные антигены CRT и HSP70 после иммуноокрашивания методом проточной цитометрии. **А, Б.** Характерный пример анализа поверхностного CRT (**А**) или HSP70 (**Б**).

Через 24 ч после воздействия ХПС в образцах появилась популяция клеток с экспонированным кальретикулином – около 25% клеток имели на своей поверхности кальретикулин (Рис. 34 А, Д). Экспозицию белка теплового шока HSP70 также оценивали через 24 ч после облучения. Было обнаружено, что 39% клеток становятся HSP70-положительными (Рис. 34 Б, Д), т.е. облученные клетки претерпевают активацию маркера ICD – HSP70. В качестве негативного контроля использовали клетки, пермеабилизированные перед инкубацией со специфическими антителами, что позволяло выявлять суммарно внутриклеточные и транслоцированные на поверхности клетки CRT и HSP70. Такое иммуноокрашивание не выявило различий в доле CRT- или HSP70-положительных клеток в контрольных и обработанных плазмой (Рис. 34 В, Г). Таким образом, была подтверждена транслокация этих маркеров ICD на внешнюю клеточную мембрану после облучения ХПС.

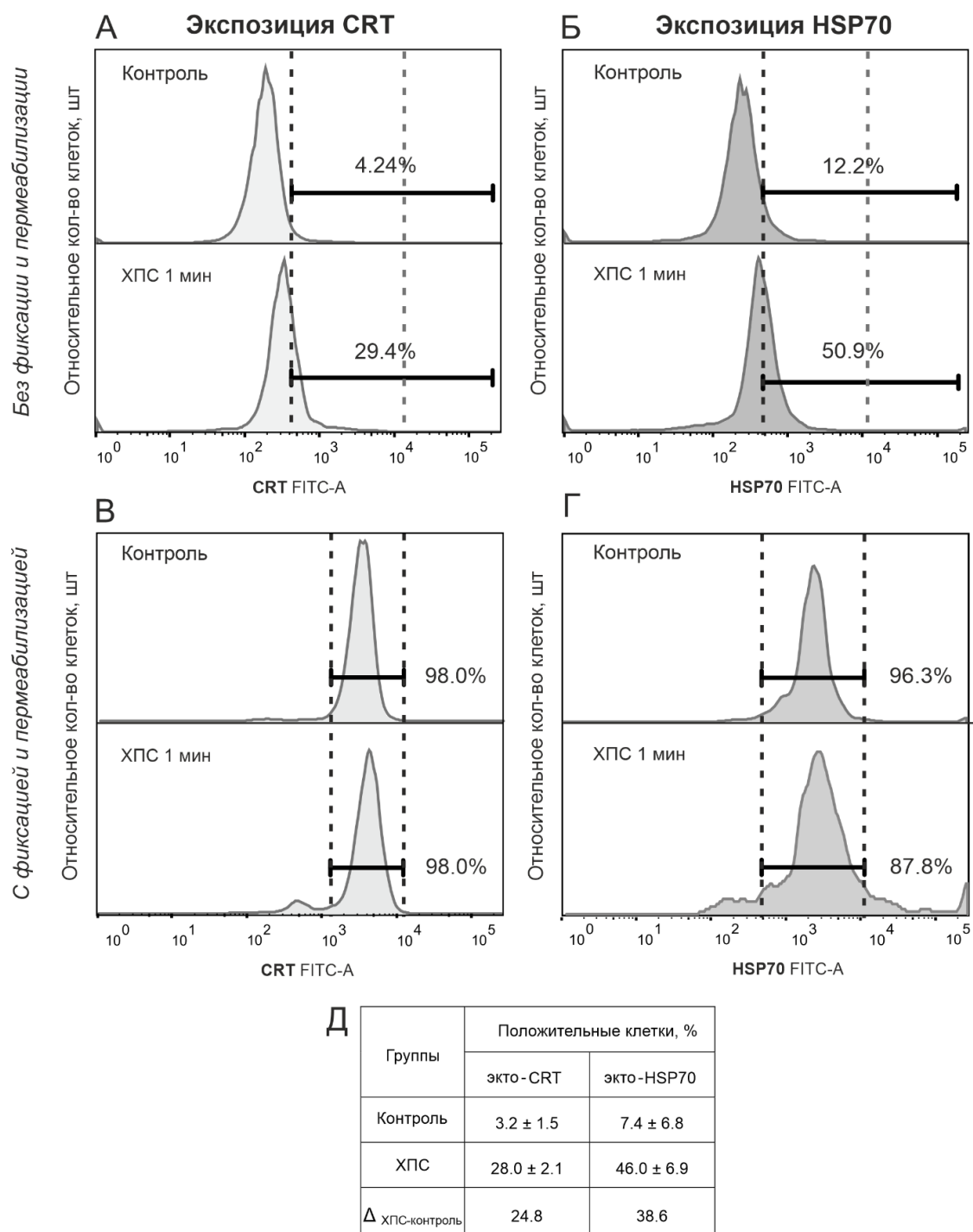


Рис. 34. Транслокация CRT и HSP70 в клетках после облучения ХПС. Клетки MX-7 облучали ХПС в течение 1 мин (скорость потока гелия 9 л/мин, напряжение 4.9 кВ) и оценивали поверхностный CRT и HSP70 через 24 ч методом проточной цитометрии (популяция P1) в фиксированных и пермеабиллизированных клетках (**А, В**) или без пермеабиллизации (**Б, Г**). Характерный пример анализа поверхностного CRT (**А**) или HSP70 (**Б**) и общего CRT (**В**) и HSP70 (**Г**). **Д.** Количественные данные по представленности CRT⁺ и HSP70⁺ популяций клеток. Представлены данные средних значений по трем независимым экспериментам. Δ ХПС-Контроль – разница между средним значением P1 в образцах клеток, обработанных ХПС, и средним значением по P1 в контрольных образцах.

Известно, что классические индукторы ICD, такие как доксорубин, вызывают экспозицию CRT уже через 1-4 ч после обработки препаратом [51]. Как было показано выше, уже через 2 ч после обработки RL2 уровень поверхностного CRT в клетках MX-7 был достоверно выше уровня в контрольных необработанных клетках. Наблюдаемая в представленных экспериментах поздняя ХПС-зависимая транслокация CRT отличается от классической динамики изменения CRT при индукции ICD, описанной в литературе. При облучении ХПС клеток карциномы кишечника мыши СТ26 авторы [21] также детектировали увеличение CRT на поверхности клеток через 24 ч после облучения. В работе [183] при воздействии на опухолевые клетки рака поджелудочной железы и меланомы человека культуральной средой, облученной ХПС, транслокацию CRT детектировали еще позднее – через 48-72 ч после обработки. Таким образом, поздняя транслокация CRT характерна для клеток, подвергнутых как прямому, так и опосредованному воздействию ХПС. Помимо поздней транслокации CRT, высвобождение АТФ во внеклеточное пространство из облученных клеток происходит более стремительно, чем для классических индукторов ICD: существенное высвобождение АТФ из обработанных плазмой клеток детектировали уже через 10 минут после обработки [21]. Напротив, классические индукторы ICD стимулируют высвобождение АТФ через 15-24 ч после инкубации с индукторами ICD [51]. Таким образом, динамика молекулярных маркеров ICD – CRT и АТФ в клетках, обработанных ХПС, отличается от таковой для ранее описанных индукторов иммуногенной клеточной гибели.

3.3.2. Изменение уровня внеклеточного и клеточного HMGB1 под действием ХПС

Для оценки уровня внеклеточного HMGB1, клетки MX-7 облучали ХПС в течение 1 минуты (синусоидальное напряжение с частотой ~ 40 кГц и амплитудой тока $I = 7$ мА, скорость потока гелия составляла 9 л/мин, разрядное напряжение 4.9 кВ и энергия импульса ~ 8 мкДж), и культивировали в стандартных условиях, отбирая аликвоты культуральной среды для определения концентрации HMGB1 методом ИФА.

Увеличение концентрации HMGB1 в культуральной среде было обнаружено через 24 ч после облучения ХПС (Рис. 35 А). Продолжение культивации клеток в течение 32 ч после облучения ХПС вело к незначительному снижению концентрации HMGB1 относительно концентрации белка в точке 24 ч инкубации. Наиболее вероятно, что HMGB1 во внеклеточном пространстве со временем подвергается деградации. Присутствие частично протеолитически расщепленных форм HMGB1 могут создавать трудности при анализе методом ИФА с иммобилизованными специфическими антителами к определенному эпитопу HMGB1.

Наблюдение за клеточным HMGB1 показало его уменьшение уже через 3 ч после облучения по сравнению с контрольными необлученными клетками (Рис. 35 Б, В).

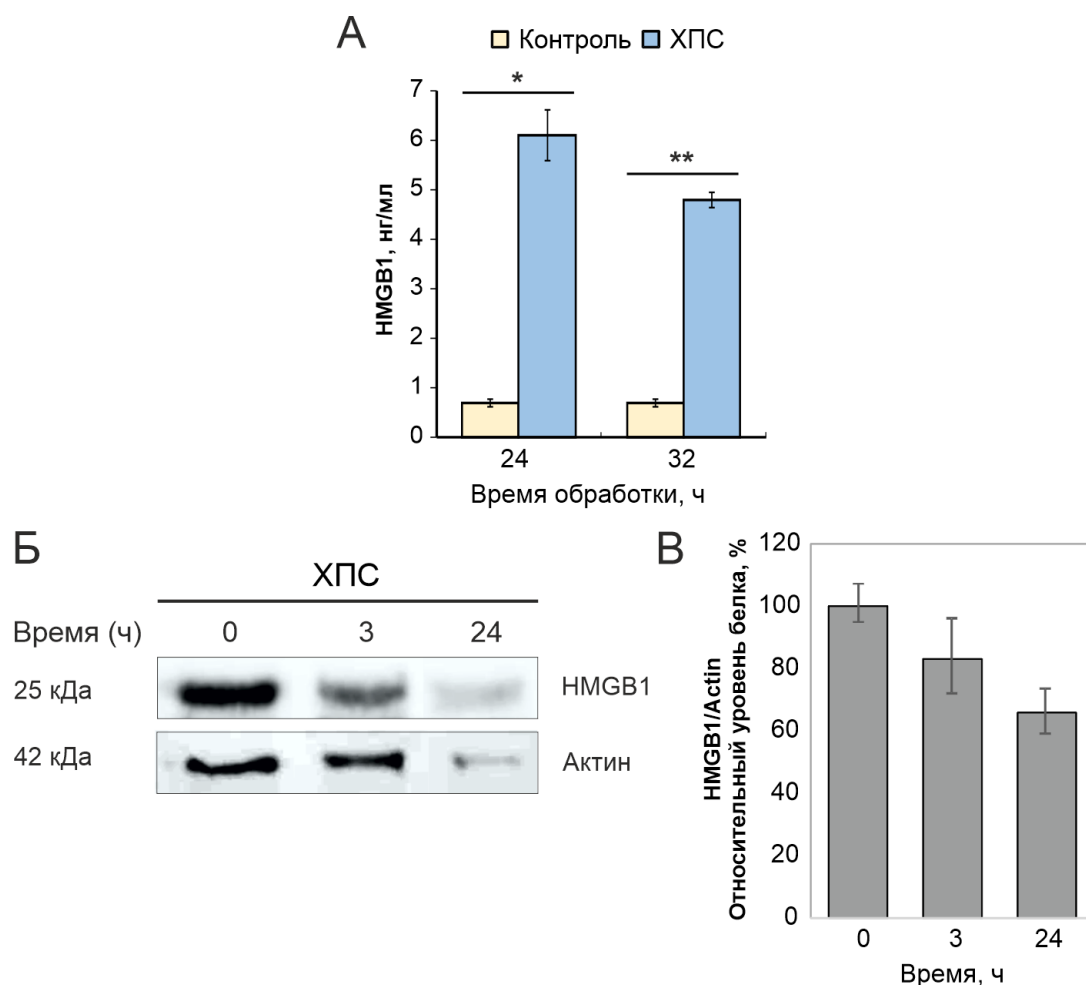


Рис. 35. Анализ внеклеточного (**А**) и внутриклеточного (**Б, В**) HMGB1 в клетках MX-7, облученных ХПС. **А.** Клетки MX-7 подвергали воздействию холодной плазменной струи (ХПС) в течение 1 минуты (скорость потока гелия 9 л/мин, напряжение 4.9 кВ), HMGB1 анализировали в культуральной среде методом ИФА через 24 и 32 ч. **Б.** Репрезентативные изображения Вестерн-блот анализа лизатов клеток. Клетки MX-7 подвергали воздействию ХПС в течение 1 мин, клетки лизировали через 3 и 24 ч и анализировали методом Вестерн-блота. **В.** Денситометрический анализ данных Вестерн-блотов с использованием программного пакета Gel-Pro Analyser 3.1. Данные представлены, как относительное среднее значение по HMGB1 $\pm$ SD, нормализованное к уровню α -актина. Статистические различия между контрольной и экспериментальной группами обозначены: * - для $p < 0.05$, ** - для $p < 0.01$.

Таким образом, можно сделать вывод, что через 3 ч после облучения ХПС клеток MX-7 были обнаружены изменения уровня HMGB1. Учитывая характер изменения CRT и HSP70, ХПС-стимулированную гибель клеток можно отнести к иммуногенному типу, отличному от классических индукторов.

3.3.3. Изменение уровня HMGB1 в сыворотке крови мышей, облученных ХПС *in vivo*

Поскольку облучение опухолевых клеток холодной плазменной струей *in vitro* стимулирует выход HMGB1 во внеклеточную среду, интересно было проследить изменение уровня HMGB1 *in vivo* при облучении опухолевых узлов. Теоретически, HMGB1 из погибающих клеток может распространяться локально в опухолевом окружении, попадать в кровоток и оказывать влияние на клетки иммунной системы. Мы предположили, что ХПС-зависимое высвобождение HMGB1 из погибающих опухолевых клеток может изменять уровень HMGB1 в сыворотке крови мышей с опухолью, облученных ХПС. В эксперименте формировали 3 группы мышей: здоровые мыши, здоровые мыши, облученные ХПС, и мыши-опухоленосители, облученные ХПС. Мышей СЗН/Не с трансплантированной опухолью МХ-7 и здоровых мышей облучали ХПС в течение 1 минуты, направляя струю непосредственно на область опухоли дважды, с интервалом 24 ч. Кровь для приготовления сыворотки собирали через 1 и 24 ч после второго облучения ХПС (Рис 36 А, Б).

Анализ сыворотки крови мышей показал, что облучение ХПС вызывало двукратное увеличение концентрации HMGB1 через 1 ч после второго воздействия ХПС в сыворотке крови мышей с опухолью (Рис. 36 В). Через 24 ч происходит снижение уровня HMGB1 в сыворотке крови до уровня HMGB1 контрольных животных без опухоли и без облучения. Таким образом, отмеченное повышение уровня HMGB1 в сыворотке у мышей-опухоленосителей после облучения может быть следствием высвобождения HMGB1 в кровоток из клеток, погибающих по пути ICD после облучения. Последующее снижение уровня HMGB1 в крови мышей свидетельствует о непродолжительной реакции на облучение ХПС. В литературе описаны изменения сывороточного HMGB1, связанные с различными патологиями, для которых уровень сывороточного HMGB1 может быть прогностическим маркером тяжести заболевания [235,236]. Широкая вовлеченность HMGB1 в регуляцию различных процессов на клеточном уровне и на уровне организма обуславливает важность его изменения в сыворотке крови как при различных некротических процессах и системном воспалении, так и при аутоиммунных состояниях и ранних стадиях неоплазий [237–239]. Таким образом, обнаруженные изменения HMGB1 в крови животных-опухоленосителей после облучения ХПС, могут отражать локальную реакцию воспаления, активирующую иммунную систему животного.

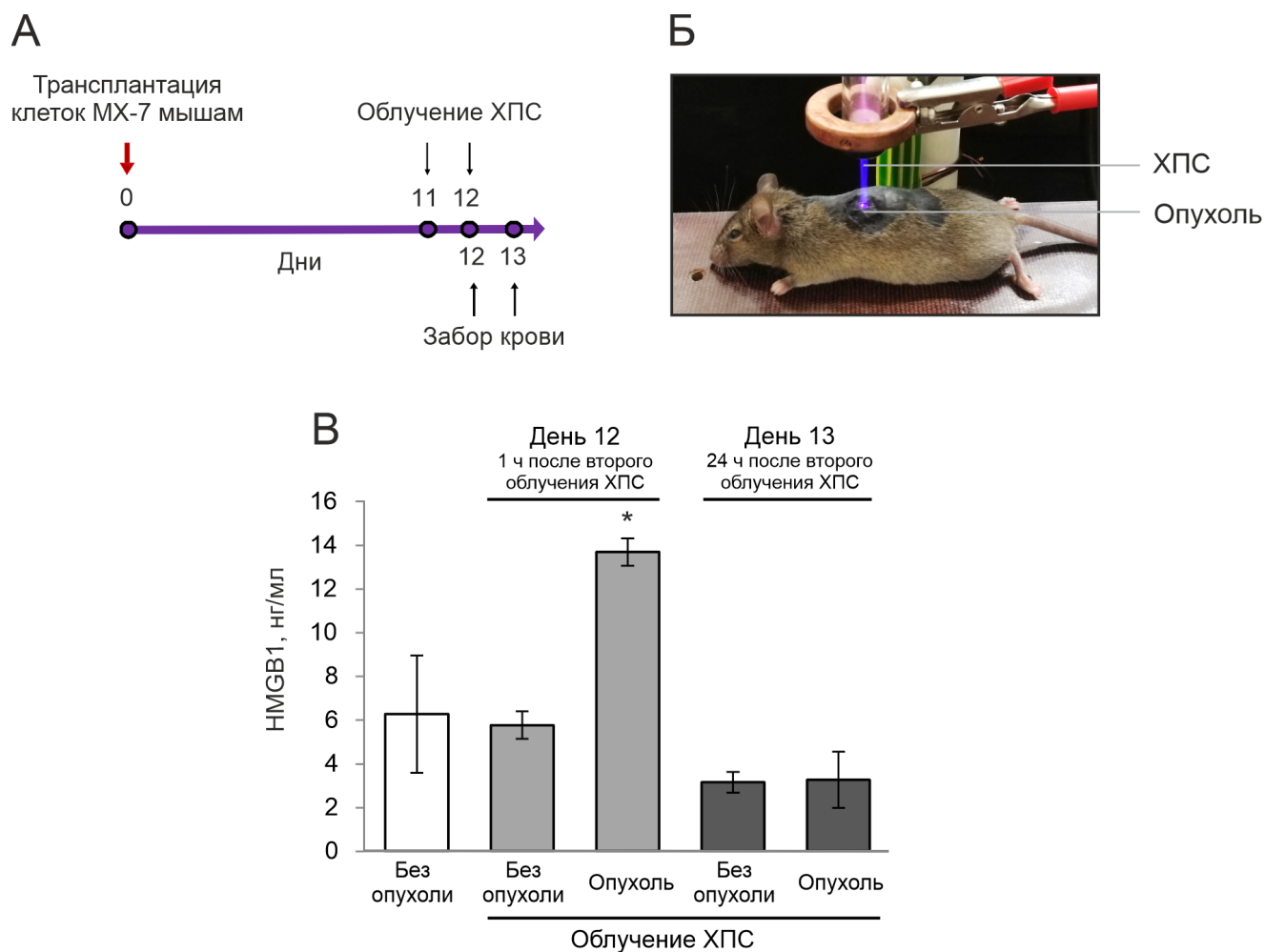


Рис. 36. Влияние облучения ХПС на уровень HMGB1 в сыворотке крови здоровых мышей СЗН/Не и мышей СЗН/Не с опухолями рабдомиосаркомы MX-7. **А.** Схема эксперимента. Мышей дважды облучали ХПС (струя в гелии) в течение 1 минуты дважды, с интервалом 24 ч. Условия облучения: скорость потока гелия 9 л/мин, напряжение 4.9 кВ, амплитуда тока = 7 мА, энергия импульса ~ 8 мкДж. Кровь мышей собирали через 1 и 24 ч после второго облучения ХПС. **Б.** Пример облучения мышей. **В.** Оценка количества HMGB1 в сыворотке мышей методом иммуноферментного анализа. Без опухоли – здоровые мыши, Опухоль – мыши с опухолью MX-7. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD ($n=5$). Различия рассчитывались с использованием t-критерия Стьюдента, разница между группами была статистически значимой при $p < 0.05$ (*).

3.3.4. Изменение уровня-цитокинов в сыворотке крови мышей, облученных ХПС

Облучение, термическое повреждение и локальная гибель опухолевых клеток могут стимулировать воспаление с выбросом в кровоток цитокинов. Повышенный уровень секреции цитокинов также может быть маркером возникающего иммунного ответа. Здоровых мышей

облучали ХПС дважды с промежутком 24 ч между облучениями. У облученных и контрольных животных проводили забор образцов крови через 1 ч после второго облучения, из которой готовили сыворотку для детекции цитокинов. Чтобы контролировать возможное термическое повреждение кожи мышей в процессе облучения, способное вести к локальному воспалению, использовали тепловизор для измерения температуры кожи в области облучения. Средняя температура кожи, определенная за время облучения, составила $37.8 \pm 0.7^\circ \text{C}$ и термических повреждений в процессе облучения не наблюдалось.

В процессе исследования анализировали в сыворотке крови уровень следующих провоспалительных: IL-1 α , IL-1 β , IL2, IL-6, IL-12, IL-17 α , INF- γ , TNF- α , G-CSF и GM-CSF и противовоспалительных цитокинов: IL-4, IL-10 через 1 ч после второго облучения ХПС (Рис. 36 А). Выбор исследуемых цитокинов был обусловлен тем, что такую выборку используют для профилирования цитокинов, секретируемых стимулированными мононуклеарными клетками периферической крови. Представление данных в виде изменения значений уровня цитокинов относительно уровня у контрольных животных в данном случае является предпочтительным, поскольку абсолютные концентрации разных цитокинов в крови могут различаться на несколько порядков, что делает невозможным представление ненормированных данных для двенадцати цитокинов на одной гистограмме одновременно.

Достоверные изменения в уровне цитокинов между группами контрольных мышей и мышей, облученных ХПС, была обнаружена только для двух цитокинов: концентрация G-CSF, увеличилась, а IL-4 снизилась в сыворотке после облучения (Рис. 37).

G-CSF или гранулоцитарный колониестимулирующий фактор является провоспалительным цитокином, ответственным за привлечение гранулоцитов в очаг воспаления. Помимо увеличения числа нейтрофилов *in vivo* и модулирования функций нейтрофилов, G-CSF может индуцировать продукцию цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) [240]. G-CSF используют в клинике для лечения нейтропении (состояние пониженного количества нейтрофилов) и преодоления иммуносупрессии при лечении химиопрепаратами [241]. При развитии острой воспалительной реакции, например, при инфекции, концентрация G-CSF в сыворотке крови может увеличиваться в 30-100 раз [242,243]. Поскольку G-CSF является стимуляторной молекулой для привлечения фагоцитирующих клеток, его увеличение можно рассматривать как позитивный фактор облучения, особенно если повышение уровня G-CSF происходит не только системно, но и локально в области облучения.

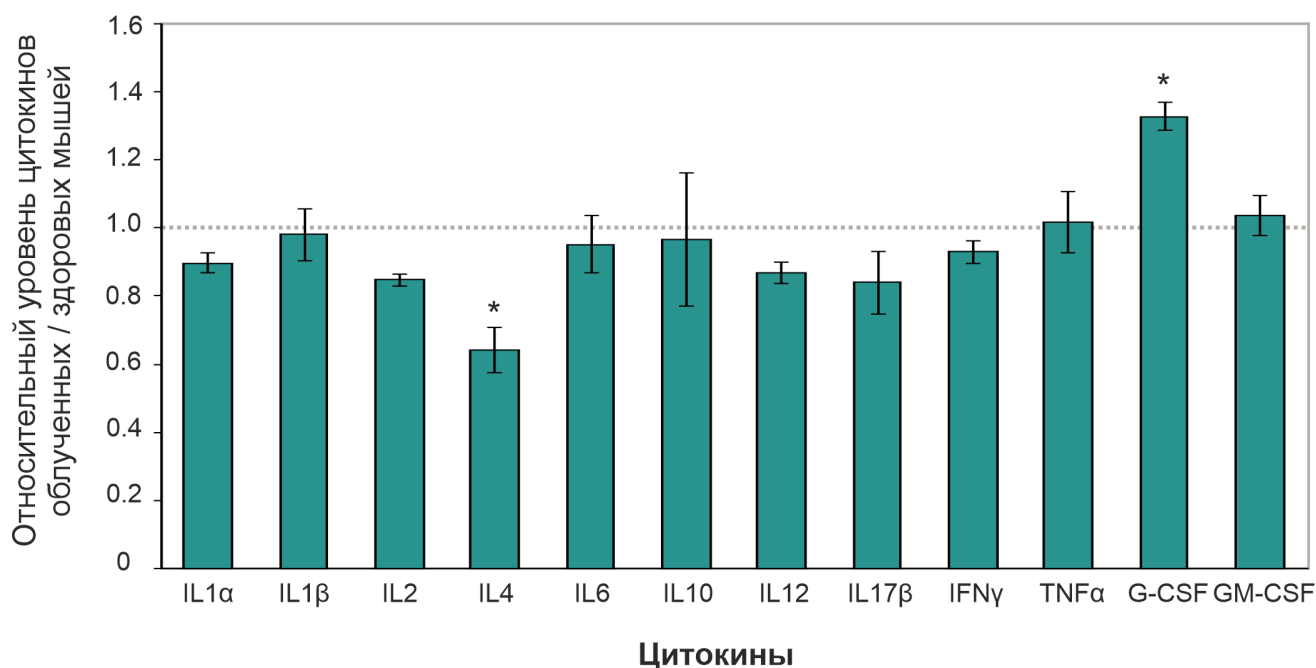


Рис. 37. Уровень цитокинов в сыворотке крови мышей С3Н/Не через 1 ч после второго облучения ХПС (скорость потока гелия 9 л/мин, напряжение 4.9 кВ). Сыворотки крови разбавлены в 8 раз. Данные нормализованы к необработанному контролю (принят за единицу, обозначен пунктирной линией) и представлены как среднее значение $\pm$ SD (n=5). Различия рассчитывались с использованием t-критерия Стьюдента, разница между группами была статистически значимой при $p < 0.05$ (*).

Интерлейкин 4 (IL4) является многопрофильным цитокином, основные функции которого заключаются в дифференцировке наивных Т-хелперов (Th0-клеток) в Th2-клетки, регуляции клеточной пролиферации, апоптоза и экспрессии многочисленных генов в различных типах клеток, включая лимфоциты, макрофаги и фибробласты, а также эпителиальные и эндотелиальные клетки [244]. IL-4 ингибирует транскрипцию некоторых провоспалительных цитокинов в макрофагах, таких как: TNF- α , IL-1 и IL-6 [245]. В то же время, IL-4 стимулирует созревание дендритных клеток и его снижение можно рассматривать как негативный фактор для индукции холодной плазменной струей ICD *in vivo* в сайте облучения. В дальнейшем, имеет смысл проанализировать изменение G-CSF и IL-4 в микроокружении опухолей у животных после облучения ХПС.

В целом, наблюдаемое отсутствие или незначительное изменение уровня цитокинов в ответ на облучение может означать, что облучение ХПС не ведет к развитию генеральной воспалительной реакции. Аналогично, для рекомбинантного аналога лактапина также ранее было показано, что введение RL2 здоровым мышам не вызывало значительных изменений цитокинового профиля [246]. Слабый цитокиновый ответ в крови здоровых облученных мышей

является положительным фактором для дальнейшего использования ХПС в качестве терапевтического агента.

Принимая во внимание данные об уровне HMGB1 в сыворотке крови здоровых облученных мышей, который рассматривают как цитокиноподобную молекулу, наши данные показывают, что кратковременное облучение ХПС вызывает слабый цитокиновый ответ.

3.4. Оценка иммунологических эффектов, вызываемых потенциальными исследуемыми индукторами иммуногенной клеточной гибели

3.4.1. Выход ИФНа в межклеточное пространство

Помимо указанных основных маркеров ICD было показано, что выход интерферона 1 типа из обработанных клеток важен для эффективного захвата опухолевых антигенов дендритными клетками. При индукции иммуногенной клеточной гибели интерферон альфа (ИФНа), выходящий из погибающих клеток, способствует созреванию антигенпрезентирующих клеток, кросс-презентации опухолевых антигенов и привлечению Т-клеток [55].

Концентрацию ИФНа измеряли в культуральной среде клеток MX-7, обработанных RL2 (0.3 мг/мл), VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку) или холодной плазменной струей (1 мин, напряжение $U = 4.9$ кВ, ток $I = 7$ мА, энергия импульса ~ 8 мкДж). Культуральную среду собирали после обработки через 12 ч (RL2), 48 ч (BOB) и 24 ч (ХПС) и анализировали методом ИФА. Выбор экспериментальных точек был обусловлен характерным временем выхода в межклеточное пространство АТФ и HMGB1 для указанных индукторов. Так, выше было показано, что RL2 вызывал высвобождение АТФ и HMGB1 уже через 12-24 ч инкубации, ХПС – через 24 ч, в то время как рекомбинантный вирус VV-GMCSF-Lact – только через 48 ч.

Анализ ИФНа обработанных клеток показал, что RL2 и вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact вызывали достоверное увеличение концентрации интерферона альфа в культуральной среде до 140 пг/мл и 80 пг/мл, соответственно (Рис. 38). Облучение клеток холодной плазменной струей не вело к дополнительному выходу интерферона из обработанных клеток относительно контрольных клеток. По уровню интерфероновой секреции наиболее существенный клеточный ответ происходит в результате обработки RL2, что может вносить вклад в формирование наблюдаемого вакцинирующего эффекта RL2-обработанных клеток *in vivo*.

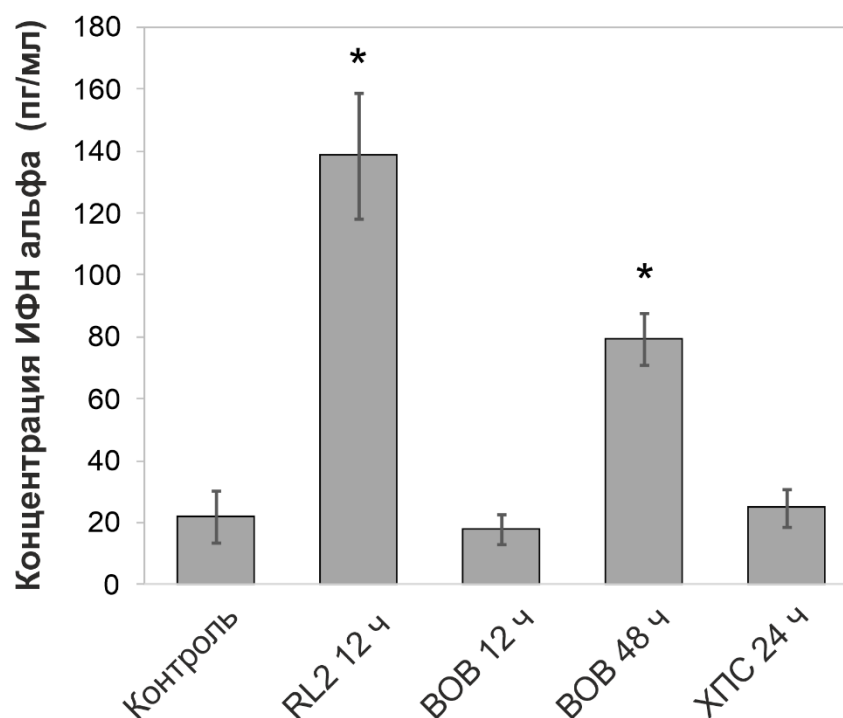


Рис. 38. Изменение уровня внеклеточного интерферона альфа (ИФН) под действием RL2, VV-GMCSF-Lact (BOB) и ХПС. Клетки MX-7 обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл, 12 ч), BOB (0.5 БОЕ/клетку, 12 ч и 48 ч) или ХПС (1 мин, гелий 9 л/мин, 4.9 кВ; 24 ч после облучения). Аликвоты культуральной среды от обработанных клеток анализировали методом ИФА при помощи набора IFN alpha Mouse ELISA Kit. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$.

В литературе не показано непосредственное высвобождение ИФН α в ответ на обработку пептидными индукторами ICD, но показано, что пептид LTX-315, активирующий молекулярные маркеры ICD *in vitro*, вызывает позитивную регуляцию экспрессии генов, кодирующих интерфероны I типа [143]. Для вирусов осповакцины в литературе показано высвобождение интерферонов при заражении рекомбинантным вирусом vvDD [247]. Исследователи показали, что под действием vvDD происходит высвобождение ИФН I типа в разных типах клеток в концентрации от 100 до 400 пг/мл, и, таким образом, уровень секреции интерферонов I типа в ответ на заражение клеток vvDD типа был сравним с таковым у клеток, зараженных VV-GMCSF-Lact (80 пг/мл).

Из данных литературы известно, что интерфероны первого типа (ИФН I) при захвате CD8⁺ ДК апоптотических опухолевых клеток контролируют сохранение опухолевых антигенов, и являются оптимальным сигналом к активации кросс-презентации антигенов Т-клеткам [248,249]. Полученные данные о том, что обработка клеток RL2 вызывает наибольший выход интерферона альфа в культуральную среду позволяет предположить более эффективную активацию и

последующую презентацию дендритными клетками, поглотившими такие погибающие опухолевые клетки, опухолевых антигенов Т-клеткам и формирование специфического иммунного ответа. Предполагают, что такая стимуляторная активность ИФН I в отношении ДК реализуется за счет того, что ИФН I имитируют состояние вирусной инфекции или физиологического стресса, которые являются характерными активаторами созревания специфических CD8⁺ Т-клеток [250]. Стоит отметить, что отсутствие интерферонового ответа на облучение холодной плазменной струей согласуется с более слабой активацией остальных молекулярных маркеров ICD – экспозицией CRT, HSP70 и высвобождением HMGB1.

На основании данных о выходе ИФНа в культуральную среду клеток, обработанных RL2 и VV-GMCSF-Lact, можно предположить, что такие клетки будут эффективны в стимуляции ДК.

3.4.2. Сравнение фагоцитирующей активности перитонеальных макрофагов мыши в отношении опухолевых клеток, погибающих под действием RL2, VV-GMCSF-Lact, цисплатина или облучения ХПС

Эффективное поглощение погибающих клеток фагоцитирующими клетками – дендритными клетками и тканевыми макрофагами обеспечивает, во-первых, предотвращение воспаления в сайте нахождения гибнущих клеток, а во-вторых, необходимо для формирования долгосрочного противоопухолевого ответа.

Мы провели анализ поглощения макрофагами клеток MX-7, обработанных исследуемыми потенциальными индукторами ICD. В экспериментах использовали перитонеальные макрофаги мышей СЗН/Не. Фенотипирование клеток, выделенных из брюшной полости животных, проводили методом проточной цитометрии с использованием антител к CD11b. CD11b представляет собой α -цепь мембранного интегринового гетеродимера CD11b/CD18 (или Mac-1, макрофагальный антиген 1), который присутствует на поверхности нейтрофилов и макрофагов [251]. Mac-1 играет существенную роль в захвате комплемент-опсонизированных микроорганизмов и апоптотических клеток [251]. Можно видеть, что 87,6% суспензии клеток, выделенных из брюшной полости (популяция P1) являются CD11b-положительными, что характеризует их настоящими макрофагами (Рис. 39). На рисунке 39 также можно видеть, что перитонеальные макрофаги мышей СЗН/Не представлены двумя популяциями: с высоким (популяция P3) и низким (популяция P2) уровнем CD11b. Известно, что в брюшной полости мышей макрофаги представлены двумя отдельными подмножествами, называемыми большими перитонеальными макрофагами – клетки с высоким уровнем CD11b и малыми перитонеальными макрофагами с более низким уровнем CD11b [252,253].

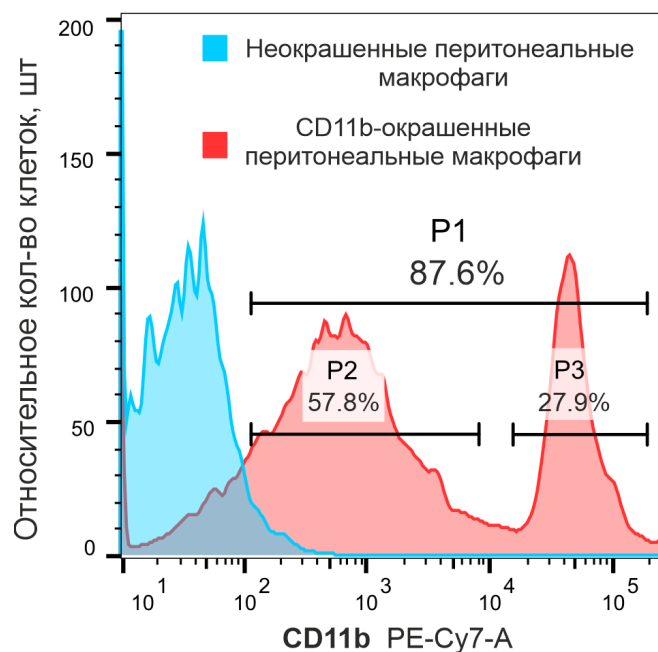


Рис. 39. Иммунофенотипирование клеток, выделенных из брюшной полости мышей СЗН/Не, с использованием антител к CD11b методом проточной цитометрии. Обозначены общая популяция CD11b⁺-клеток (P1), популяции CD11b^{high} (P2) и CD11b^{low} (P3). Характерный пример анализа.

Эффективный захват макрофагами характерен для клеток, погибающих по пути ICD [254]. Для анализа эффективности захвата перитонеальными макрофагами клеток, обработанных потенциальными индукторами ICD, проводили окрашивание макрофагов и опухолевых клеток флуоресцентными красителями компонентов цитоплазмы: зеленым (Cell Tracker Green) для макрофагов и красным (Cell Tracker Red) для опухолевых клеток MX-7 (Рис. 40 А). Макрофаги инкубировали совместно с клетками MX-7, предварительно обработанными RL2, VV-GMCSF-Lact или облученными ХПС, после чего анализировали фагоцитоз методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Относительную долю фагоцитирующих клеток оценивали методом проточной цитометрии, где дважды положительная популяция (двойное зелено-красное свечение) соответствовала макрофагам, захватившим MX-7 клетки или их фрагменты.

Клетки, обработанные RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч), инкубировали с макрофагами и визуализировали фагоцитоз методами флуоресцентного анализа. Можно видеть, что около 24% клеток, обработанных RL2, захвачены макрофагами (популяция Q2), в отличие от 1% в контрольных образцах с интактными клетками MX-7 (Рис. 40 Б). В образцах, содержащих макрофаги и клетки MX-7, обработанные RL2, большая часть красных сигналов (клетки MX-7) локализовалась совместно с зелеными сигналами (макрофаги), что интерпретируется как фагоцитоз (Рис 40 В).

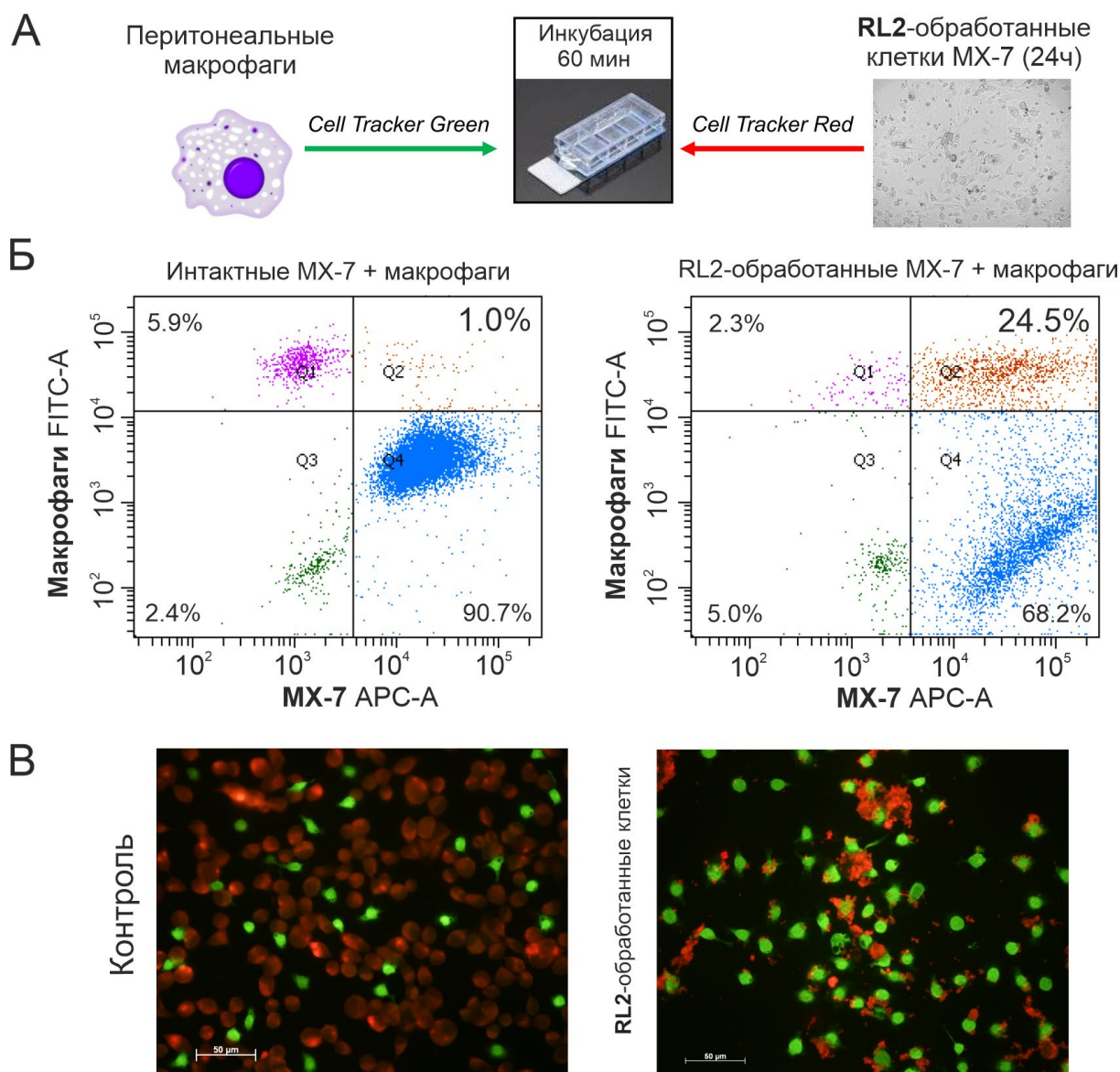


Рис. 40. Захват макрофагами клеток MX-7, обработанных RL2. **А.** Схема эксперимента. Клетки MX-7, меченные красным флуоресцентным красителем Cell Tracker Red (5 мкМ), обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч), а затем инкубировали 1 ч совместно с перитонеальными макрофагами мышей СЗН/Не, меченными зеленым флуоресцентным красителем Cell Tracker Green (1 мкМ). **Б.** Репрезентативные изображения цитометрического анализа препаратов. Квадрант Q2 соответствует дважды положительной зелено/красной популяции (фагоцитоз). **В.** Репрезентативные изображения микроскопического анализа препаратов. Увеличение 252х.

Аналогично, для оценки способности рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact активировать фагоцитирующую активность перитонеальных макрофагов клетки рабдомиосаркомы мыши MX-7, зараженные VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку), инкубировали с перитонеальными макрофагами после 48 ч инфекции (Рис. 41). Время инкубации клеток MX-7 с вирусом было выбрано на основании динамики изменения молекулярных маркеров ICD: при

длительной инфекции 48 ч молекулярные маркеры иммуногенной клеточной гибели были выражены более существенно, чем при 24 ч инфекции. Анализ фагоцитоза методом проточной цитометрии показал, что дважды положительная популяция (квадрант Q2), соответствующая макрофагам, захватившим клетки MX-7 или их фрагменты, составила около 11.1% для образцов клеток MX-7, обработанных VV-GMCSF-Lact, и 4.5% в контрольных образцах с интактными клетками MX-7 (Рис. 41). Можно предположить, что в случае инкубации клеток, зараженных VV-GMCSF-Lact, часть макрофагов расходуется на захват вирусных частиц, но это событие остается в т.н. «слепой зоне» эксперимента, поскольку макрофаги, захватившие неокрашенные вирусные частицы, не отличаются от нефагоцитирующих макрофагов.

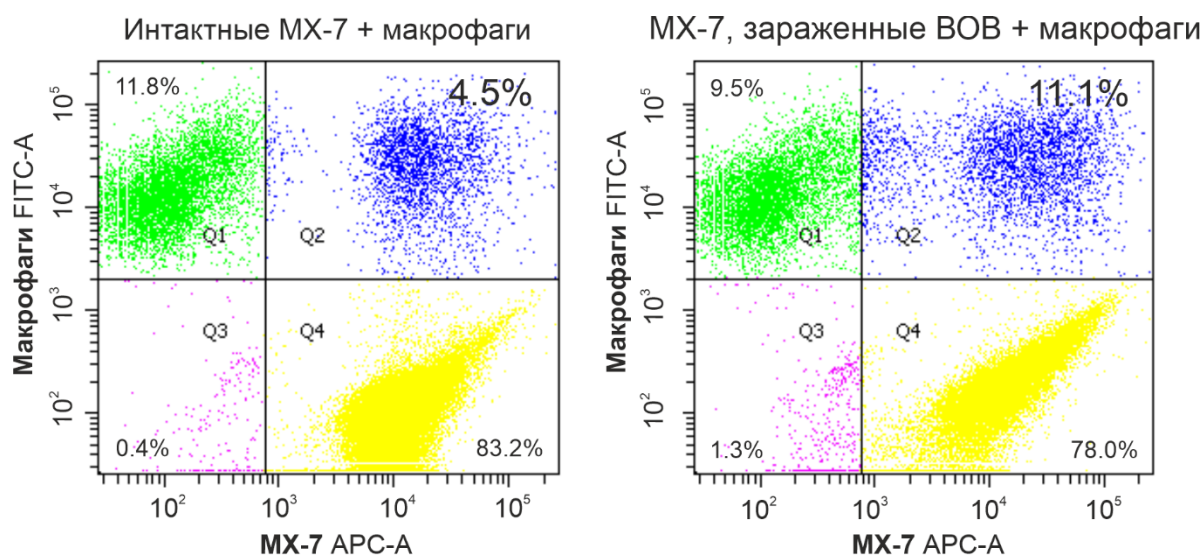


Рис. 41. Фагоцитоз клеток MX-7, обработанных VV-GMCSF-Lact (BOV). Клетки MX-7, меченные красным флуоресцентным красителем Cell Tracker Red (5 мкМ), обрабатывали BOV (0.5 БОЕ/клетку, 48 ч), а затем инкубировали 1 ч совместно с перитонеальными макрофагами мышей СЗН/Не, меченными зеленым флуоресцентным красителем Cell Tracker Green (1 мкМ). Квадрант Q2 соответствует дважды положительной зелено/красной популяции (фагоцитоз).

Для оценки эффективности поглощения макрофагами клеток MX-7, облученных ХПС, к клеткам добавляли перитонеальные макрофаги, инкубировали совместно 1 ч и анализировали методом проточной цитометрии (Рис. 42). Можно видеть, что доля макрофагов, захвативших облученные клетки MX-7 (дважды-положительные, квадрант Q2-1), на 13% больше по сравнению с контрольными клетками MX-7.

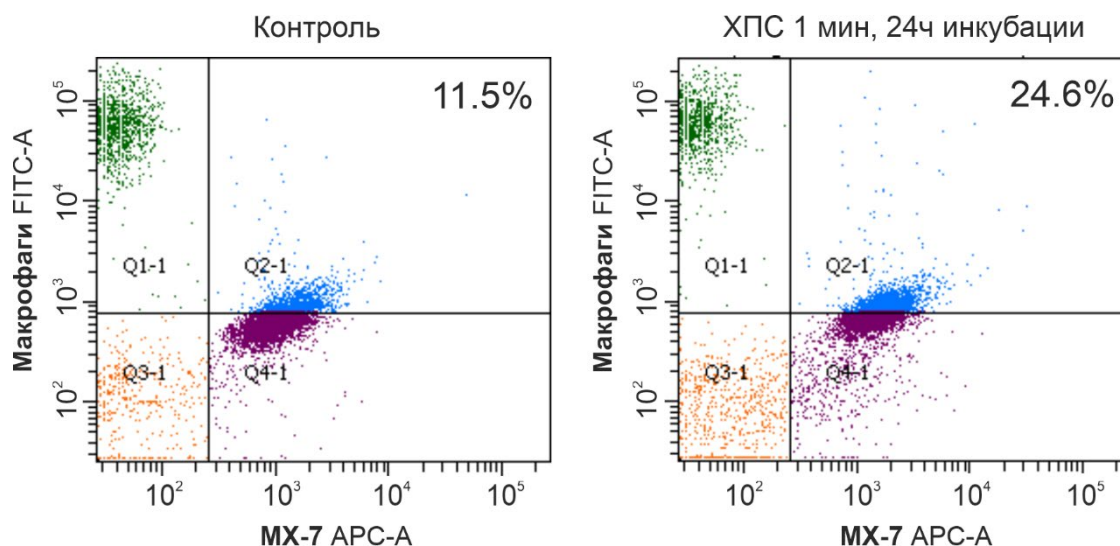


Рис. 42. Фагоцитоз клеток MX-7, облученных холодной плазменной струей (ХПС). Клетки MX-7, меченные красным флуоресцентным красителем Cell Tracker Red (5 мкМ), облучали ХПС (1 мин, гелий 9 л/мин, 4.9 кВ) и спустя 24 ч инкубировали совместно с перитонеальными макрофагами мышей СЗН/Не, меченными зеленым флуоресцентным красителем Cell Tracker Green (1 мкМ). Репрезентативные изображения цитометрического анализа препаратов. Квадрант Q2-1 соответствует дважды положительной зелено/красной популяции (фагоцитоз).

В таблице 3 суммированы данные по доле фагоцитирующих клеток для всех исследуемых цитотоксических агентов. Можно заключить, что среди представленных потенциальных индукторов ICD клетки, обработанные RL2, подвергались фагоцитозу перитонеальными макрофагами в среднем в два раза эффективнее, чем клетки, обработанные ХПС, или зараженные рекомбинантным вирусом осповакцины.

Таблица 3. Сравнение фагоцитирующей активности перитонеальных макрофагов мышей СЗН/Не по отношению к клеткам MX-7, обработанными исследуемыми индукторами ICD. В таблице представлено среднее значение по двум независимым экспериментам.

Индуктор	Доля фагоцитирующих клеток относительно контроля, %
RL2	22.2±1.9
VV-GMCSF-Lact	6.3±1.6
ХПС	11.1±2.0

В таблице представлены средние значения по двум независимым экспериментам.

3.4.3. Стимуляция созревания дендритных клеток красного костного мозга мыши после фагоцитоза опухолевых клеток, обработанных индукторами ICD

Дендритные клетки являются основными антигенпрезентирующими клетками, задействованными в процессинге и презентации опухолевых антигенов Т-лимфоцитам для формирования противоопухолевого иммунного ответа при индукции иммуногенной клеточной гибели [63]. Эффективное поглощение погибающих опухолевых клеток дендритными клетками, а также последующее их созревание необходимо для запуска Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа.

В экспериментах *in vitro* по изучению захвата дендритными клетками опухолевых клеток, обработанных индукторами ICD, использовали дендритные клетки из красного костного мозга мышей СЗН/Не. После выделения костномозговых предшественников дендритных клеток из красного костного мозга, ДК культивировали по стандартной методике в присутствии цитокинов GM-CSF и IL-4 в течение 6 суток, после чего незрелые дендритные клетки были использованы для оценки эффективности захвата опухолевых клеток и анализа созревания ДК. Долю CD11c⁺-клеток среди полученных незрелых дендритных клеток определяли методом проточной цитометрии после иммуноокрашивания флюоресцентно-мечеными моноклональными антителами к CD11c – одному из антигенов дифференцировки ДК. Было обнаружено, что около 90% незрелых миелоидных клеток несли на своей поверхности антиген CD11c, что соответствует фенотипу дендритных клеток (Рис. 43).

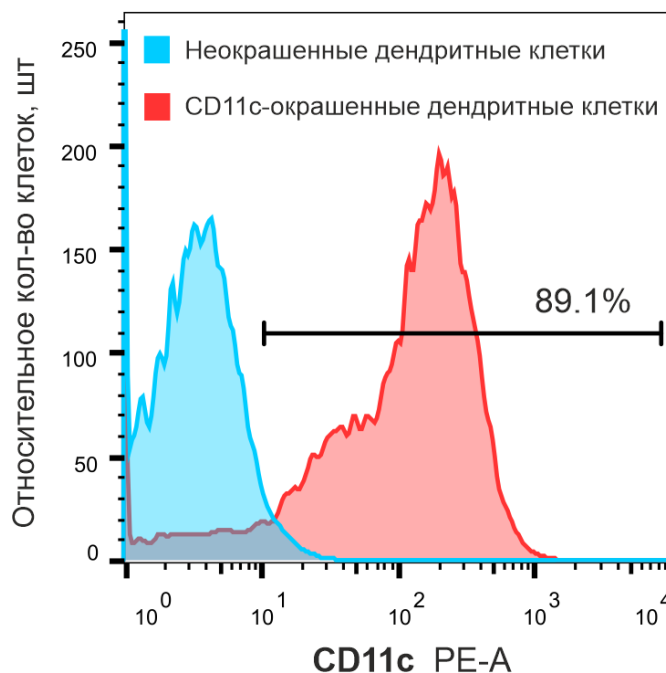


Рис. 43. Иммунофенотипирование мононуклеаров, выделенных из костного мозга бедренных и берцовых костей мышей СЗН/Не. Проточная цитометрия клеток, окрашенных флуоресцентно-мечеными антителами к CD11c. Характерный пример анализа.

Для индукции гибели клетки МХ-7 обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч), VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку, 48 ч), облучали ХПС (1 мин, 24 ч после облучения), после чего окрашивали клетки флуоресцентным красителем цитоплазмы Cell Tracker Red. Дендритные клетки окрашивали флуоресцентным красителем Cell Tracker Green. В качестве контрольного препарата, который вызывает гибель клеток, но не ведет к активации маркеров ICD, использовали цисплатин (150 мкМ, 24 ч). Дендритные клетки инкубировали с погибающими клетками МХ-7 в течение 3 ч и анализировали методом проточной цитометрии, оценивая долю дважды-положительных клеток (Рис. 44, квадрант Q2). Можно видеть, что наибольшая популяция дендритных клеток, захвативших опухолевые клетки или их фрагменты, была обнаружена в образцах с RL2-обработанными клетками МХ-7 (Рис. 44). В образцах клеток, обработанных цисплатином, не было отмечено увеличения фагоцитирующих дендритных клеток по сравнению образцами контрольных необработанных клеток. Клетки МХ-7, инфицированные вирусом, также подвергались фагоцитозу, однако, увеличение дважды-положительной популяции было не таким значительным, как для RL2, и составило 9.0%. Доля ДК клеток, захвативших облученные ХПС погибающие клетки МХ-7, была наименьшей по сравнению с захватом клеток, зараженных вирусом, и клеток, обработанных RL2. Поскольку эффективность захвата погибающих опухолевых клеток дендритными клетками коррелирует с возможностью презентации опухолевых антигенов Т-клеткам, можно предположить, что вакцинация RL2-обработанными клетками стимулирует эффективный захват и процессинг опухолевых антигенов *in vivo*, что сопровождается формированием долгосрочного противоопухолевого иммунного ответа и выражается в ингибировании развития опухолей при повторной трансплантации живых опухолевых клеток в экспериментах с RL2.

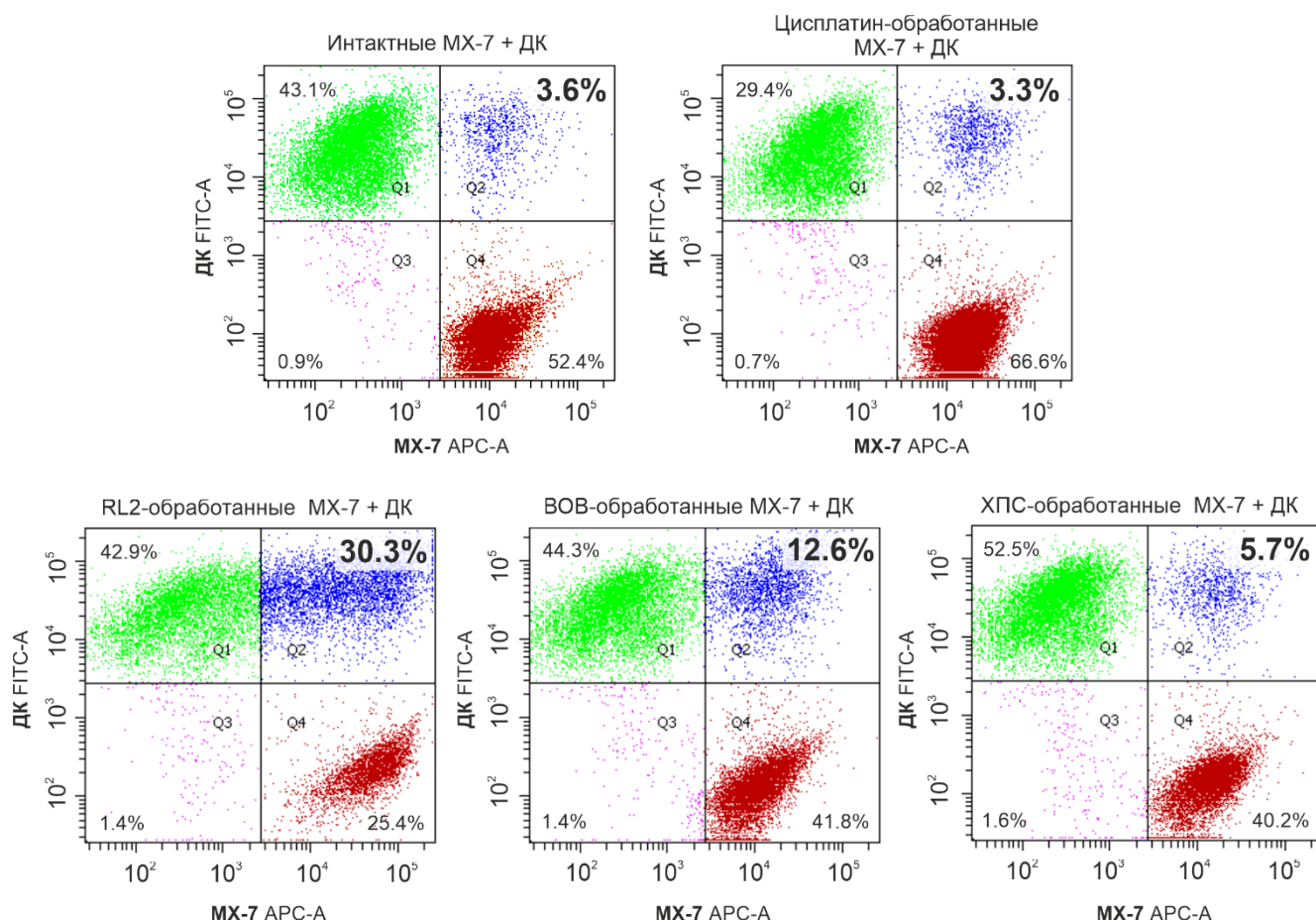


Рис. 44. Фагоцитоз клеток MX-7 незрелыми дендритными клетками (ДК) красного костного мозга мышей СЗН/Не. Клетки MX-7, меченные красным флуоресцентным красителем Cell Tracker Red (5 мкМ), обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч), VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку, 48 ч), ХПС (1 мин, гелий 9 л/мин, 4.9 кВ; 24 ч после облучения) или цисплатином (150 мкМ, 24 ч), после чего инкубировали 3 ч совместно с дендритными клетками из красного костного мозга мышей СЗН/Не, меченными зеленым флуоресцентным красителем Cell Tracker Green (1 мкМ). Репрезентативные изображения цитометрического анализа препаратов. Квадрант Q2 соответствует дважды положительной зелено/красной популяции (фагоцитоз).

Для оценки созревания дендритных клеток, поглотивших погибающие опухолевые клетки, незрелые дендритные клетки красного костного мозга мышей инкубировали в течение 18 ч с клетками MX-7, обработанными индукторами ICD, как описано выше для экспериментов по исследованию фагоцитирующей активности ДК. После инкубации образцы клеток окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами к антигенам CD11c и МНС II, и анализировали методом проточной цитометрии. Доля МНС II-положительных клеток была наибольшей в образцах дендритных клеток, инкубированных с клетками MX-7, обработанными рекомбинантным аналогом лактапина RL2, и составляла около 22% (Рис. 45). В образцах ДК, инкубированных с клетками, облученными холодной плазменной струей, доля МНС II-положительных клеток была

около 11%. В образцах ДК, инкубированных с клетками, зараженными вирусом или обработанных цисплатином, МНС II⁺-популяция была сравнима с таковой в контрольной группе (Рис. 45 Б).

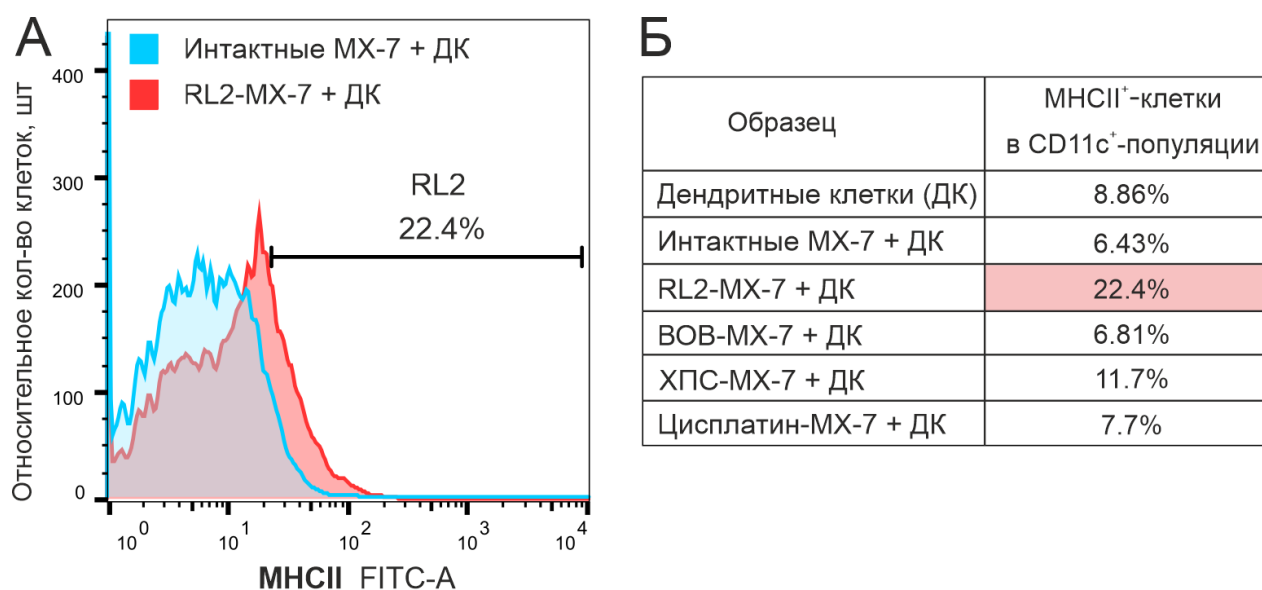


Рис. 45. Оценка созревания дендритных клеток (ДК) красного костного мозга мышей СЗН/Не при инкубации с погибающими опухолевыми клетками МХ-7. Клетки МХ-7 обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч), VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку, 48 ч), ХПС (1 мин, гелий 9 л/мин, 4.9 кВ; 24 ч после облучения) или цисплатином (150 мкМ, 24 ч), после чего инкубировали 18 ч совместно с ДК мышей СЗН/Не. После инкубации образцы окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами к CD11c, МНС II и анализировали методом проточной цитометрии. В качестве дополнительного контроля использовали ДК без стимуляции, окрашенные антителами к CD11c. Анализ МНС II⁺- популяций клеток проводили среди CD11c⁺-клеток, соответствующих фенотипу дендритных клеток. **А.** Доля МНС II⁺-популяции клеток от общего количества CD11c⁺-клеток в образце с контрольными и RL2-обработанными клетками. **Б.** Сравнительная таблица доли зрелых ДК (МНС II⁺) в образцах после активации гибнущими клетками.

МНС II или главный комплекс гистосовместимости 2-го типа является основным посредником презентации антигенов Т-клеткам. Если МНС I типа экспрессируется практически во всех клетках организма кроме эритроцитов, то экспрессия МНС II типа характерна в основном для «профессиональных» антигенпрезентирующих клеток, таких как макрофаги, В-клетки и особенно дендритные клетки [255]. Известно, что незрелые дендритные клетки имеют низкий уровень поверхностного МНС II, а при активации и созревании дендритных клеток происходит увеличение его представленности на поверхности клетки, что является маркером созревания ДК

[256]. Можно заключить, что наблюдаемый ранее захват дендритными клетками RL2-обработанных клеток сопровождается созреванием дендритных клеток. Наблюдаемая слабая стимуляция ДК клетками MX-7, инфицированными вирусом VV-GMCSF-Lact, могла быть следствием опосредованного влияния вируса на ДК. Известно, что специализированные белки вируса осповакцины способны не только блокировать апоптоз на ранней стадии инфекции, но и тормозить созревание дендритных клеток. Например, синтезируемый вирусами в зараженных клетках белок M2 секретируется во внеклеточное пространство и связывается с молекулами CD80 на ДК, блокируя их созревание [257,258]. Таким образом, несмотря на наблюдаемый захват дендритными клетками клеток MX-7, зараженных VV-GMCSF-Lact (Рис. 44), такой захват ведет к слабой активации созревания ДК и, соответственно, делает менее эффективным каскад реакций, ведущих к формированию долгосрочного иммунного ответа на опухолевые антигены.

На основании результатов исследования, можно заключить, что среди клеток, обработанных потенциальными индукторами ICD, только RL2- и ХПС-обработанные клетки стимулировали созревание дендритных клеток.

3.4.4. Захват опухолевых клеток $CD11c^+$ -клетками селезенок мышей

Поглощение дендритными клетками погибающих опухолевых клеток также исследовали в модели *in vivo*. Из данных литературы известно, что при внутривенном введении мышам погибающих опухолевых клеток, облученных ультрафиолетовым излучением, как индуктором ICD, уже через 3 ч можно видеть захват опухолевых клеток ДК клетками селезенки [248]. Клетки MX-7 обрабатывали исследуемыми индукторами иммуногенной гибели, как описано выше в экспериментах по исследованию фагоцитарной активности ДК *in vitro*, вводили мышам внутривенно и через 3 ч анализировали захват опухолевых клеток дендритными клетками селезенки. Клетки MX-7 предварительно окрашивали красным флуоресцентным красителем Cell Tracker Red, инкубировали с исследуемыми индукторами: RL2, VV-GMCSF-Lact или облучали ХПС, после чего внутривенно вводили мышам СЗН/Не. Через 3 ч селезенки мышей извлекали, готовили из них клеточную суспензию и проводили реакцию иммуноокрашивания, используя флуоресцентно-меченные антитела к антигену CD11c, для визуализации ДК. При анализе полученных образцов методом проточной цитометрии выделяли популяцию $CD11c^+$ -клеток, среди которых определяли долю клеток с красным флуоресцентным сигналом, соответствующему поглощенным клеткам MX-7 (Рис. 46). Можно видеть, что среди $CD11c^+$ ДК селезенки мышей, только в образцах селезенки животных, получивших инъекции RL2-обработанных клеток, достоверно увеличивается популяция, соответствующая популяции дендритных клеток, захвативших RL2-обработанные клетки (Рис. 46 А, популяция P8).

В образцах клеток селезенки мышей, которым вводили клетки, зараженные VV-GMCSF-Lact или облученные ХПС, не происходит изменения данной популяции относительно контрольных клеток (Рис. 46 Б).

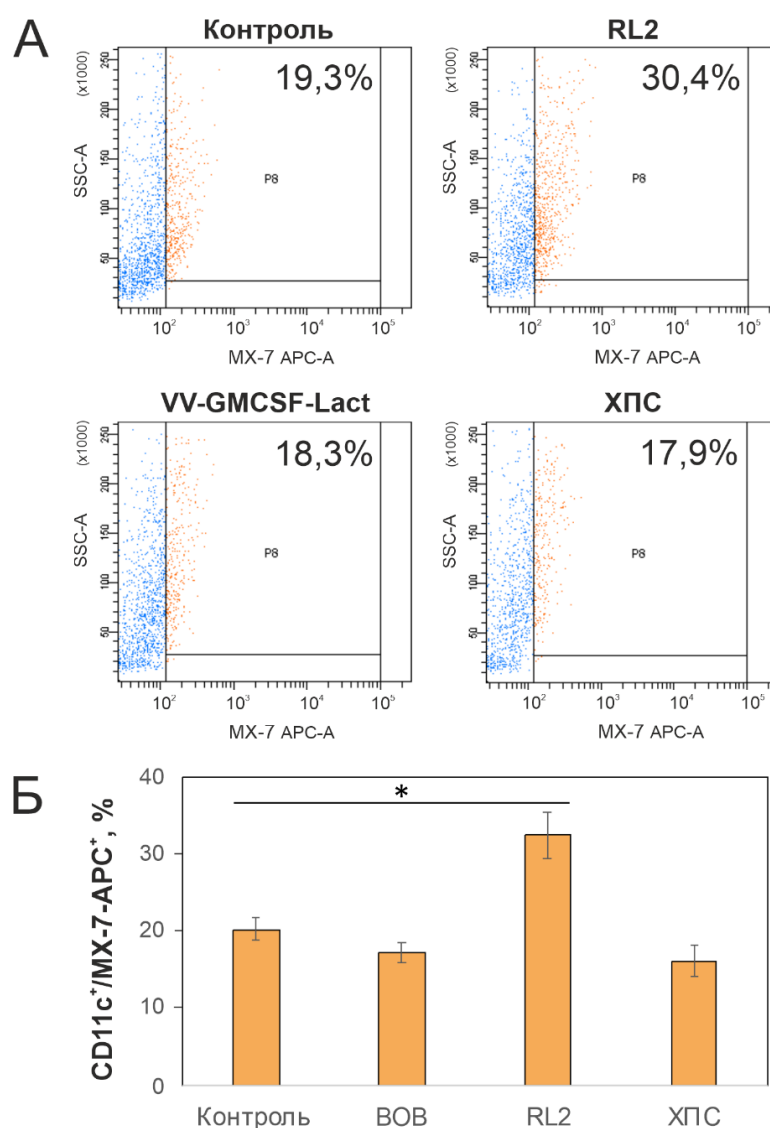


Рис. 46. Захват опухолевых клеток MX-7 CD11c⁺-клетками селезенки мышей *in vivo*. Клетки MX-7 предварительно окрашивали Cell Tracker Red (5 мкМ), обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч), VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку, 48 ч) или облучали ХПС (1 мин, гелий 9 л/мин, 4.9 кВ; 24 ч после облучения), после чего внутривенно вводили мышам СЗН/Не. Через 3 ч селезенки извлекали, измельчали, окрашивали антителами к CD11c и анализировали методом проточной цитометрии. **А.** Репрезентативные изображения анализа захвата APC⁺-клеток MX-7 клетками селезенки. Доля APC⁺-клеток представлена от общего количества CD11c⁺-клеток в образцах (APC: Ex=650 нм, Em=660 нм). **Б.** Средние значения популяции CD11c⁺-клеток, захвативших гибнущие клетки MX-7. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD (n = 4). Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для p < 0.05.

Можно заключить, что наблюдаемый нами низкий уровень интерферона альфа, секретируемого клетками, облученными холодной плазмой, и отсутствие захвата таких клеток дендритными клетками *in vivo*, в совокупности с данными об активации молекулярных маркеров ICD *in vitro*, позволяет говорить о ХПС как о слабом индукторе ICD. Клетки, зараженные рекомбинантными вирусами осповакцины, активировали основные молекулярные маркеры ICD *in vitro*, но не подвергались захвату ДК селезенки *in vivo* и не стимулировали созревание ДК *in vitro*.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что среди исследуемых индукторов клеточной гибели именно RL2 вызывает наиболее существенные изменения, ведущие к созреванию дендритных клеток и презентации опухолевых антигенов Т-клеткам: усиливает выход интерферона альфа из погибающих клеток, стимулирует активный фагоцитоз погибающих клеток макрофагами *in vitro* и дендритными клетками *in vitro* и *in vivo*, стимулирует формирование комплекса МНС II на поверхности клетки. В совокупности с данными о вакцинирующем эффекте клеток, обработанных RL2, можно заключить, что такие клетки стимулируют адаптивный иммунитет против опухолевых антигенов, а RL2 можно считать перспективным препаратом-партнером для химиотерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были исследованы новые потенциальные индукторы иммуногенной клеточной гибели. Впервые показана способность рекомбинантного аналога лактапина RL2, рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующего лактапин и GM-CSF человека, и холодной плазменной струи индуцировать гибель опухолевых клеток с признаками иммуногенной клеточной гибели *in vitro*. Под действием данных агентов происходит экспозиция кальретикулина и белка теплового шока HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану, высвобождение АТФ и выход белка HMGB1 из клетки в межклеточное пространство, что необходимо для созревания дендритных клеток и презентации опухолевых антигенов антиген-специфическим Т-лимфоцитам. Установлено, что только RL2 и VV-GMCSF-Lact вызывают высвобождение интерферона альфа в межклеточное пространство погибающих клеток. Показано, что аналог лактапина RL2 способен к индукции иммуногенной гибели клеток *in vivo*, в результате которой происходит формирование специфического противоопухолевого иммунного ответа. Показано, что вакцинация суммарным пулом RL2-обработанных клеток в состоянии раннего апоптоза и позднего апоптоза/некроза оказывает больший вакцинирующий эффект. Установлено, что ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы этилпируват способен усиливать вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток. Впервые показано, что вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток выше, чем вакцинирующий эффект опухолевых клеток, зараженных рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact. Показано, что введение гена лактапина в геном вируса осповакцины не влияет на способность вируса индуцировать гибель клеток по иммуногенному типу. Впервые показано увеличение уровня ядерного негистонового белка HMGB1 в сыворотке крови животных-опухоленосителей после облучения опухолей холодной плазменной струей. Показано, что опухолевые клетки, гибель которых вызвана рекомбинантным аналогом лактапина RL2, наиболее эффективно поглощаются антигенпрезентирующими клетками *in vitro* и *in vivo* и стимулируют созревание дендритных клеток. Обобщенные результаты, полученные в работе и описывающие особенности индукции ICD рекомбинантным аналогом лактапина RL2, рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact и холодной плазменной струей, представлены в таблице 4.

Таблица 4. Сравнительная характеристика индукторов иммуногенной клеточной гибели

Признак ICD	Рекомбинантный аналог лактапина RL2	Рекомбинантный вирус осповакцины, VV-GMCSF-Lact	Холодная плазменная струя (ХПС)
Экспозиция CRT	46.0% для MDA-MB-231 43.3 % для MX-7	75.0% для MDA-MB-231 55.0 % для MX-7	28.0% для MX-7
Экспозиция HSP70	66.2% для MDA-MB-231 56.2% для MX-7	22.5% для MDA-MB-231	46.0% для MX-7
Выход АТФ (относительно контрольных клеток)	Интенсивность люминисценции увеличилась в 4.8 и 28 раз для клеток MDA-MB-231 и MX-7, соответственно	Интенсивность люминисценции увеличилась в 6.7 раз для клеток MDA-MB-231	-
Выход HMGB1 (относительно контрольных клеток)	1. Снижение суммарного белка HMGB1 2. Концентрация белка HMGB1 в среде через 24 ч инкубации увеличилась в 6 и 16 раз для клеток MDA-MB-231 и MX-7 (до 80 нг/мл)	Показано снижение суммарного белка HMGB1	1. Снижение суммарного белка HMGB1. 2. Концентрация HMGB1 в среде через 24 ч после облучения увеличилась в 9 раз для клеток MX-7 (до 6 нг/мл)
Выход ИНФ альфа	Концентрация ИНФ альфа в среде через 12 ч инкубации увеличилась в 7 раз для клеток MX-7 (до 140 нг/мл)	Концентрация ИНФ альфа в среде через 48 ч инкубации увеличилась в 4 раза для клеток MX-7 (до 80 нг/мл)	Не было отмечено увеличения концентрации ИНФ альфа через 24 ч для клеток MX-7

Фагоцитирующая активность перитонеальных макрофагов против погибающих клеток	Популяция макрофагов, захвативших RL2 – обработанные клетки MX-7, увеличилась на 22.2%	Популяция макрофагов, захвативших клетки MX- 7, инфицированные вирусом, увеличилась на 6.3%	Популяция макрофагов, захвативших клетки MX-7, облученные ХПС увеличилась на 11.1%
Фагоцитирующая активность ДК против погибающих клеток и созревание ДК	Популяция ДК, захвативших RL2 – обработанные клетки MX-7, увеличилась на 26.7%. Популяция МНС II ⁺ -клеток составила 22.4%	Популяция ДК, захвативших клетки MX- 7, инфицированные вирусом, увеличилась на 9.0%. Популяция МНС II ⁺ -клеток составила 6.81%	Популяция ДК, захвативших клетки MX-7, облученные ХПС, увеличилась на 2.1%. Популяция МНС II ⁺ -клеток составила 11.7%
Захват опухолевых клеток CD11c ⁺ - клетками селезенки	Популяция CD11c ⁺ - клеток селезенки, захвативших RL2- обработанные клетки MX-7, увеличилась на 11.1% через 3 ч после введения мышам	Не было отмечено захвата CD11c ⁺ -клетками селезенки клеток MX-7, инфицированных вирусом	Не было отмечено захвата CD11c ⁺ - клетками селезенки клеток MX-7, обученных ХПС
Дополнительные признаки ICD <i>in vivo</i>	-	-	В сыворотке крови мышей- опухоленосителей после облучения ХПС обнаружено двукратное увеличение уровня белка HMGB1
Вакцинирующий эффект	60% мышей без опухоли при использовании этилпирувата и 43% без него, соответственно	До 20% мышей без опухоли	-

Таким образом, было показано, что среди представленных индукторов рекомбинантный аналог лактапина RL2 наиболее эффективно вызывает иммуногенную клеточную гибель *in vitro* и обладает способностью вызывать противоопухолевый иммунный ответ *in vivo*. Полученные данные об особенностях индукции иммуногенной клеточной гибели под действием рекомбинантного аналога лактапина RL2, рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующего лактапин, и холодной плазменной струи будут полезны для понимания закономерностей механизма их противоопухолевого действия и последующего внедрения этих подходов в клиническую практику.

ВЫВОДЫ

1. В обработанных опухолевых клетках рекомбинантный аналог лактапина RL2, рекомбинантный вирус VV-GMCSF-Lact и холодная плазменная струя вызывают активацию маркеров, характерных для иммуногенного типа гибели (ICD), в экспериментах *in vitro*: экспозицию кальретикулина и HSP70 на внешней плазматической мембране, увеличение концентраций внеклеточного АТФ, негистонового ядерного белка HMGB1 и ИФНа. Эффективность активации маркеров ICD в используемых условиях снижается в ряду RL2 > VV-GMCSF-Lact > холодная плазменная струя.
2. Продукция трансгенов цитотоксических белков лактапина или апоптоина рекомбинантными вирусами осповакцины не влияет на способность вируса активировать маркеры ICD в зараженных клетках.
3. Эффект противоопухолевой вакцинации погибающими опухолевыми клетками был показан для клеток, обработанных RL2. Ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы этилпируват усиливает противоопухолевый вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток с 43% до 60%. Опухолевые клетки, зараженные рекомбинантным вирусом VV-GMCSF-Lact, не оказывают противоопухолевого вакцинирующего эффекта при трансплантации мышам.
4. Облучение зоны опухоли у мышей холодной плазменной струей ведет к двукратному повышению концентрации маркера иммуногенной клеточной гибели HMGB1 в сыворотке крови.
5. Сравнение индукторов клеточной гибели показало, что опухолевые клетки, гибель которых индуцирована рекомбинантным аналогом лактапина RL2, наиболее эффективно поглощаются антигенпрезентирующими клетками *in vitro* и *in vivo* и стимулируют созревание дендритных клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Koval O., Kochneva G., Tkachenko A., **Troitskaya O.**, Sivolobova G., Grazhdantseva A., Nushtaeva A., Kuligina E., Richter V. Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells // BioMed. Res. Int. – 2017. – V. 2017. – P. 1–14. – doi: 10.1155/2017/3620510.
2. **Troitskaya O.**, Varlamov M., Nushtaeva A., Richter V., Koval O. Recombinant lactaptin induces immunogenic cell death and creates an antitumor vaccination effect *in vivo* with enhancement by an IDO inhibitor // Molecules. – 2020. – V. 25. – P. 2804. – doi:10.3390/molecules25122804.
3. **Troitskaya O.**, Golubitskaya E., Biryukov M., Varlamov M., Gugin P., Milakhina E., Richter V., Schweigert I., Zakrevsky D., Koval O. Non-thermal plasma application in tumor-bearing mice induces increase of serum HMGB1. // IJMS. – 2020. – V. 21. – P. 5128. – doi: 10.3390/ijms21145128.
4. **Троицкая О.С.**, Новак Д.Д., Рихтер В.А., Коваль О.А. Иммуногенная гибель опухолевых клеток в терапии онкологических заболеваний // ActaNaturae. – 2022. – Т. 14. – № 1 – С. 40-53. – doi: 10.32607/actanaturae.11523.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Vacchelli E., Aranda F., Eggermont A. et al. Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers // *Oncoimmunology*. – 2014. – V. 3. – № 1. – P. e27878.
2. Богданова И.М., Пономаренко Е.А. Стимуляция опухолеспецифического иммунного ответа цитостатическими химиопрепаратами в популяции клеток селезенки мышей *in vitro* // *Иммунология*. – 2015. – Т. 36. – № 3. – С. 158–161.
3. Vacchelli E., Senovilla L., Eggermont A. et al. Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers // *Oncoimmunology*. – 2013. – V. 2. – № 3. – P. e23510.
4. Casares N., Pequignot M., Tesniere A. et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death // *J. Exp. Med.* – 2005. – V. 202. – № 12. – P. 1691–1701.5.
5. Kepp O., Senovilla L., Vitale I. et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death // *Oncoimmunology*. – 2014. – V. 3. – № 9. – P. e955691.
6. Boon T., Coulie P., Eynde B. et al. Human T cell responses against melanoma // *Annu. Rev. Immunol.* – 2006. – V. 24. – № 1. – P. 175–208.
7. Tagliamonte M., Petrizzo A., Tornesello M. et al. Antigen-specific vaccines for cancer treatment // *Hum. Vaccin. Immunother.* – 2014. – V. 10. – № 11. – P. 3332–3346.
8. Brown S., Heinisch I., Ross E. et al. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment // *Nature*. – 2002. – V. 418. – № 6894. – P. 200–203.
9. Lv Z., Bian Z., Shi L. et al. Loss of cell surface CD47 Clustering formation and binding avidity to SIRP α facilitate apoptotic cell clearance by macrophages: 2 // *J. I.* – 2015. – V. 195. – № 2. – P. 661–671.
10. Lechner M., Liebertz D., Epstein A. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells // *J. I.* – 2010. – V. 185. – № 4. – P. 2273–2284.
11. Groth C., Hu X., Weber R. et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression // *Br. J. Cancer*. – 2019. – V. 120. – № 1. – P. 16–25.
12. Soliman H., Mediavilla-Varela M., Antonia S. Indoleamine 2,3-dioxygenase: is it an immune suppressor? // *Cancer J.* – 2010. – V. 16. – № 4. – P. 354–359.
13. Gabrilovich D., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – V. 12. – № 4. – P. 253–268.
14. Semenov D., Fomin A., Kuligina E. et al. Recombinant analogs of a novel milk pro-apoptotic peptide, lactaptin, and their effect on cultured human Cells // *Protein J.* – 2010. – V. 29. – № 3. – P. 174–180.

15. Richter M., Wohlfromm F., Kähne T. et al. The recombinant fragment of human κ -casein induces cell death by targeting the proteins of mitochondrial import in breast cancer cells // *Cancers*. – 2020. – V. 12. – № 6. – P. 1427.
16. Koval O., Tkachenko A., Fomin A. et al. Lactaptin induces p53-independent cell death associated with features of apoptosis and autophagy and delays growth of breast cancer cells in mouse xenografts // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9. – № 4. – P. e93921.
17. Bagamanshina A., Troitskaya O., Nushtaeva A. et al. Cytotoxic and antitumor activity of lactaptin in combination with autophagy inducers and inhibitors // *Biomed. Res. Int.* – 2019. – V. 2019. – P. 4087160.
18. Koval O., Fomin A., Kaledin V. et al. A novel pro-apoptotic effector lactaptin inhibits tumor growth in mice models // *Biochimie*. – 2012. – V. 94. – № 12. – P. 2467–2474.
19. Workenhe S., Mossman K. Oncolytic virotherapy and immunogenic cancer cell death: sharpening the sword for improved cancer treatment strategies // *Mol. Ther.* – 2014. – V. 22. – № 2. – P. 251–256.
20. Kochneva G., Sivolobova G., Tkacheva A. et al. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7. – № 45. – P. 74171–74188.
21. Lin A., Xiang B., Merlino D. et al. Non-thermal plasma induces immunogenic cell death *in vivo* in murine CT26 colorectal tumors // *OncoImmunology*. – 2018. – V. 7. – № 9. – P. e1484978.
22. Golubitskaya E., Troitskaya O., Yelak E. et al. Cold physical plasma decreases the viability of lung adenocarcinoma cells // *Acta Naturae*. – 2019. – V. 11. – № 3. – P. 16–19.
23. Schweigert I., Zakrevsky D., Gugin P. et al. Interaction of cold atmospheric argon and helium plasma jets with bio-target with grounded substrate beneath // *Applied Sciences*. – 2019. – V. 9. – № 21. – P. 4528.
24. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J., Vitale I. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015 // *Cell. Death Differ.* – 2015. – V. 22. – № 1. – P. 58–73.
25. Davidovich P., Kearney C., Martin S. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis // *Biol. Chem.* – 2014. – V. 395. – № 10. – P. 1163–1171.
26. Nowak A., Lake R., Marzo A. et al. Induction of tumor cell apoptosis *in vivo* increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells // *J. Immunol.* – 2003. – V. 170. – № 10. – P. 4905–4913.
27. Galluzzi L., Senovilla L., Zitvogel L. et al. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2012. – V. 11. – № 3. – P. 215–233.
28. Scheffer S., Nave H., Korangy F. et al. Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response *in vivo* // *Int. J. Cancer*. – 2003. – V. 103. – № 2. – P. 205–211.

29. Tesniere A., Schlemmer F., Boige V. et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin // *Oncogene*. 2010. – V. 29. – № 4. – P. 482–491.
30. Menger L., Vacchelli E., Adjemian S. et al. Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death // *Sci. Transl. Med.* – 2012. – V. 4. – № 143. – P. 143ra99-143ra99.
31. Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F. et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death // *Nat. Med.* – 2007. – V. 13. – № 1. – P. 54–61.
32. Panaretakis T., Kepp O., Brockmeier U. et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death // *EMBO J.* – 2009. – V. 28. – № 5. – P. 578–590.
33. Bezu L., Sauvat A., Humeau J. et al. eIF2 α phosphorylation is pathognomonic for immunogenic cell death // *Cell Death Differ.* – 2018. – V. 25. – № 8. – P. 1375–1393.
34. Rufo N., Garg A., Agostinis P. The unfolded protein response in immunogenic cell death and cancer immunotherapy // *Trends Cancer.* – 2017. – V. 3. – № 9. – P. 643–658.
35. Garg A., Krysko D., Verfaillie T. et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death: CRT, ATP, and immunogenic cancer cell death // *The EMBO Journal*. – 2012. – V. 31. – № 5. – P. 1062–1079.
36. Sukkurwala A., Martins I., Wang Y. et al. Immunogenic calreticulin exposure occurs through a phylogenetically conserved stress pathway involving the chemokine CXCL8 // *Cell Death Differ.* – 2014. – V. 21. – № 1. – P. 59–68.
37. Tufi R., Panaretakis T., Bianchi K. et al. Reduction of endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels favors plasma membrane surface exposure of calreticulin // *Cell Death Differ.* – 2008. – V. 15. – № 2. – P. 274–282.
38. Moserova I., Truxova I., Garg A. et al. Caspase-2 and oxidative stress underlie the immunogenic potential of high hydrostatic pressure-induced cancer cell death // *OncoImmunology*. – 2017. – V. 6. – № 1. – P. e1258505.
39. Colangelo T., Polcaro G., Ziccardi P. et al. The miR-27a-calreticulin axis affects drug-induced immunogenic cell death in human colorectal cancer cells // *Cell Death Dis.* – 2016. – V. 7. – № 2. – P. e2108–e2108.
40. Liu C., Leclair P., Pedari F. et al. Integrins and ERp57 coordinate to regulate cell surface calreticulin in immunogenic cell death // *Front. Oncol.* – 2019. – V. 9. – P. 411.
41. Gardai S., McPhillips K., Frasch S. et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte // *Cell*. – 2005. – V. 123. – № 2. – P. 321–334.
42. Chen X., Fosco D., Kline D. et al. Calreticulin promotes immunity and type I interferon-dependent survival in mice with acute myeloid leukemia // *OncoImmunology*. – 2017. – V. 6. – № 4. – P. e1278332.

43. Martins I., Kepp O., Schlemmer F. et al. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress // *Oncogene*. – 2011. – V. 30. – № 10. – P. 1147–1158.
44. Fucikova J., Kralikova P., Fialova A. et al. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response // *Cancer Res.* – 2011. – V. 71. – № 14. – P. 4821–4833.
45. Krysko D., Garg A., Kaczmarek A. et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer*. – 2012. – V. 12. – № 12. – P. 860–875.
46. Inoue H., Tani K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments // *Cell Death Differ.* – 2014. – V. 21. – № 1. – P. 39–49.
47. Yatim N., Jusforgues-Saklani H., Orozco S. et al. RIPK1 and NF- κ B signaling in dying cells determines cross-priming of CD8⁺ T cells // *Science*. – 2015. – V. 350. – № 6258. – P. 328–334.
48. Bedard K., Szabo E., Michalak M. et al. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57 // *Int. Rev. Cytol.* – 2005. – V. 245. – P. 91–121.
49. Pawaria S., Binder R. CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization // *Nat. Commun.* – 2011. – V. 2. – № 1. – P. 521.
50. Montico B., Nigro A., Casolaro V. et al. Immunogenic apoptosis as a novel tool for anticancer vaccine development // *IJMS*. – 2018. – V. 19. – № 2. – P. 594.
51. Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F. et al. Immunological aspects of cancer chemotherapy // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – V. 8. – № 1. – P. 59–73.
52. Apetoh L., Ghiringhelli F., Tesniere A. et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy // *Nat. Med.* – 2007. – V. 13. – № 9. – P. 1050–1059.
53. Chekeni F., Ravichandran K. The role of nucleotides in apoptotic cell clearance: implications for disease pathogenesis // *J. Mol. Med. (Berl)*. – 2011. – V. 89. – № 1. – P. 13–22.
54. Vacchelli E., Galluzzi L., Eggermont A. et al. Trial Watch: Immunostimulatory cytokines // *Oncoimmunology*. – 2012. – V. 1. – № 4. – P. 493–506.
55. Galluzzi L., Vitale I., Warren S. et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death // *J. Immunother. Cancer*. – 2020. – V. 8. – № 1. – P. e000337.
56. Vacchelli E., Sistigu A., Yamazaki T. et al. Autocrine signaling of type 1 interferons in successful anticancer chemotherapy // *Oncoimmunology*. – 2015. – V. 4. – № 8. – P. e988042.
57. Sistigu A., Yamazaki T., Vacchelli E. et al. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy // *Nat. Med.* – 2014. – V. 20. – № 11. – P. 1301–1309.

58. Eiz-Vesper B., Schmetzer H. Antigen-presenting cells: potential of proven und new players in immune therapies // *Transfus. Med. Hemother.* – 2020. – V. 47. – № 6. – P. 429–431.
59. Wculek S., Cueto F., Mujal A. et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy // *Nat. Rev. Immunol.* – 2020. – V. 20. – № 1. – P. 7–24.
60. Pühr S., Lee J., Zvezdova E. et al. Dendritic cell development—history, advances, and open questions // *Seminars in Immunology.* – 2015. – V. 27. – № 6. – P. 388–396.
61. Balan S., Saxena M., Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* – 2019. – V. 348. – P. 1–68.
62. Macri C., Fancke B., Radford K. et al. Monitoring dendritic cell activation and maturation // *Methods Mol. Biol.* – 2019. – V. 1988. – P. 403–418.
63. Lamberti M., Nigro A., Mentucci F. et al. Dendritic cells and immunogenic cancer cell death: a combination for improving antitumor immunity // *Pharmaceutics.* – 2020. – V. 12. – № 3. – P. 256.
64. Gabrilovich D., Corak J., Ciernik I. et al. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer // *Clin. Cancer Res.* – 1997. – V. 3. – № 3. – P. 483–490.
65. Griffith T., Kazama H., VanOosten R. et al. Apoptotic cells induce tolerance by generating helpless CD8⁺ T cells that produce TRAIL // *J. Immunol.* – 2007. – V. 178. – № 5. – P. 2679–2687.
66. Garg A., Romano E., Rufo N. et al. Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy: mechanisms and clinical translation // *Cell Death Differ.* – 2016. – V. 23. – № 6. – P. 938–951.
67. Cirone M., Di Renzo L., Litti L. et al. Activation of dendritic cells by tumor cell death // *OncoImmunology.* – 2012. – V. 1. – № 7. – P. 1218–1219.
68. Di Blasio S., Wortel I., Bladel D. et al. Human CD1c⁺ DCs are critical cellular mediators of immune responses induced by immunogenic cell death // *OncoImmunology.* – 2016. – V. 5. – № 8. – P. e1192739.
69. Iyoda T., Shimoyama S., Liu K. et al. The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and *in vivo* // *J. Exp. Med.* – 2002. – V. 195. – № 10. – P. 1289–1302.
70. Dudziak D., Kamphorst A., Heidkamp G. et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo* // *Science.* – 2007. – V. 315. – № 5808. – P. 107–111.
71. Hou W., Zhang Q., Yan Z. et al. Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity // *Cell Death Dis.* – 2013. – V. 4. – № 12. – P. e966.
72. Kazama H., Ricci J., Herndon J. et al. Immune tolerance induction by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of hmgbl // *Immunity.* – 2008. – V. 29. – № 1. – P. 21–32.

73. Попова, Н.А. Новая иммунология: учебное пособие // Новосибирск: Издательство НГУ, 2012. – С. 240–245.
74. Voskoboinik I., Whisstock J., Trapani J. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – V. 15. – № 6. – P. 388–400.
75. Барышников А.Ю. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы организма // *Практическая онкология.* – 2003. – Т. 4. – № 3. – С. 127–130.
76. Nierkens S., Tel J., Janssen E. et al. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants? // *Trends Immunol.* – 2013. – V. 34. – № 8. – P. 361–370.
77. Sánchez-Paulete A., Teixeira A., Cueto F. et al. Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy // *Ann. Oncol.* – 2017. – V. 28. – P. 44–55.
78. Heath W., Carbone F. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance // *Nat. Rev. Immunol.* – 2001. – V. 1. – № 2. – P. 126–134.
79. Melief C. Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? // *Eur. J. Immunol.* – 2003. – V. 33. – № 10. – P. 2645–2654.
80. Galetto A., Buttiglieri S., Forno S. et al. Drug- and cell-mediated antitumor cytotoxicities modulate cross-presentation of tumor antigens by myeloid dendritic cells // *Anticancer Drugs.* – 2003. – V. 14. – № 10. – P. 833–843.
81. Льюин Б., Кассимерис В., Лингаппа П. и др. Клетки: пер. с англ. // М.: Бином. – 2011. – С. 23.
82. Corbett E., Michalak M. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? // *Trends Biochem. Sci.* – 2000. – V. 25. – № 7. – P. 307–311.
83. Michalak M., Groenendyk J., Szabo E. et al. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum // *Biochem. J.* – 2009. – V. 417. – № 3. – P. 651–666.
84. Ashby M., Tepikin A. ER calcium and the functions of intracellular organelles // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2001. – V. 12. – № 1. – P. 11–17.
85. Nakamura K., Zuppin A., Arnaudeau S. et al. Functional specialization of calreticulin domains // *J. Cell Biol.* – 2001. – V. 154. – № 5. – P. 961–972.
86. Mery L., Mesaeli N., Michalak M. et al. Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca²⁺ storage and decreases store-operated Ca²⁺ influx // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – № 16. – P. 9332–9339.
87. Yoon G., Lee H., Jung Y. et al. Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – № 4. – P. 1117–1120.
88. Kobayashi S., Uchiyama S., Sone T. et al. Calreticulin as a new histone binding protein in mitotic chromosomes // *Cytogenet. Genome Res.* – 2006. – V. 115. – № 1. – P. 10–15.

89. Hebert D., Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases // *Physiol Rev.* – 2007. – V. 87. – № 4. – P. 1377–1408.
90. Turano C., Gaucci E., Grillo C. et al. ERp57/GRP58: a protein with multiple functions // *Cell Mol. Biol. Lett.* – 2011. – V. 16. – № 4. – P. 539–563.
91. Gao B., Adhikari R., Howarth M. et al. Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin // *Immunity.* – 2002. – V. 16. – № 1. – P. 99–109.
92. Gold L., Rahman M., Blechman K. et al. Overview of the role for calreticulin in the enhancement of wound healing through multiple biological effects // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* – 2006. – V. 11. – № 1. – P. 57–65.
93. Goicoechea S., Pallero M., Eggleton P. et al. The anti-adhesive activity of thrombospondin is mediated by the N-terminal domain of cell surface calreticulin // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 40. – P. 37219–37228.
94. Asadzadeh Z., Safarzadeh E., Safaei S. et al. Current approaches for combination therapy of cancer: the role of immunogenic cell death // *Cancers.* – 2020. – V. 12. – № 4. – P. 1047.
95. Medina C., Ravichandran K. Do not let death do us part: ‘find-me’ signals in communication between dying cells and the phagocytes // *Cell Death Differ.* – 2016. – V. 23. – № 6. – P. 979–989.
96. Elliott M., Chekeni F., Trampont P. et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal for phagocytic clearance // *Nature.* – 2009. – V. 461. – № 7261. – P. 282–286.
97. Bours M., Swennen E., Di Virgilio F. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation // *Pharmacol. Ther.* – 2006. – V. 112. – № 2. – P. 358–404.
98. Trautmann A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger signal” // *Sci. Signal.* – 2009. – V. 2. – № 56. – P. e6.
99. Landsman D., Bustin M. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins // *Bioessays.* – 1993. – V. 15. – № 8. – P. 539–546.
100. Agresti A., Bianchi M. HMGB proteins and gene expression // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2003. – V. 13. – № 2. – P. 170–178.
101. Diener K., Al-Dasooqi N., Lousberg E. et al. The multifunctional alarmin HMGB1 with roles in the pathophysiology of sepsis and cancer // *Immunol. Cell Biol.* – 2013. – V. 91. – № 7. – P. 443–450.
102. He S., Cheng J., Feng X. et al. The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8. – № 38. – P. 64534–64550.

103. Venereau E., Casagrandi M., Schiraldi M. et al. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release // *J. Exp. Med.* – 2012. – V. 209. – № 9. – P. 1519–1528.
104. Deng M., Scott M., Fan J. et al. Location is the key to function: HMGB1 in sepsis and trauma-induced inflammation // *J. Leukoc. Biol.* – 2019. – V. 106. – № 1. – P. 161–169.
105. Wang H., Yang H., Tracey K. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis // *J. Intern. Med.* – 2004. – V. 255. – № 3. – P. 320–331.
106. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation: 6894 // *Nature*. – 2002. – V. 418. – № 6894. – P. 191–19.
107. Luo Y., Chihara Y., Fujimoto K. et al. High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy // *Eur. J. Cancer*. – 2013. – V. 49. – № 3. – P. 741–751.
108. Kang R., Chen R., Zhang Q. et al. HMGB1 in health and disease // *Mol. Aspects Med.* – 2014. – V. 40. – P. 1–116.
109. Vu M., Kassouf N., Ofili R. et al. Doxorubicin selectively induces apoptosis through the inhibition of a novel isoform of Bcl 2 in acute myeloid leukaemia MOLM 13 cells with reduced Beclin 1 expression // *Int. J. Oncol.* – 2020. – V. 57. – № 1. – P. 113–121.
110. Wu J., Liu T., Rios Z. et al. Heat shock proteins and cancer // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2017. – V. 38. – № 3. – P. 226–256.
111. Kampinga H., Hageman J., Vos M. et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins // *Cell Stress Chaperones*. – 2009. – V. 14. – № 1. – P. 105–111.
112. Hartl F. Molecular chaperones in cellular protein folding // *Nature*. – 1996. – V. 381. – № 6583. – P. 571–579.
113. Dix D. Hsp70 expression and function during gametogenesis // *Cell Stress Chaperones*. – 1997. – V. 2. – № 2. – P. 73–77.
114. Freeman B., Morimoto R. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hsp71 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding // *EMBO J.* – 1996. – V. 15. – № 12. – P. 2969–2979.
115. Wang T., Chang J., Wang C. Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 35. – P. 26049–26051.
116. Buchner J. Hsp90 & Co. – a holding for folding // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – V. 24. – № 4. – P. 136–141.

117. Binder R., Srivastava P. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8⁺ T cells // *Nat. Immunol.* – 2005. – V. 6. – № 6. – P. 593–599.
118. Pulendran B., Arunachalam P., O'Hagan D.T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2021. – V. 20. – № 6. – P. 454–475.
119. Dudek-Perić A., Ferreira G., Muchowicz A. et al. Antitumor immunity triggered by melphalan is potentiated by melanoma cell surface-associated calreticulin // *Cancer Res.* – 2015. – V. 75. – № 8. – P. 1603–1614.
120. Vacchelli E., Ma Y., Baracco E., Sistigu A. et al. Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1 // *Science.* – 2015. – V. 350. – № 6263. – P. 972–978.
121. Galluzzi L., Buqué A., Kepp O. et al. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents // *Cancer Cell.* – 2015. – V. 28. – № 6. – P. 690–714.
122. Twyman-Saint Victor C., Rech A., Maity A. et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer // *Nature.* – 2015. – V. 520. – № 7547. – P. 373–377.
123. Quail D., Joyce J. The microenvironmental landscape of brain tumors // *Cancer Cell.* – 2017. – V. 31. – № 3. – P. 326–341.
124. Ngwa W., Irabor O., Schoenfeld J. et al. Using immunotherapy to boost the abscopal effect // *Nat. Rev. Cancer.* – 2018. – V. 18. – № 5. – P. 313–322.
125. Demaria S., Kawashima N., Yang A. et al. Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – V. 11. – № 2. – P. 728–734.
126. Dewan M., Galloway A., Kawashima N. et al. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – V. 15. – № 17. – P. 5379–5388.
127. Weiss E., Meister S., Janko C. et al. High hydrostatic pressure treatment generates inactivated mammalian tumor cells with immunogenic features // *J. Immunotoxicol.* – 2010. – V. 7. – № 3. – P. 194–204.
128. Zamarin D., Holmgaard R., Subudhi S. et al. Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – V. 6. – № 226. – P. 226ra32.
129. Taggart D., Andreou T., Scott K. et al. Anti-PD-1/anti-CTLA-4 efficacy in melanoma brain metastases depends on extracranial disease and augmentation of CD8⁺ T cell trafficking // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2018. – V. 115. – № 7. – P. 1540–1549.

130. Wen C., Chen H., Chen S. et al. Specific microtubule-depolymerizing agents augment efficacy of dendritic cell-based cancer vaccines // *J. Biomed. Sci.* – 2011. – V. 18. – P. 44.
131. Senovilla L., Vitale I., Martins I. et al. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy // *Science*. – 2012. – V. 337. – № 6102. – P. 1678–1684.
132. Huang F., Lei J., Sun Y. et al. Induction of enhanced immunogenic cell death through ultrasound-controlled release of doxorubicin by liposome-microbubble complexes // *OncoImmunology*. – 2018. – V. 7. – № 7. – P. e1446720.
133. Zhu H., Shan Y., Ge K. et al. Oxaliplatin induces immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma cells and synergizes with immune checkpoint blockade therapy // *Cell Oncol.* – 2020. – V. 43. – № 6. – P. 1203–1214.
134. Sun L., Shen F., Tian L. et al. ATP-responsive smart hydrogel releasing immune adjuvant synchronized with repeated chemotherapy or radiotherapy to boost antitumor immunity // *Adv. Mater.* – 2021. – V. 33. – № 18. – P. e2007910.
135. Liu X., Jiang J., Chang C. et al. Development of facile and versatile platinum drug delivering silicasome nanocarriers for efficient pancreatic cancer chemo-immunotherapy // *Small*. – 2021. – V. 17. – № 14. – P. e2005993.
136. Xiang Y., Chen L., Li L. et al. Restoration and enhancement of immunogenic cell death of cisplatin by coadministration with digoxin and conjugation to HPMA copolymer // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2020. – V. 12. – № 1. – P. 1606–1616.
137. Tacar O., Sriamornsak P., Dass C. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2013. – V. 65. – № 2. – P. 157–170.
138. Pommier Y., Leo E., Zhang H. et al. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs // *Chem. Biol.* – 2010. – V. 17. – № 5. – P. 421–433.
139. Cvitkovic E. Ongoing and unsaid on oxaliplatin: the hope // *Br. J. Cancer*. – 1998. – V. 77. – № S4. – P. 8–11.
140. Botelho A., Pierezan F., Soto-Blanco B. et al. A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential // *Toxicon*. – 2019. – V. 158. – P. 63–68.
141. Forveille S., Zhou H., Sauvat A. et al. The oncolytic peptide LTX-315 triggers necrotic cell death // *Cell Cycle*. – 2015. – V. 14. – № 21. – P. 3506–3512.
142. Eike L., Yang N., Rekdal O. et al. The oncolytic peptide LTX-315 induces cell death and DAMP release by mitochondria distortion in human melanoma cells // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6. – № 33. – P. 34910–34923.
143. Zhou H., Forveille S., Sauvat A. et al. The oncolytic peptide LTX-315 triggers immunogenic cell death // *Cell Death Dis.* – 2016. – V. 7. – P. e2134.

144. Pasquereau-Kotula E., Habault J., Kroemer G. et al. The anticancer peptide RT53 induces immunogenic cell death // PLoS ONE. – 2018. – V. 13. – № 8. – P. e0201220.
145. Jagot-Lacoussiere L., Kotula E., Villoutreix B. et al. A cell-penetrating peptide targeting AAC-11 specifically induces cancer cells death // Cancer Res. – 2016. – V. 76. – № 18. – P. 5479–5490.
146. Duewell P., Steger A., Lohr H. et al. RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8⁺ T cells // Cell Death Differ. – 2014. – V. 21. – № 12. – P. 1825–1837.
147. Kelly E., Russell S. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering // Mol. Ther. – 2007. – V. 15. – № 4. – P. 651–659.
148. Wein L., Wu J., Kirn D. – Validation and analysis of a mathematical model of a replication-competent oncolytic virus for cancer treatment: implications for virus design and delivery // Cancer Res. – 2003. – V. 63. – № 6. – P. 1317–1324.
149. Breitbach C., Moon A., Burke J. et al. A phase 2, open-label, randomized study of Pexa-Vec (JX-594) administered by intratumoral injection in patients with unresectable primary hepatocellular carcinoma // Methods Mol. Biol. – 2015. – V. 1317. – P. 343–357.
150. Hepatocellular carcinoma study comparing vaccinia virus based immunotherapy plus sorafenib vs sorafenib alone (PHOCUS) // Clinicaltrials.ru. - 2020. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02562755> (дата обращения 17.03.2022).
151. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Юдина К.В. Онколитические вирусы: обзор // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2012. – Т. 1. – С. 8-15.
152. Guo Z., Liu Z., Bartlett D. Oncolytic immunotherapy: dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity // Front. Oncol. – 2014. – V. 4. – P. 74.
153. Prestwich R., Errington F., Diaz R. et al. The case of oncolytic viruses versus the immune system: waiting on the judgment of Solomon // Hum. Gene Ther. – 2009. – V. 20. – № 10. – P. 1119–1132.
154. Donnelly O., Errington-Mais F., Steele L. et al. Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma // Gene Ther. – 2013. – V. 20. – № 1. – P. 7–15.
155. Miyamoto S., Inoue H., Nakamura T. et al. Cocksackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma // Cancer Res. – 2012. – V. 72. – № 10. – P. 2609–2621.
156. Heinrich B., Klein J., Delic M. et al. Immunogenicity of oncolytic vaccinia viruses JX-GFP and TG6002 in a human melanoma *in vitro* model: studying immunogenic cell death, dendritic cell maturation and interaction with cytotoxic T lymphocytes // OTT. – 2017. – V. 10. – P. 2389–2401.

157. Ma J., Ramachandran M., Jin C. et al. Characterization of virus-mediated immunogenic cancer cell death and the consequences for oncolytic virus-based immunotherapy of cancer // *Cell Death Dis.* – 2020. – V. 11. – № 1. – P. 48.
158. Dai P., Wang W., Yang N. et al. Intratumoral delivery of inactivated modified vaccinia virus Ankara (iMVA) induces systemic antitumor immunity via STING and Batf3-dependent dendritic cells // *Sci. Immunol.* – 2017. – V. 2. – № 11. – P. eaal1713.
159. Heo J., Reid T., Ruo L. et al. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer // *Nat. Med.* 2013. – V. 19. – № 3. – P. 329–336.
160. Park B., Hwang T., Liu T. et al. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial // *Lancet Oncol.* – 2008. – V. 9. – № 6. – P. 533–542.
161. Koks C., Garg A., Ehrhardt M. et al. Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death // *Int. J. Cancer.* – 2015. – V. 136. – № 5. – P. E313–325.
162. Diaconu I., Cerullo V., Hirvinen M. et al. Immune response is an important aspect of the antitumor effect produced by a CD40L-encoding oncolytic adenovirus // *Cancer Res.* – 2012. – V. 72. – № 9. – P. 2327–2338.
163. Wong H., Lemoine N., Wang Y. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles // *Viruses.* – 2010. – V. 2. – № 1. – P. 78–106.
164. Тарасова М.В., Губанова Н.В., Разумов И.А. и др. Онколитические вирусы в терапии глиом: учеб. пособие // Новосибирск: РИЦ НГУ. – 2015. – 27 с.
165. Ahmed A., Thaci B., Alexiades N. et al. Neural stem cell-based cell carriers enhance therapeutic efficacy of an oncolytic adenovirus in an orthotopic mouse model of human glioblastoma // *Mol. Ther.* – 2011. – V. 19. – № 9. – P. 1714–1726.
166. Golden E., Demaria S., Schiff P. et al. An abscopal response to radiation and ipilimumab in a patient with metastatic non-small cell lung cancer // *Cancer Immunol. Res.* – 2013. – V. 1. – № 6. – P. 365–372.
167. Golden E., Frances D., Pellicciotta I. et al. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death // *Oncoimmunology.* – 2014. – V. 3. – P. e28518.
168. Russell J., Brown J. The irradiated tumor microenvironment: role of tumor-associated macrophages in vascular recovery // *Front. Physiol.* – 2013. – V. 4. – P. 157.
169. Adkins I., Sadilkova L., Hradilova N. et al. Severe, but not mild heat-shock treatment induces immunogenic cell death in cancer cells // *Oncoimmunology.* – 2017. – V. 6. – № 5. – P. e1311433.

170. Guo S., Jing Y., Burcus N. et al. Nano-pulse stimulation induces potent immune responses, eradicating local breast cancer while reducing distant metastases // *Int. J. Cancer*. – 2018. – V. 142. – № 3. – P. 629–640.
171. Semmler M., Bekeschus S., Schäfer M. et al. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment // *Cancers*. – 2020. – V. 12. – № 2. – P. 269.
172. Bernhardt T., Semmler M.L., Schäfer M. et al. Plasma medicine: applications of cold atmospheric pressure plasma in dermatology // *Oxid. Med. Cell Longev*. – 2019. – V. 2019. – P. 3873928.
173. Chatraie M., Torkaman G., Khani M. et al. *In vivo* study of non-invasive effects of non-thermal plasma in pressure ulcer treatment: 1 // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 5621.
174. Zirnheld J., Zucker S., DiSanto T. et al. Nonthermal plasma needle: development and targeting of melanoma cells // *IEEE Trans*. – 2010. – V. 38. – № 4. – P. 948–952.
175. Georgescu N., Lupu A. Tumoral and normal cells treatment with high-voltage pulsed cold atmospheric plasma jets // *IEEE Trans*. – 2010. – V. 38. – № 8. – P. 1949–1955.
176. Liedtke K., Bekeschus S., Kaeding A. et al. Non-thermal plasma-treated solution demonstrates antitumor activity against pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* // *Sci. Rep*. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 8319.
177. Chen Z., Lin L., Cheng X. et al. Treatment of gastric cancer cells with nonthermal atmospheric plasma generated in water // *Biointerphases*. – 2016. – V. 11. – № 3. – P. 031010.
178. Kumar N., Attri P., Choi E. et al. Influence of water vapour with non-thermal plasma jet on the apoptosis of SK-BR-3 breast cancer cells // *RSC Adv*. – 2015. – V. 5. – № 19. – P. 14670–14677.
179. Conway G., Casey A., Milosavljevic V. et al. Non-thermal atmospheric plasma induces ROS-independent cell death in U373MG glioma cells and augments the cytotoxicity of temozolomide: 4 // *Br. J. Cancer*. – 2016. – V. 114. – № 4. – P. 435–443.
180. Mirpour S., Piroozmand S., Soleimani N. et al. Utilizing the micron sized non-thermal atmospheric pressure plasma inside the animal body for the tumor treatment application: 1 // *Sci. Rep*. – 2016. – V. 6. – № 1. – P. 29048.
181. Vandamme M., Robert E., Lerondel S. et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma // *Int. J. Cancer*. – 2012. – V. 130. – № 9. – P. 2185–2194.
182. Brullé L., Vandamme M., Riès D., Martel E. et al. Effects of a non thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a MIA PaCa2-luc orthotopic pancreatic carcinoma model // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – № 12. – P. e52653.
183. Azzariti A., Iacobazzi R., Di Fonte R. et al. – Plasma-activated medium triggers cell death and the presentation of immune activating danger signals in melanoma and pancreatic cancer cells // *Sci. Rep*. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 4099.

184. Van Loenhout J., Flieswasser T., Freire Boullosa L. et al. Cold atmospheric plasma-treated PBS eliminates immunosuppressive pancreatic stellate cells and induces immunogenic cell death of pancreatic cancer cells // *Cancers*. – 2019. – V. 11. – № 10. – P. 1597.
185. Ogawa M., Tomita Y., Nakamura Y. et al. Immunogenic cancer cell death selectively induced by near infrared photoimmunotherapy initiates host tumor immunity // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. – № 6. – P. 10425–10436.
186. Fucikova J., Moserova I., Truxova I. et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells // *Int. J. Cancer*. – 2014. – V. 135. – № 5. – P. 1165–1177.
187. Turubanova V., Balalaeva I., Mishchenko T. et al. Immunogenic cell death induced by a new photodynamic therapy based on photosens and photodithazine // *J. Immunother. Cancer*. – 2019. – V. 7. – № 1. – P. 350.
188. Obeid M., Panaretakis T., Joza N. et al. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of γ -irradiation and UVC light-induced apoptosis // *Cell Death Differ.* – 2007. – V. 14. – № 10. – P. 1848–1850.
189. Chao M., Jaiswal S., Weissman-Tsukamoto R. et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47 // *Sci. Transl. Med.* – 2010. – V. 2. – № 63. – P. 63ra94.
190. Wang Y., Probin V., Zhou D. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury: mechanisms of induction and implication for therapy // *CCTR*. – 2006. – V. 2. – № 3. – P. 271–279.
191. Hershman D., Neugut A., Jacobson J. et al. Acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome following use of granulocyte colony-stimulating factors during breast cancer adjuvant chemotherapy // *JNCI*. 2007. – V. 99. – № 3. – P. 196–205.
192. Jardim D., Rodrigues C., Novis Y. et al. Oxaliplatin-related thrombocytopenia // *Ann. Oncol.* – 2012. – V. 23. – № 8. – P. 1937–1942.
193. Erdem G., Dogan M., Demirci N. et al. Oxaliplatin-induced acute thrombocytopenia // *J. Can. Res. Ther.* – 2016. – V. 12. – № 2. – P. 509.
194. Speth P., van Hoesel Q., Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin // *Clin. Pharmacokinet.* – 1988. – V. 15. – № 1. – P. 15–31.
195. Kurtin S. Myeloid toxicity of cancer treatment // *J. Adv. Pract. Oncol.* – 2012. – V. 3. – № 4. – P. 209–224.
196. Zhang P., Su D., Liand M. et al. Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis // *Mol. Immunol.* – 2008. – V. 45. – № 5. – P. 1470–1476.

197. Samanta D., Park Y., Ni X. et al. Chemotherapy induces enrichment of CD47 + /CD73 + /PDL1 + immune evasive triple-negative breast cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2018. – V. 115. – № 6. – P. 1239-1248.
198. Huang H., Jiang C., Shen S. et al. Nanoenabled reversal of IDO1-mediated immunosuppression synergizes with immunogenic chemotherapy for improved cancer therapy // *Nano Lett.* – 2019. – V. 19. – № 8. – P. 5356–5365.
199. Munn D. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism // *Science.* – 1998. – V. 281. – № 5380. – P. 1191–1193.
200. Beckermann K., Dudzinski S., Rathmell J. Dysfunctional T cell metabolism in the tumor microenvironment // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2017. – V. 35. – P. 7–14.
201. Васильева Е.Д., Каледин В.И., Николин В.П. и др. Ускоренное отторжение иммуногенной опухоли у мышей при ингибировании активности индоламин-2,3-диоксигеназы этилпируватом // *Сибирский онкологический журнал.* – 2012. – Т. 1. – № 49. – С. 41-44.
202. Chinak O., Shernyukov A., Ovcherenko S. et al. Structural and aggregation features of a human κ -casein fragment with antitumor and cell-penetrating properties // *Molecules.* – 2019. – V. 24. – № 16. – P. 2919.
203. Livak K., Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method // *Methods.* – 2001. – V. 25. – № 4. – P. 402–408.
204. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227. – № 5259. – P. 680–685.
205. Markov A., Sen'kova A., Salomatina O. et al. Trioxolone methyl, a novel cyano enone-bearing 18β H-glycyrrhetic acid derivative, ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice // *Molecules.* – 2020. – V. 25. – № 10. – P. 2406.
206. Некипелая В.В., Семенов Д.В., Потапенко М.О. и др. Лактаптин – белок человеческого молока, индуцирующий апоптоз клеток аденокарциномы MCF-7 // *Доклады Академии Наук.* – 2008. – Т. 419. – С. 268–271.
207. Zhang Y., Liu L., Jin L., Yi X. et al. Oxidative stress-induced calreticulin expression and translocation: new insights into the destruction of melanocytes // *J. Invest. Dermatol.* – 2014. – V. 134. – № 1. – P. 183–191.
208. Llewellyn D., Kendall J., Naureen S. et al. Induction of calreticulin expression in HeLa cells by depletion of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} store and inhibition of N-linked glycosylation // *Biochem. J.* – 1996. – V. 318. – № 2. – P. 555–560.
209. Dai L., Wang L., Liu H. et al. Knockdown of calreticulin increases intracellular Ca^{2+} concentration and promotes apoptosis of HSC-LX2 human hepatic stellate cells // *Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* – 2021. – V. 37. – № 6. – P. 501–506.

210. Di Conza G., Ho P. ER stress responses: an emerging modulator for innate immunity // *Cells*. – 2020. – V. 9. – № 3. – P. 695.
211. Wang S., He M., Li L. et al. Cell-in-cell death is not restricted by caspase-3 deficiency in MCF-7 cells // *J. Breast Cancer*. – 2016. – V. 19. – № 3. – P. 231–241.
212. Zappasodi R., Pupa S., Ghedini G. et al. Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death // *Cancer Res*. – 2010. – V. 70. – № 22. – P. 9062–9072.
213. Mambula S., Stevenson M., Ogawa K. et al. Mechanisms for HSP70 secretion: Crossing membranes without a leader // *Methods*. – 2007. – V. 43. – № 3. – P. 168–175.
214. Wohlfrohm F., Richter M., Otrin L. et al. Interplay between mitophagy and apoptosis defines a cell fate upon co-treatment of breast cancer cells with a recombinant fragment of human κ -casein and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand // *Front. Cell Dev. Biol*. – 2021. – V. 8. – P. 617762.
215. Pang X., Zhang Y., Wei H. et al. Expression and effects of high-mobility group box 1 in cervical cancer // *Int. J. Mol. Sci*. – 2014. – V. 15. – № 5. – P. 8699–8712.
216. Fan Y., Kuai R., Xu Y. et al. Immunogenic cell death amplified by co-localized adjuvant delivery for cancer immunotherapy // *Nano Lett*. – 2017. – V. 17. – № 12. – P. 7387–7393.
217. Sukkurwala A., Adjemian S., Senovilla L. et al. Screening of novel immunogenic cell death inducers within the NCI Mechanistic Diversity Set // *OncoImmunology*. – 2014. – V. 3. – № 4. – P. e28473.
218. Fadok V., Bratton D., Guthrie L. et al. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: Role of Proteases // *J. Immunol*. – 2001. – V. 166. – № 11. – P. 6847–6854.
219. Liu M., Wang X., Wang L. et al. Targeting the IDO1 pathway in cancer: from bench to bedside // *J. Hematol. Oncol*. – 2018. – V. 11. – № 1. – P. 100.
220. Yang R., Zhu S., Tonnessen T.I. Ethyl pyruvate is a novel anti-inflammatory agent to treat multiple inflammatory organ injuries // *J. Inflamm*. – 2016. – V. 13. – № 1. – P. 37.
221. Shou D., Wen L., Song Z. et al. Suppressive role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the microenvironment of breast cancer and targeted immunotherapies // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7. – № 39. – P. 64505–64511.
222. Yu J., Du W., Yan F. et al. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer // *J.I.* – 2013. – V. 190. – № 7. – P. 3783–3797.
223. Kochneva G., Babkina I., Lupan T. et al. Apoptin enhances the oncolytic activity of vaccinia virus // *Mol. Biol. (Mosk)*. – 2013. – V. 47. – № 5. – P. 842–852.

224. Noteborn M. Proteins selectively killing tumor cells // *Eur. J. Pharmacol.* – 2009. – V. 625. – № 1. – P. 165–173.
225. Rangsitratkul C., Lawson C., Bernier-Godon F. et al. Intravesical immunotherapy with a GM-CSF armed oncolytic vesicular stomatitis virus improves outcome in bladder cancer // *Mol. Ther. Oncolytics.* – 2022. – V. 24. – P. 507–521.
226. Veyer D., Carrara G., Maluquer de Motes C. et al. Vaccinia virus evasion of regulated cell death // *Immunol. Lett.* – 2017. – V. 186. – P. 68–80.
227. Karaji N., Sattentau Q. Efferocytosis of pathogen-infected cells // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 1863.
228. Shiratsuchi A., Kaido M., Takizawa N. et al. Phosphatidylserine-mediated phagocytosis of influenza A virus-infected cells by mouse peritoneal macrophages // *J. Virol.* – 2000. – V. 74. – № 19. – P. 9240–9244.
229. Nainu F., Shiratsuchi A., Nakanishi Y. Induction of apoptosis and subsequent phagocytosis of virus-infected cells as an antiviral mechanism // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 1220.
230. Koval O., Kochneva G., Tkachenko A. et al. Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells // *BioMed. Res. Int.* – 2017. – V. 2017. – P. 1–14.
231. Vesely M., Kershaw M., Schreiber R. et al. Natural innate and adaptive immunity to cancer // *Annu. Rev. Immunol.* – 2011. – V. 29. – № 1. – P. 235–271.
232. Malyavko A., Yan. D, Wang Q. et al. Cold atmospheric plasma cancer treatment, direct versus indirect approaches // *Mater. Adv.* – 2020. – V. 1. – № 6. – P. 1494–1505.
233. Yousfi M., Merbahi N., Pathak A. et al. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 2014. – V. 28. – № 2. – P. 123–135.
234. Iwasaki M., Inui H., Matsudaira Y. et al. Nonequilibrium atmospheric pressure plasma with ultrahigh electron density and high performance for glass surface cleaning // *Appl. Phys. Lett.* – 2008. – V. 92. – № 8. – P. 081503.
235. Colavita L., Ciprandi G., Salpietro A. et al. HMGB1: A pleiotropic activity // *Pediatr. Allergy Immunol.* – 2020. – V. 31. – № S26. – P. 63–65.
236. Vannier A., Wardwell B., Fomin V. et al. Serum HMGB1 associates with liver disease and predicts readmission and mortality in patients with alcohol use disorder // *Alcohol.* – 2021. – V. 95. – P. 37–43.
237. Zheng J., Li Y., Yan Y. et al. Increased serum calpain activity is associated with HMGB1 levels in systemic sclerosis // *Arthritis Res. Ther.* – 2020. – V. 22. – № 1. – P. 110.

238. Huo R., Liu H., Chen J. et al. Serum HMGB1 level is correlated with serum I-FABP level in neonatal patients with necrotizing enterocolitis // BMC Pediatr. – 2021. – V. 21. – № 1. – P. 355.
239. Ghweil A., Osman H., Hassan M. et al. Validity of serum amyloid A and HMGB1 as biomarkers for early diagnosis of gastric cancer // CMAR. – 2020. – V. 12. – P. 117–126.
240. Xu S., Höglund M., Håkansson L. et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) induces the production of cytokines *in vivo*: G-CSF Induces the Production of Cytokines // Br. J. Haematol. – 2000. – V. 108. – № 4. – P. 848–853.
241. Mehta H., Malandra M., Corey S. G-CSF and GM-CSF in neutropenia // J.I. – 2015. – V. 195. – № 4. – P. 1341–1349.
242. Kawakami M., Ohashi S., Kawa Y. et al. Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections // Blood. – 1990. – V. 76. – № 10. – P. 1962–1964.
243. Kawakami T., Ohashi S., Kawa Y. et al. Elevated serum granulocyte colony-stimulating factor levels in patients with active phase of sweet syndrome and patients with active behçet disease: implication in neutrophil apoptosis dysfunction // Arch. Dermatol. – 2004. – V. 140. – № 5. – P. 570–574.
244. Luzina I., Keegan A., Heller N. et al. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives” // J. Leukoc. Biol. – 2012. – V. 92. – № 4. – P. 753–764.
245. Woodward E., Prêl C., Nicholson S. et al. The anti-inflammatory effects of interleukin-4 are not mediated by suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS1) // Immunology. – 2010. – V. 131. – № 1. P. 118–127.
246. Tkachenko A., Troitskaya O., Semenov D. et al. Immunogenicity of recombinant analog of antitumor protein lactaptin // Mol. Biol. – 2017. – V. 51. – № 5. – P. 687–694.
247. Huang B., Sikorski R., Kirn D. et al. Synergistic anti-tumor effects between oncolytic vaccinia virus and paclitaxel are mediated by the IFN response and HMGB1 // Gene Ther. – 2011. – V. 18. – № 2. – P. 164–172.
248. Lorenzi S., Mattei F., Sistigu A. et al. Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8 α + dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming // J.I. – 2011. – V. 186. – № 9. – P. 5142–5150.
249. Schiavoni G., Mattei F., Gabriele L. Type I interferons as stimulators of DC-mediated cross-priming: impact on anti-tumor response // Front. Immunol. – 2013. – V. 4. – P. 483.
250. Lebon A., Tough D. Type I interferon as a stimulus for cross-priming // Cytokine Growth Factor Rev. – 2008. – V. 19. – № 1. – P. 33–40.
251. Dupuy A., Caron E. Integrin-dependent phagocytosis – spreading from microadhesion to new concepts // J. Cell Sci. – 2008. – V. 121. – № 11. – P. 1773–1783.

252. Takenaka E., Van Vo A., Yamashita-Kanemaru Y. et al. Selective DNAM-1 expression on small peritoneal macrophages contributes to CD4⁺ T cell costimulation // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 15180.
253. Ghosn E., Cassado A., Govoni G. et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets // *PNAS.* – 2010. – V. 107. – № 6. – P. 2568–2573.
254. Wang J., Zhang H., Yin X. et al. Anti-CD47 antibody synergizes with cisplatin against laryngeal cancer by enhancing phagocytic ability of macrophages // *Clin. Exp. Immunol.* – 2021. – V. 205. – № 3. – P. 333–342.
255. Wieczorek M., Abualrous E., Sticht J. et al. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 292
256. Chow A., Toomre D., Garrett W. et al. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane // *Nature.* – 2002. – V. 418. – № 6901. – P. 988–994.
257. Kleinpeter P., Remy-Ziller C., Winter E. et al. By binding CD80 and CD86, the vaccinia virus M2 protein blocks their interactions with both CD28 and CTLA4 and potentiates CD80 binding to PD-L1 // *J. Virol* – 2019. – V. 93. – № 11. – P. 207-2a19.
258. Engelmayer J., Larsson M., Subklewe M. et al. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion // *J. Immunol.* – 1999. – V. 163. – № 12. – P. 6762–6768.