МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Южалин Арсений Евгеньевич

Молекулярные и иммунологические механизмы модулирующего действия опухолевого микроокружения на прогрессию злокачественных новообразований

Специальность 3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена в Научном центре трансляционной медицины Научно-технологическом университете «Сириус»

Официальные оппоненты:

Купраш Дмитрий Владимирович
доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук

Имянитов Евгений Наумович
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий научным отделом биологии опухолевого роста Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н.Петрова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Линге Ирина Андреевна
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией иммуногенетики Центрального научно-исследовательского института туберкулеза

Защита диссертации состоится 25 декабря 2026 г. в 12 ч 00 мин на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: https://dissovet.msu.ru/dissertation/4136
Автореферат разослан «____» октября 2026 г.,

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук — Киселевский Д.Б.



I.ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования (ЗНО) являются значимой медицинской проблемой. Заболеваемость ЗНО растет из-за старения населения и совершенствования методов ранней диагностики. В 2022 г. в мире было диагностировано 19 964 811 случаев ЗНО, включая 2 480 301 случай рака легкого (РЛ, 1 место), 2 308 897 случаев рака молочной железы (РМЖ, 2 место) и 1 926 118 случаев колоректального рака (КРР, 3 место). Многие нозологии остаются трудно поддающимися лечению. Метастазы являются серьезным осложнением ЗНО и основной причиной летального исхода у большинства больных. Поскольку возможности лечения ограничены, необходимы дополнительные исследования фундаментальных основ прогрессирования ЗНО для разработки новых видов терапии.

Степень разработанности темы исследования

ЗНО остаются значимой причиной смертности населения, несмотря на разработку инновационных терапевтических подходов, например, ингибиторов иммунных контрольных точек (ИИКТ). Опухолевое микроокружение признается одним из основных факторов, ограничивающих эффективность многих стратегий лечения ЗНО. Микроокружение солидной опухоли состоит из множества структурных и функциональных компонентов. Среди них иммунные клетки, фибробласты, кровеносные сосуды, внеклеточный матрикс (ВКМ), а также различные сигнальные молекулы. Взаимодействие злокачественных клеток с остальными элементами формирует динамичную среду, которая вносит определяющий вклад в прогрессирование заболевания. Клетки микроокружения нередко поддерживают опухолевый рост на всех стадиях канцерогенеза.

Микроокружение опухоли рассматривается как структурно и функционально неоднородная часть солидных опухолей. Расшифровка клеточных и молекулярных взаимодействий этой системе имеет ключевое значение для диагностики и терапии. Изучение стромы, тканевого остова, поддерживающего опухолевый рост, позволяет понять, каким образом опухолевое микроокружение нарушает физиологическое равновесие тканей, регулирует инициацию, рост, инвазию и метастазирование ЗНО.

Цель исследования – раскрыть молекулярные и иммунологические аспекты влияния опухолевого микроокружения на рост и развитие первичных и метастатических опухолей.

Задачи исследования

1. Изучить состав ВКМ опухоли КРР и его ремоделирование под влиянием лучевой терапии; определить вклад фибробластов и раковых клеток в отложение

ВКМ и активацию онкогенных сигналов; выявить ключевые гены ВКМ, определяющие неблагоприятный прогноз при ЗНО.

2. Исследовать роль ключевых популяций иммунных клеток (макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток и Т-клеток) в развитии и прогрессии КРР и других ЗНО, а также в формировании противоопухолевого иммунного ответа.

3. Оценить состав опухолевого микробиома при РЛ с учетом статуса курения.

Научная новизна исследования

Впервые показано, что радиотерапия солидных ЗНО приводит к значимому ремоделированию структурных компонентов ВКМ. Кроме того, радиотерапия усиливает инфильтрацию опухоли макрофагами, которые приобретают иммуносупрессивный фенотип. При этом таргетирование макрофагов нейтрализующими антителами подавляет иммуносупрессию, активирует Т-клеточный ответ и способствует замедлению опухолевого роста.

Впервые установлено, что стресс, вызванный химиотерапией, изменяет молекулярный фенотип как опухолевых клеток, так и фибробластов стромы, активируя сигнальные пути, ассоциированные с формированием химиорезистентности. При этом терапевтическое нацеливание на отдельные такие пути (например, YAP1 в раковых клетках и COX-2 в опухоль-ассоциированных фибробластах) повышает чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии.

Выявлено, что злокачественные клетки синтезируют компоненты ВКМ ламинина-511 (α5, β1 и γ1). Эти белки окружают микрососудистое русло опухоли, что указывает на их роль в развитии ангиогенеза. Высокий уровень ламинина-511 и LAMA5 обусловлен влиянием опухоль-инфильтрирующих миелоидных клеток, которые секретируют ряд цитокинов, включая TNF, который индуцирует повышение экспрессии LAMA5 в раковых клетках. Кроме того, нокдаун гена LAMA5 в экспериментальной модели метастатического КРР достоверно снижает количество опухолевых очагов. Эти результаты согласуются с независимыми исследованиями.

Продемонстрировано, что высокая экспрессия определенных комбинаций генов ВКМ (сигнатур) ассоциирована с неблагоприятным прогнозом онкобольных с различными нозологиями, что хорошо согласуется с независимыми исследованиями.

Выявлено, что макрофаги усиливают пролиферацию, миграцию, инвазию опухоли посредством индукции онкогенных молекулярных путей в злокачественных клетках (например, ERK1/2).

Впервые доказано, что дендритные клетки повышают экспрессию CD40, CD86 и HLA-DR в ответ на воздействие витамина Е. Использование витамина Е

в качестве адъюванта для химио- и иммунотерапии первичных опухолей замедляет опухолевый рост *in vivo*. Пациенты с меланомой, принимавшие витамин Е во время лечения ИИКТ, демонстрируют благоприятный прогноз.

Впервые показано, что метастатические клетки «обучают» астроциты мозга, которые усиливают продукцию белка emilin-1, который депонируется в непосредственной близости от опухолевых клеток и индуцирует в них повышение уровня белка CDK5. В свою очередь CDK5 понижает уровни MHC-I на мембране раковых клеток, через фосфорилирование Irf2bp1 и подавление транскрипционных факторов STAT1 и NLRC5. Это в свою очередь ингибирует CD8+ Т-клеточный иммунный ответ и способствует росту метастазов.

Установлено, что состав микробиома опухолевого микроокружения при РЛ достоверно отличается от такового у здоровых субъектов, что согласуется с независимыми исследованиями.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Определен качественный и количественный состав ВКМ печеночных метастазов КРР, а также оценено влияние радиотерапии на состав ВКМ опухоли;

Сформированы сигнатуры генов ВКМ, определяющие неблагоприятный прогноз в широком ряде опухолевых нозологий;

Выявлена потенциальная терапевтическая польза экспериментальных агентов, для лечения первичных и метастатических ЗНО, как в комбинации с существующими методами лечения, так и в виде монотерапии (росковитин, витамин Е, целекоксиб, протопорфирин IX, блокирующие антитела GalF2 и αM-CSF);

Обнаружено иммуностимулирующее влияние витамина Е, усиливающее эффект ИИКТ для пациентов с меланомой;

Открыт новый молекулярный механизм, связывающий CDK5 с регуляцией противоопухолевого иммунного ответа в церебральных метастазах;

Сформированы микробиомные сигнатуры нижних дыхательных путей в норме и при РЛ, в зависимости от статуса курения.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием комплекса современных методов. Эксперименты *in vitro* проводили на опухолевых клеточных линиях человека и мыши, а также на первичных культурах астроцитов, иммунных клеток и фибробластов. Исследования *in vivo* выполнены на сингенных и ксеногенных мышиных моделях с инъекцией опухолевых клеток в различные органы; рост опухоли контролировали методами прижизненной визуализации и последующим морфометрическим анализом. Для изучения состава ВКМ метастазов применяли метод децеллюляризации с последующей масс-спектрометрией белков и фосфопротеомным анализом. Широко использовали

стандартные молекулярно-биологические методы: иммуноблоттинг, ОТ-ПЦР, проточную цитометрию, иммуногистохимию и конфокальную микроскопию. Применены омиксные технологии. Проведен ретроспективный анализ клинических данных и изучение клинических образцов тканей пациентов. Биоинформатическая обработка данных выполнена с использованием общедоступных баз и статистических пакетов в среде R. Все эксперименты на животных одобрены этическими комитетами, результаты статистически обработаны и воспроизведены в независимых опытах.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Лучевая терапия солидных ЗНО приводит к значимому ремоделированию структурных компонентов ВКМ в опухоли, в том числе к значимому увеличению уровня многих белков, включая Cola2, Fbn1 и Bgn;
2. Стресс, вызванный химиотерапией, изменяет молекулярный фенотип как опухолевых клеток, так и фибробластов местного микроокружения ЗНО, активируя сигнальные пути, ассоциированные с формированием химиорезистентности. Терапевтическое таргетирование отдельных таких путей (YAP1 в раковых клетках и COX-2 в опухоль-ассоциированных фибробластах) повышает чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии;
3. Раковые клетки активно продуцируют структурные белки ВКМ, особенно компоненты ламинина-511 (α5, β1 и γ1). Эти белки окружают микрососудистое русло опухоли, что указывает на их роль в развитии ангиогенеза. Высокий уровень ламинина-511 в целом и LAMA5 в частности в опухолевом микроокружении связан с влиянием миелоидных клеток, инфильтрирующих опухоль. Эти CD11b+ клетки секретируют ряд цитокинов, главным образом TNF, который индуцирует повышение экспрессии LAMA5 в раковых клетках. Нокдаун гена LAMA5 в экспериментальной модели метастатического КРР достоверно снижает количество опухолевых очагов;
4. Высокая экспрессия определенных комбинаций генов ВКМ (сигнатур) напрямую влияет на прогноз онкобольных с различными нозологиями;
5. Опухоль-ассоциированные макрофаги усиливают пролиферацию, миграцию, инвазию опухоли посредством индукции онкогенного молекулярного пути ERK1/2 в злокачественных клетках;
6. Лучевая терапия усиливает инфильтрацию опухоли макрофагами, которые приобретают иммуносупрессивный фенотип. Таргетирование макрофагов антителами αM-CSF подавляет иммуносупрессию, активирует Т-клеточный ответ и способствует подавлению опухолевого роста;
7. Дендритные клетки могут быть активированы витамином Е для усиленной презентации антигена за счет повышенной экспрессии CD40, CD86 и HLA-DR. Использование витамина Е в качестве адъюванта для химиотерапии и

иммунотерапии первичных солидных ЗНО достоверно замедляет опухолевый рост *in vivo* в сравнении с контролем. Пациенты с меланомой, принимавшие витамин Е во время лечения ИИКТ, демонстрируют благоприятный прогноз;

8. Злокачественные клетки церебральных метастазов секретируют факторы, «обучающие» астроциты головного мозга. В ответ такие астроциты усиливают продукцию белка emilin-1, который депонируется в непосредственной близости от опухолевых клеток и индуцирует в них повышение уровня белка CDK5. В свою очередь CDK5 понижает уровни MHC-I на мембране раковых клеток, через фосфорилирование Irf2bp1 и подавление транскрипционных факторов STAT1 и NLRC5. Это в свою очередь ингибирует CD8+ Т-клеточный иммунный ответ и способствует росту метастазов;

9. Качественный и количественный состав микробиома опухолевого микроокружения при РЛ достоверно отличается от такового у здоровых субъектов в зависимости от статуса курения.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается использованием достаточного объема экспериментального материала, разнообразием проведенных лабораторных исследований, многократным повторением экспериментов *in vitro* и *in vivo*, а также применением современных методов анализа и статистической обработки данных.

Апробация результатов исследования

Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на более чем 12 ведущих международных и всероссийских научных мероприятиях. По теме диссертации опубликованы 22 работы, из них 21 статья - в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Личный вклад автора в исследование

Оптимизация протоколов децеллюляризации тканей, биохимического обогащения, проведение масс-спектрометрических исследований образцов, и последующий анализ, проводились в сотрудничестве с профессором Benedikt Kessler, Rebecca Konietzny, Roman Fischer (Target Discovery Institute, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford). Личный вклад автора заключался в постановке животных моделей ЗНО, пробоподготовке (децеллюляризация, биохимическое обогащение), анализе протеомных данных, написанию и редактированию рукописи (см. статьи №4, №20).

Исследования терапевтического нацеливания на сигнальные пути активированных фибробластов при ЗНО проводились в сотрудничестве с Онкологическим Центром им. М.Д. Андерсона под руководством профессора

Dihua Yu и сотрудниками ее группы. Личный вклад автора заключался в разработке дизайна исследования, проведению *in vitro* и *in vivo* экспериментов, анализу данных, обсуждению результатов, написанию и редактированию рукописи (см. статью №7).

Биоинформатические исследования роли генов ВКМ в патогенезе ЗНО проводились в сотрудничестве с Alex Gordon-Weeks (Nuffield Department of Surgical Sciences, University of Oxford, John Radcliffe Hospital). Личный вклад автора заключался в поиске релевантных наборов данных, анализе распакованных биоинформатических данных, построении таблиц и графиков, написании и редактированию рукописи (см. статью №8).

Работы по исследованию влияния витамина Е на активацию дендритных клеток в опухолевом микроокружении выполнены в сотрудничестве с профессором Dihua Yu и сотрудниками ее группы. Личный вклад автора заключался в проведении *in vitro* и *in vivo* экспериментов, ретроспективном анализе данных пациентов, обсуждении результатов и редактировании рукописи (см. статью №10).

Исследования, посвященные изучению роли макрофагов и нейтрофилов в опухолевом микроокружении проводились в сотрудничестве с Оксфордским университетом под руководством профессора Ruth Muschel и сотрудников ее лаборатории. Личный вклад автора заключался в проведении *in vitro* и *in vivo* экспериментов, обсуждении результатов и редактировании рукописи (см. статьи №1, №2, №9)

Все исследования, выполненные в разделе 4.5 выполнены автором лично в Онкологическом Центре им. М.Д. Андерсона. Секвенирование РНК проводилось в сотрудничестве с Zhongming Zhao и Huihui Fan (The UTHealth Houston Cancer Genomics Center). Протеомное исследование фосфорилированных пептидов проводилось в сотрудничестве с профессором Sheng Pan и Li Li (The UTHealth Proteomics Core Laboratory) (см. статьи №13, №15, №16).

Популяционное исследование микробиоты мокроты больных с раком легкого (РЛ) и здоровых субъектов (раздел 5.1) проводилось в сотрудничестве с Кемеровским Государственным Университетом под руководством профессора В.Г. Дружинина и сотрудников его лаборатории. Личный вклад автора заключался в написании грантовой заявки, планировании исследования, первичной обработке результатов, анализу данных, подготовке рисунков и написании рукописи (см. статьи №14, №17, №21).

Все остальные исследования проводились автором лично.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 214 страницах машинописного текста и состоит из оглавления, введения, 5 глав (аналитического обзора

литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, а также списка литературы, включающего 363 источника. Работа содержит 12 таблиц и 115 рисунков.

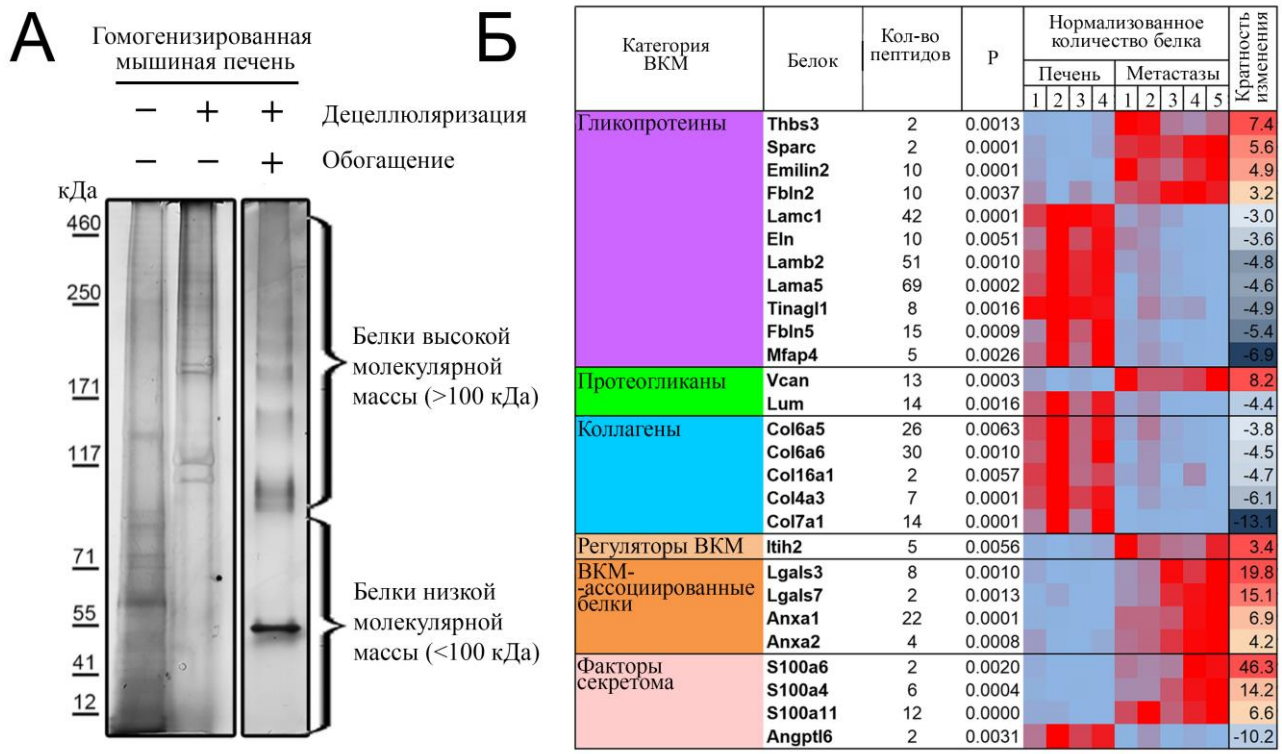
II.ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Анализ ВКМ солидных опухолей: ремоделирование, терапевтические мишени и прогностические маркеры

Первой задачей диссертационного исследования было изучение состава ВКМ опухоли и его ремоделирование под влиянием лучевой терапии, определение вклада фибробластов и раковых клеток в отложение ВКМ и активацию онкогенных сигналов, а также поиск ключевых генов ВКМ, определяющих неблагоприятный прогноз при ЗНО.

На первом этапе проводили разработку и применение методики обогащения опухолевого ВКМ для протеомного анализа. Для детального исследования ВКМ в патогенезе ЗНО была выбрана модель печеночных метастазов КРР, характеризующихся выраженной фиброзной капсулой и наличием десмопластической стромы. На основе предложенного протокола была разработана и оптимизирована методика выделения белков ВКМ высокой степени очистки, включающая этапы децеллюляризации ткани, обработки ультразвуком и нуклеазами, биохимического фракционирования и масс-спектрометрического анализа.

Применение данного подхода позволило эффективно удалить клеточные компоненты и значительно обогатить фракцию высокомолекулярных белков ВКМ (Рис. 1А).



Категория ВКМ	Белок	Кол-во пептидов	P	Нормализованное количество белка: Печень 1	Печень 2	Печень 3	Печень 4	Метастазы 1	Метастазы 2	Метастазы 3	Метастазы 4	Метастазы 5	Кратность изменения
Гликопротеины	Thbs3	2	0.0013										7.4
	Sparc	2	0.0001										5.6
	Emilin2	10	0.0001										4.9
	Fbln2	10	0.0037										3.2
	Lamc1	42	0.0001										-3.0
	Eln	10	0.0051										-3.6
	Lamb2	51	0.0010										-4.8
	Lama5	69	0.0002										-4.6
	Tinagl1	8	0.0016										-4.9
	Fbln5	15	0.0009										-5.4
	Mfap4	5	0.0026										-6.9
Протеогликаны	Vcan	13	0.0003										8.2
	Lum	14	0.0016										-4.4
Коллагены	Col6a5	26	0.0063										-3.8
	Col6a6	30	0.0010										-4.5
	Col16a1	2	0.0057										-4.7
	Col4a3	7	0.0001										-6.1
	Col7a1	14	0.0001										-13.1
Регуляторы ВКМ	Itih2	5	0.0056										3.4
ВКМ--ассоциированные белки	Lgals3	8	0.0010										19.8
	Lgals7	2	0.0013										15.1
	Anxa1	22	0.0001										6.9
	Anxa2	4	0.0008										4.2
Факторы секретома	S100a6	2	0.0020										46.3
	S100a4	6	0.0004										14.2
	S100a11	12	0.0000										6.6
	Angptl6	2	0.0031										-10.2

Рисунок 1 – Пробоподготовка и протеомный анализ: А – общий белок был выделен из мышиной интактной печени (слева), децеллюляризированной печени (в центре) и децеллюляризированной печени с последующим биохимическим обогащением (справа). Образцы разделяли с помощью электрофореза в трис-ацетатном градиентном (3-8%) геле (кат. TA03810BOX, Thermo) который позволяет разделять образцы в диапазоне от 30 до 500 кДа, с последующим окрашиванием нитратом серебра. Области с высокой и низкой молекулярной массой учитывались как >100 кДа и <100 кДа, соответственно; Б – тепловая карта, отображающая 27 белков ВКМ, содержание которых достоверно различалось между интактной печенью мыши и печенью с метастазами MC38

Сравнительный протеомный анализ ВКМ нормальной печени и печеночных метастазов мышиной линии КРР MC38 выявил статистически достоверные различия в их составе. Были идентифицированы белки ВКМ, значимо повышенные в метастазах, включая гликопротеины Thbs3, Sparc, Emilin2, протеогликан Vcan, а также ассоциированные с ВКМ белки Lgals3, Lgals7, Anxa1, Anxa2. Уровень секретируемого фактора S100a6 в опухолевой ткани повышался в 46 раз (Рис. 1Б).

На втором этапе исследования анализировали влияние лучевой терапии на ремоделирование ВКМ. На модели подкожного КРР линии MC38 изучено воздействие однократного локального облучения (10 Гр) на состав опухолевого ВКМ. Протеомный анализ выявил достоверное повышение уровня 12 белков ВКМ в облученных опухолях, в том числе коллагенов Col4a1, Col4a2, Col12a1 и гликопротеинов Fbn1, Tgfbi, Postn, Tnc (Рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что радиотерапия модулирует опухолевую строму за счет активации опухоль-ассоциированных фибробластов.

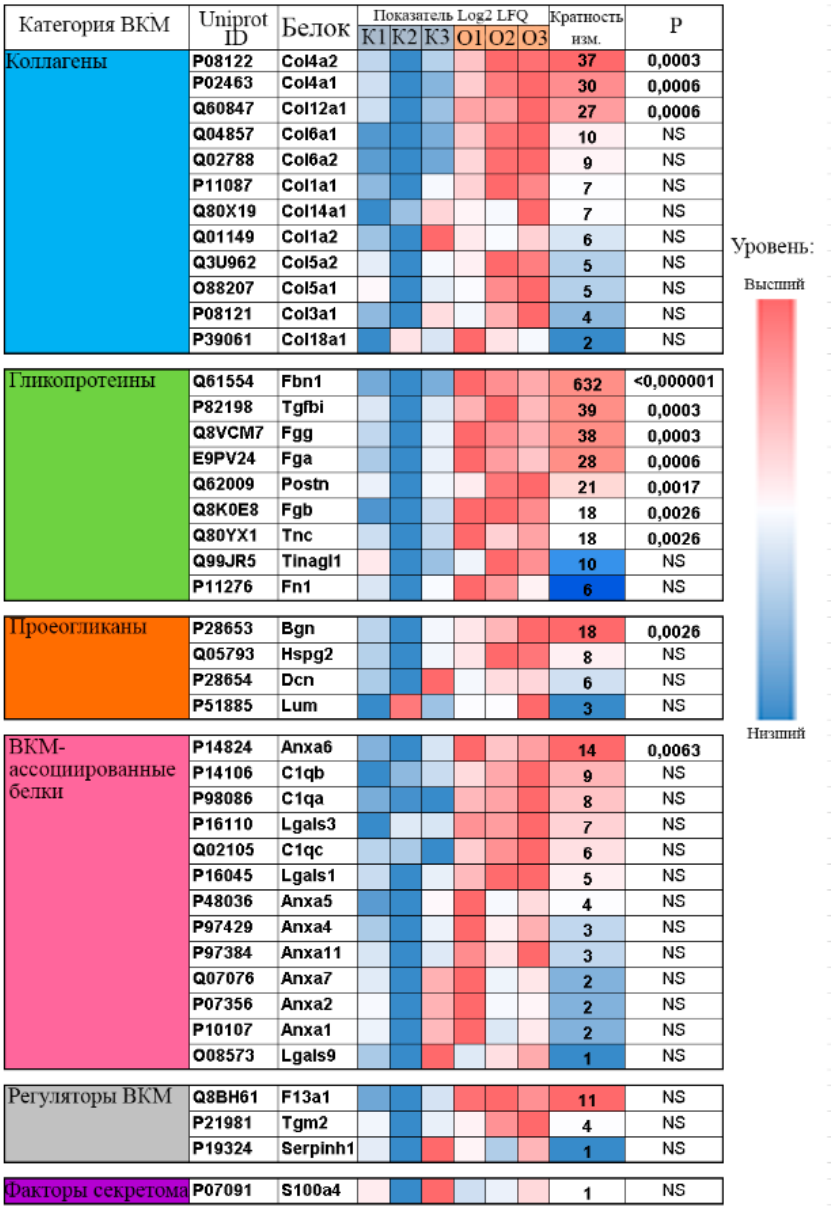


Рисунок 2 – Количественный анализ белков по результатам протеомного анализа обогащенной фракции ВКМ из опухолей контрольных (К1, К2, К3) и мышей, облученных в дозе 10 Гр (О1, О2, О3)

Поскольку ключевым звеном депонирования и ремоделирования ВКМ в солидных опухолях выступают опухоль-ассоциированные фибробласты, на следующем этапе была предпринята попытка таргетировать молекулярные пути, активируемые в этих стромальных клетках. На модели ПАПЖ были исследованы механизмы формирования химиорезистентности, ассоциированные с действием фибробластов. Показано, что обработка клеток ПАПЖ химиопрепаратом гемцитабином активирует в них стресс-зависимый сигнальный путь YAP, что сопровождается транслокацией ключевого фактора YAP1 в ядро (Рис. 3).

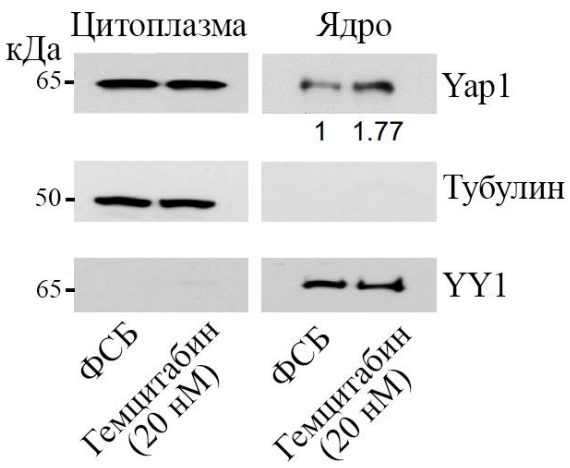


Рисунок 3 – Иммуноблот-анализ содержания белка Yap1 в цитоплазматической и ядерной фракциях, а также тубулина (маркер цитоплазматических белков) и YY1 (маркер ядерных белков) в клетках KPC, культивируемых в 3D и обработанных гемцитабином (20 нМ) или фосфатно-солевым буфером (ФСБ) в течение 1 часа

Кроме того, фибробласты, обработанные кондиционированной средой от злокачественных клеток в условиях стресса, повышали уровни ряда белков, включая циклооксигеназу-2 (COX-2) (Рис. 4А).

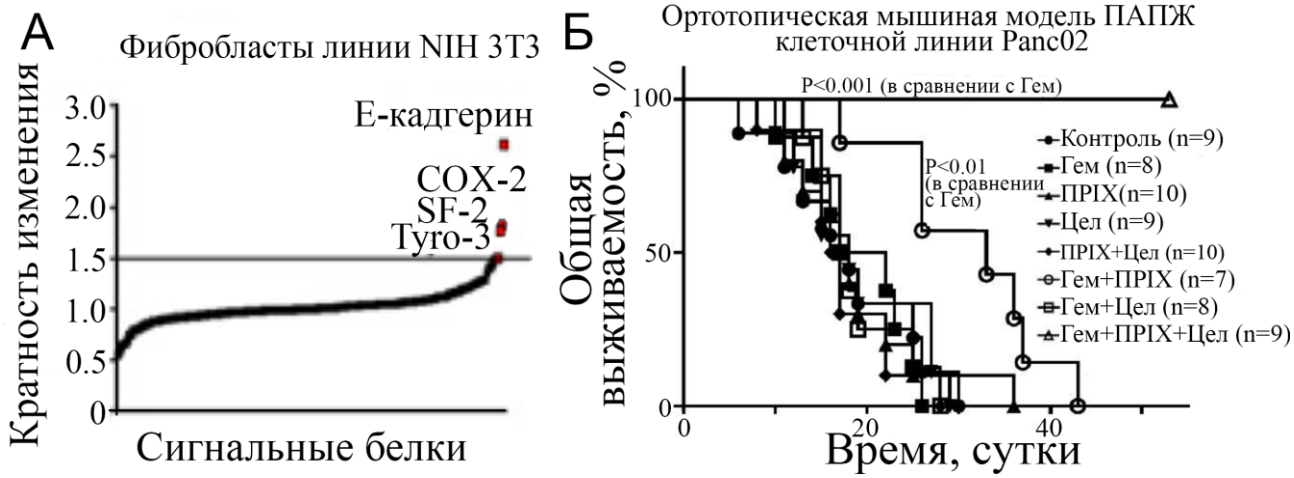


Рисунок 4 – Анализ фибробластов и *in vivo* эксперимент: А – анализ методом обратного фазового протеинового массива (RPPA) фибробластов линии NIH 3T3, обработанных кондиционированной средой от клеток ПАПЖ Panc02, выращенных в среде с 10% или 0% фетальной бычьей сывороткой. По оси Y представлена кратность изменения белков группы 0% в сравнении с группой 10%. Выделены белки с кратностью изменения выше 1,5; Б – анализ выживаемости по Каплану-Майеру для мышей с ортотопической моделью ПАПЖ поздней стадии (клеточная линия Panc02), получавших указанное экспериментальное лечение. Для сравнения кривых использован Log-Rank test

Для преодоления резистентности была разработана стратегия двойного ингибирования: YAP1 (протопорфирином IX, ПРIX) в опухолевых клетках и COX-2 (целекоксибом, Цел) в фибробластах. Целекоксиб - селективный

ингибитор COX-2, подавляющий синтез простагландинов и уменьшающий воспаление. PPIX – фотосенсибилизатор, который при воздействии света генерирует синглетный кислород и другие его активные формы, которые активируют киназы Hippo-пути (MST1/2, LATS1/2), которые фосфорилируют YAP1 по остатку Ser127, и тем самым задерживают его в цитоплазме и снижают его транскрипционную активность (Amanda и др., 2024; Liu-Chittenden и др., 2012). В ортотопической модели ПАПЖ комбинация гемцитабина с PPIX и Цел привела к 100% выживаемости мышей в течение 60 суток, в то время как монотерапии показали ограниченную эффективность (Рис. 4Б).

Анализ методом секвенирования РНК единичных клеток показал, что комбинированное лечение снижает количество опухоль-ассоциированных фибробластов (Рис. 5А) и иммуносупрессивных регуляторных Т-клеток, одновременно способствуя инфильтрации эффекторных лимфоцитов (Рис. 5Б, В), что трансформирует микроокружение опухоли в пользу эффективного ответа на терапию.

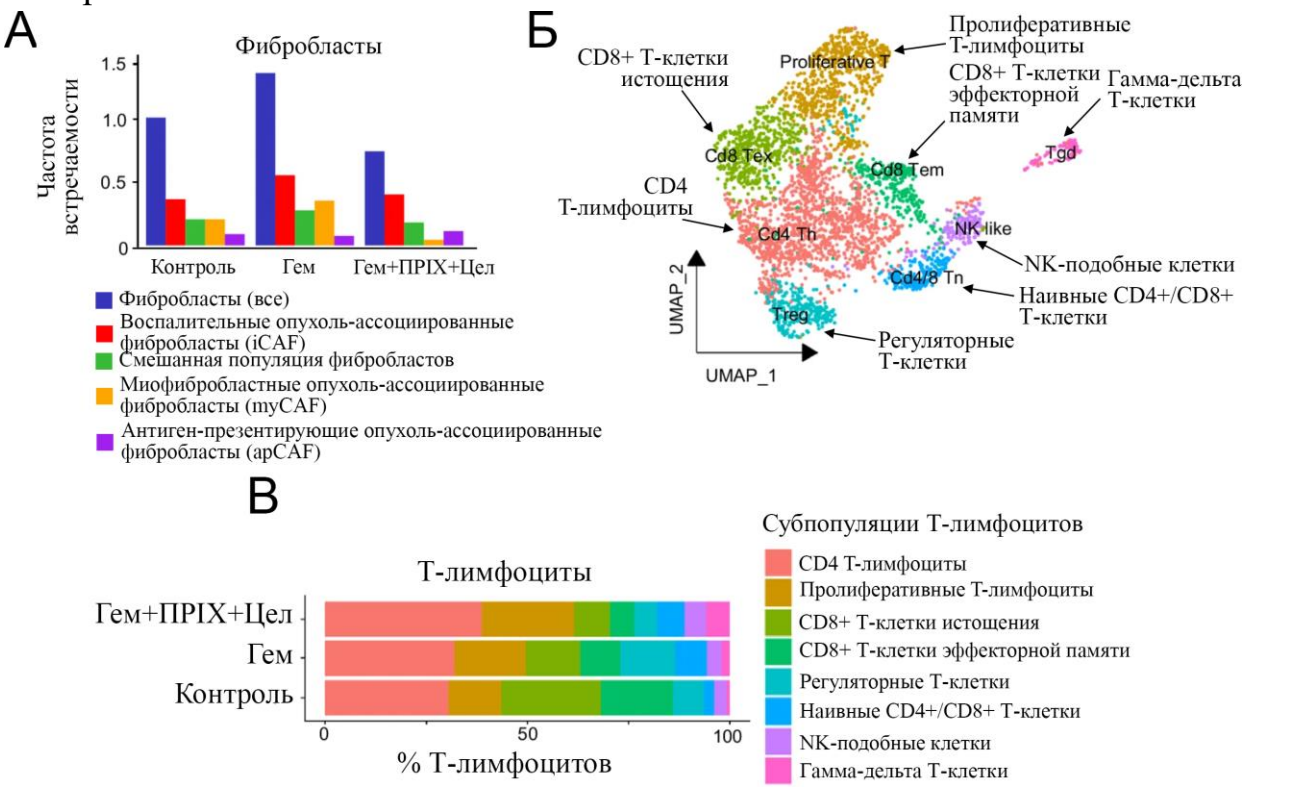


Рисунок 5 – Секвенирование РНК единичных клеток: А – распределение фибробластов и их субпопуляций в опухолях KPC после указанных вариантов лечения; Б – визуализация в UMAP-координатах 2695 Т-лимфоцитов, выделенных из опухолей ПАПЖ линии KPC, получавших лечение контролем, гемцитабином (Гем) и комбинацией Гем + PPIX + Цел. Цветовое кодирование соответствует субпопуляциям Т-лимфоцитов; В – доля отдельных субпопуляций Т-клеток в опухолевых образцах KPC при указанных вариантах лечения

Помимо опухоль-ассоциированных фибробластов, ВКМ также может быть депонирован и злокачественными клетками. На следующем этапе исследования

была проведена оценка вклада самих злокачественных клеток в отложение белков ВКМ в микроокружение. Была изучена способность опухолевых клеток синтезировать компоненты ВКМ в модели ксенографтов печеночных метастазов КРР. Показано, что клетки КРР активно экспрессируют цепи ламинина (α5, β1, γ1), формирующие ламинин-511, в то время как синтез коллагенов для них не характерен (Рис. 6А).

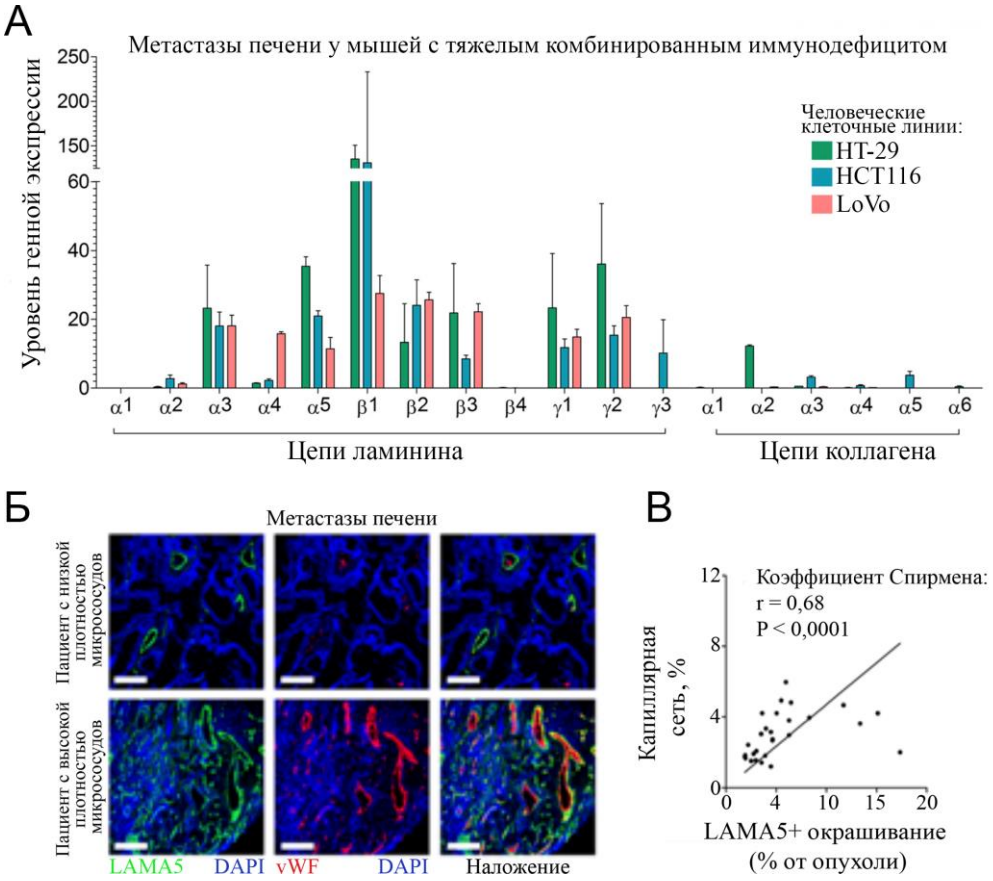


Рисунок 6 – Анализ цепей ламинина: А – профиль экспрессии мРНК генов цепей ламинина и коллагена IV типа в РНК, выделенной из ортотопических печеночных метастазов указанных линий; Б – иммунофлуоресцентное окрашивание метастазов пациентов с низкой и высокой плотностью микрососудов на LAMA5 и фактор Виллебранда. Шкала: 100 мкм; В – анализ корреляции между площадью окрашивания LAMA5 (ось X) и плотностью микрососудов (ось Y), определенной путем измерения процента площади опухоли, положительной по окрашиванию на фактор Виллебранда. N=30 пациентов

Иммуногистохимический анализ выявил ко-локализацию цепи ламинина-α5 (LAMA5), с микрососудистым руслом в метастазах КРР онкологических больных (Рис. 6Б). Плотность окрашивания LAMA5 положительно коррелировала с плотностью сосудов, окрашенных по фактору Виллебранда, что предполагает возможную роль LAMA5 в ангиогенезе (Рис. 6В).

Экспериментально установлено, что индукция экспрессии LAMA5 в клетках КРР опосредована фактором некроза опухоли (TNF) (Рис. 7А).

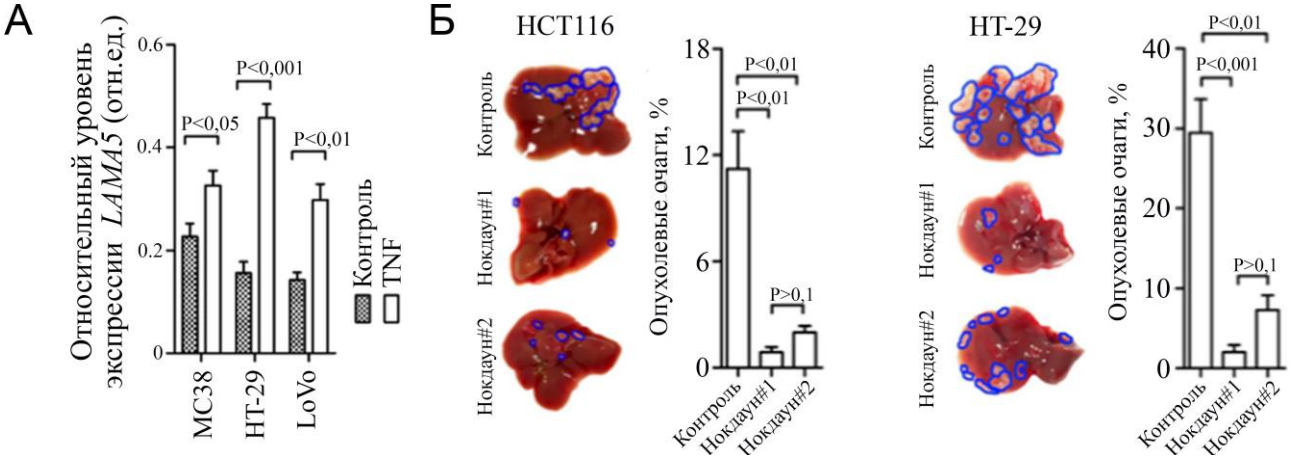


Рисунок 7 – Эффект нокдауна LAMA5 на опухолевый рост: А – экспрессия гена *LAMA5* в культивируемых мышиных и человеческих клетках КРР, через 24 часа после стимуляции фосфатно-солевым буфером (серый) или 100 нг/мл TNF (белый). N=3 биологических повтора; Б – количественная оценка опухолевых очагов в мышиных моделях метастазов клеточных линий HCT116 и HT-29 с нокдауном гена *LAMA5* или контрольных клеток.

Нокдаун гена *LAMA5* в клетках КРР приводил к значительному уменьшению объема печеночных метастазов *in vivo*, что подтверждает важную функциональную роль этого белка в прогрессировании заболевания (Рис. 7Б). Полученные результаты согласуются с данными литературы. Было показано, что уровни *LAMA5* были повышены у больных с холангиокарциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, ПАПЖ, и тимомой (Zhang и др., 2025). Вместе с тем, пониженные уровни *LAMA5* наблюдались у пациентов с раком молочной железы, аденокарциномой легкого и раком простаты (Zhang и др., 2025). Кроме того, высокая экспрессия *LAMA5* имела положительную корреляцию с маркерами активации Т-клеток, так же как и маркерами презентации антигена (Zhang и др., 2025).

На заключительном этапе работ по изучению опухолевого ВКМ был проведен биоинформатический анализ различий в экспрессии генов ВКМ в опухолях и нормальных тканях с целью выявления ключевых компонентов ВКМ, определяющих прогноз заболевания. Был выявлен общий для аденокарцином легкого, желудка, толстой кишки и яичников набор из девяти генов ВКМ (включая *COL11A1*, *COL10A1*, *SPP1*) (Рис. 8А), повышенная экспрессия которых была достоверно ассоциирована со сниженной общей и безрецидивной выживаемостью (Рис. 8Б).

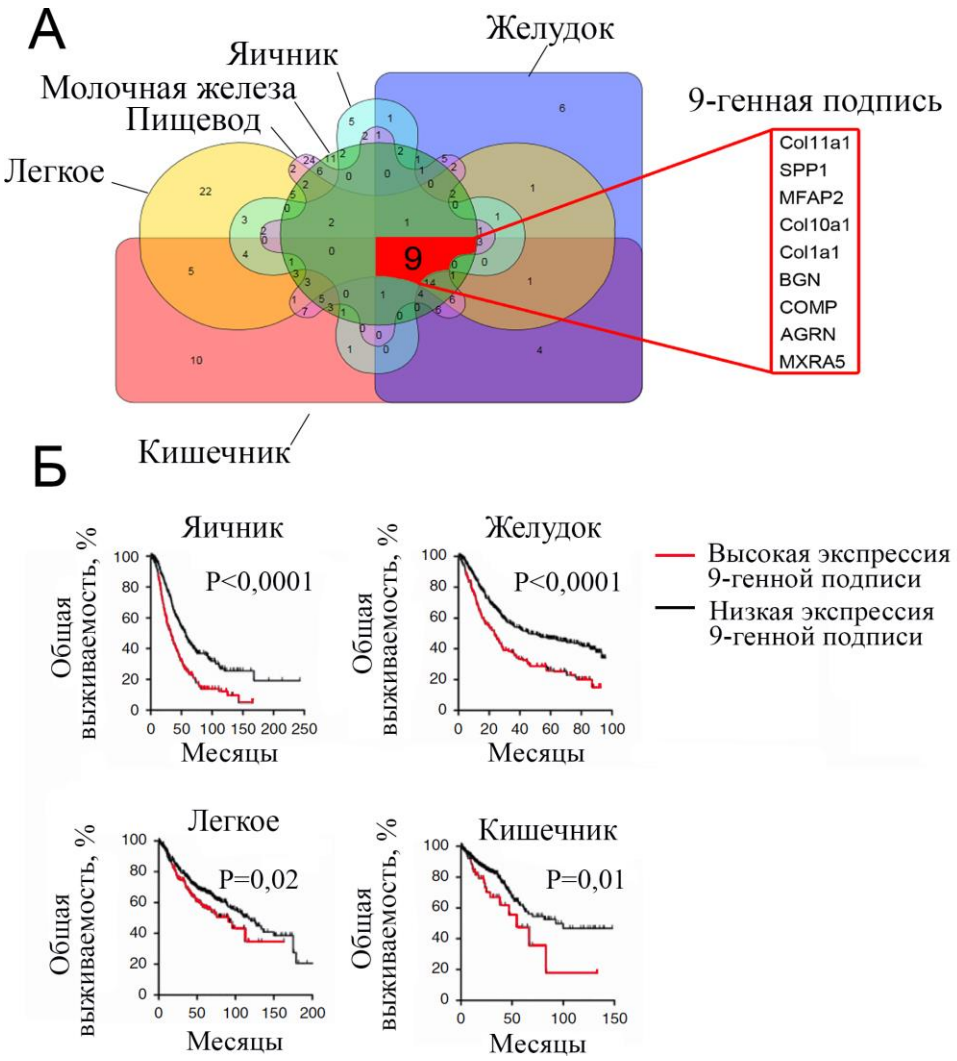


Рисунок 8 – Биоинформатический анализ: А – диаграмма Венна, использованная для идентификации общих генов ВКМ, которые являются значимо сверхэкспрессированными во всех типах ЗНО; Б – общая выживаемость пациентов, у которых в опухолях наблюдается сверхэкспрессия (красный) или низкая экспрессия (черный) 9-генной сигнатуры ВКМ. Для сравнения кривых использован Log-Rank test. N=489, 295, 585 и 526 для рака яичника, желудка, легкого, и кишечника, соответственно (набор TCGA)

Следует подробнее рассмотреть гены из полученной сигнатуры. Ген Col11a1 кодирует альфа-1 цепь коллагена XI типа. Это фибриллярный коллаген, который преимущественно регулирует диаметр фибрилл в хряще и стекловидном теле, для обеспечения эндохондрального остеогенеза (Fischer и др., 2001). SPP1 (остеопонтин) - многофункциональный белок ВКМ, участвующий в ремоделировании кости, воспалении, заживлении ран и ангиогенезе (Zhao и др., 2024). MFAP2 (микрофибрилл-ассоциированный белок 2) - значимый компонент эластических микрофибрилл, регулирующий активность TGF-β и костного морфогенетического белка (BMP) в сосудах, легких и связках (Xu и др., 2022). Col10a1 (альфа-1 цепь коллагена X типа) - сетчатый коллаген, экспрессируемый исключительно гипертрофическими хондроцитами и важный для эндохондрального остеогенеза и минерализации

ВКМ (Yi и др., 2024). BGN (бигликан) - протеогликан, связывающий ростовые факторы, такие как TGF-β и BMP, участвующий в костном ремоделировании, воспалении и сборке коллагеновых фибрилл (Kram и др., 2020). COMP (матриксный олигомерный белок хряща) - гликопротеин, стабилизирующий ВКМ хряща, сухожилий и связок путем связывания коллагенов и протеогликанов (M. M. Smith & Melrose, 2025). AGRN (агрин) - протеогликан гепарансульфат, необходимый для агрегации ацетилхолиновых рецепторов в нервно-мышечном синапсе и участвующий также в развитии почек, ангиогенезе и синаптической пластичности (M. A. Smith & Hilgenberg, 2002). MXRA5 (матрикс-ремоделирующий ассоциированный белок 5, адгерин) - секретируемый белок, вовлеченный в ремоделирование ВКМ, клеточную адгезию и миграцию, часто повышенный при фиброзе и в опухолевом микроокружении (Sun и др., 2021). Все эти гены, за исключением AGRN с его особой синаптической ролью, кодируют компоненты или регуляторы ВКМ, совместно обеспечивая развитие скелета, целостность соединительной ткани, заживление ран и гомеостаз хрящевой и костной тканей. Дисфункция этих генов лежит в основе наследственных дисплазий, остеопороза, артритов и фиброзных заболеваний. Релевантность данной сигнатуры для других видов ЗНО неясна и требует дальнейших исследований.

Комплексный анализ опухолевого иммунного микроокружения: поиск мишеней для стимуляции иммунного ответа

Следующей задачей диссертационного исследования было исследовать роль ключевых популяций иммунных клеток (макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток и Т-клеток) в развитии и прогрессии опухоли, а также в формировании противоопухолевого иммунного ответа.

Противоопухолевая терапия вызывает значимые изменения не только в самой опухоли, но и во всем ее микроокружении. Поскольку в предыдущих экспериментах лучевая терапия в дозе 10 Гр приводила к ремоделированию ВКМ (Рис. 2), была выдвинута гипотеза о том, что облучение может также влиять на инфильтрацию опухоли иммунными клетками. Изучение динамики иммунного микроокружения под действием лучевой терапии в однократной дозе 10 Гр показало, что через 5 суток после облучения опухолей MC38 происходит значительное увеличение инфильтрации макрофагами (Рис. 9А). Этот процесс во многом был опосредован индуцированной облучением секрецией опухолевыми клетками фактора колониестимулирующего фактора-1 (M-CSF, Рис. 9Б). Важно отметить, что привлеченные в опухоль макрофаги приобретали иммуносупрессивный фенотип, характеризующийся повышенной экспрессией генов *Arg1* и *Il10* и сниженной экспрессией генов, кодирующих провоспалительные цитокины *Il1α* и *Il1β* (Рис. 9В).

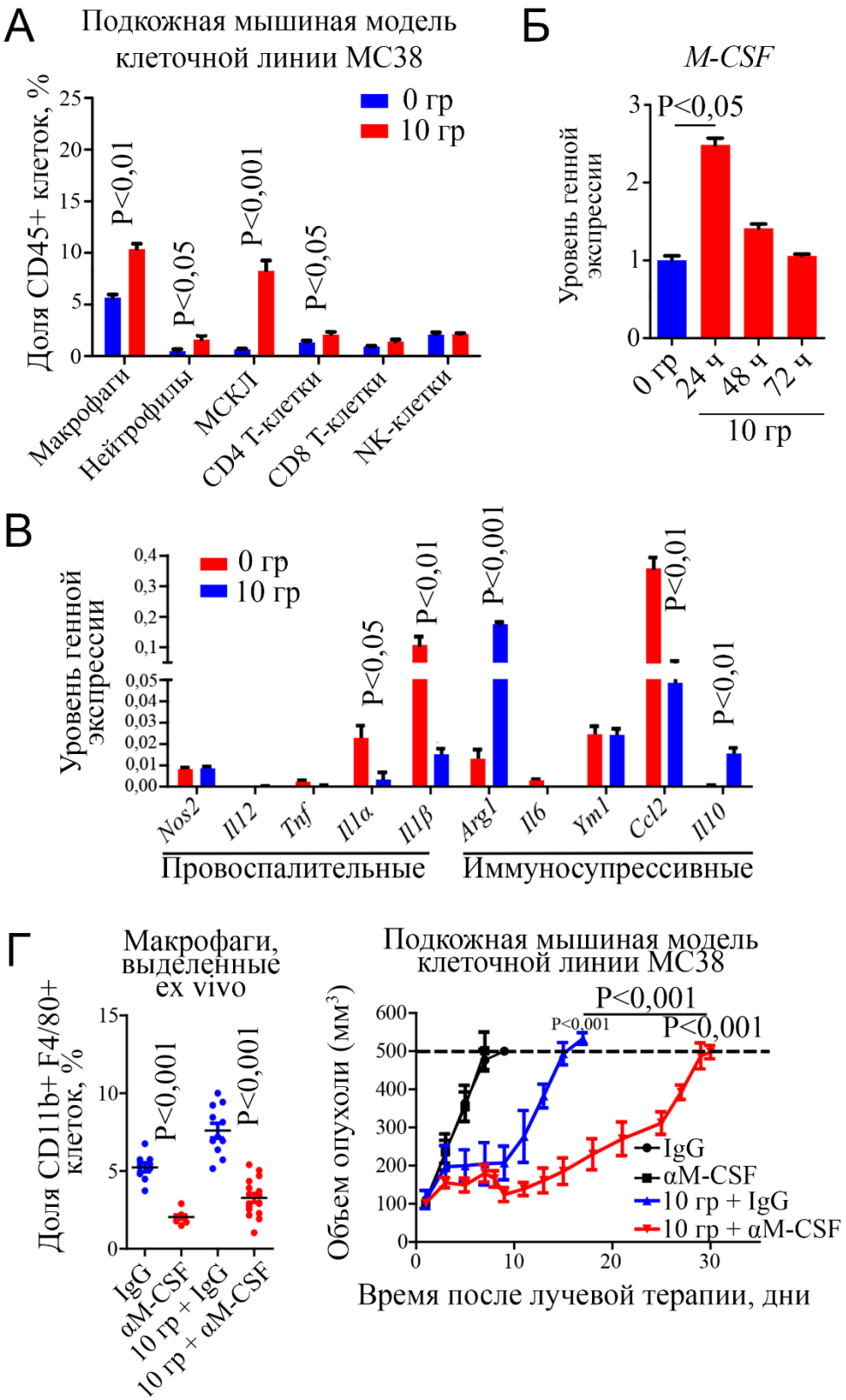


Рисунок 9 – Анализ иммунных популяций: А – проточная цитометрия иммунных клеток в опухолях через 5 дней после облучения; Б – Экспрессия мРНК M-CSF в облученных клетках; В – опухоль-ассоциированные макрофаги были выделены с последующим анализом экспрессии указанных генов; Г – слева: количество опухоль-ассоциированных макрофагов (CD11b+F480+) в опухолях MC38 после указанных видов лечения. Справа: кинетика роста опухолей MC38 после указанных видов лечения.

В мышиных моделях терапевтическое применение нейтрализующих антител к M-CSF в комбинации с лучевой терапией приводило к снижению количества макрофагов в опухоли и достоверному замедлению опухолевого роста *in vivo* (Рис. 9Г).

Дальнейшие эксперименты были направлены на изучение особенностей взаимодействия между макрофагами и опухолевыми клетками. Было установлено, что кондиционированная среда первичных мышиных моноцитов и макрофагов оказывала выраженное стимулирующее действие на злокачественный фенотип клеток КРР линии MC38. В присутствии этой среды скорость пролиферации опухолевых клеток достоверно возрастала (Рис. 10А). Кроме того, их миграционная и инвазивная активность в системе Transwell значительно усиливалась, в отличие от среды, кондиционированной гранулоцитами, которая демонстрировала лишь тенденцию к повышению этих показателей (Рис. 10Б). Методом дот-блота было установлено, что вышеуказанные эффекты как минимум частично были обусловлены активацией внутриклеточного сигнального пути ERK1/2 (Рис. 10В). Блокада этого пути селективным ингибитором U0126 нивелировала влияние миелоидных клеток на пролиферацию злокачественных клеток (Рис. 10Г). Таким образом, миелоидные клетки контролируют фенотип злокачественных клеток посредством активации молекулярного пути ERK1/2.

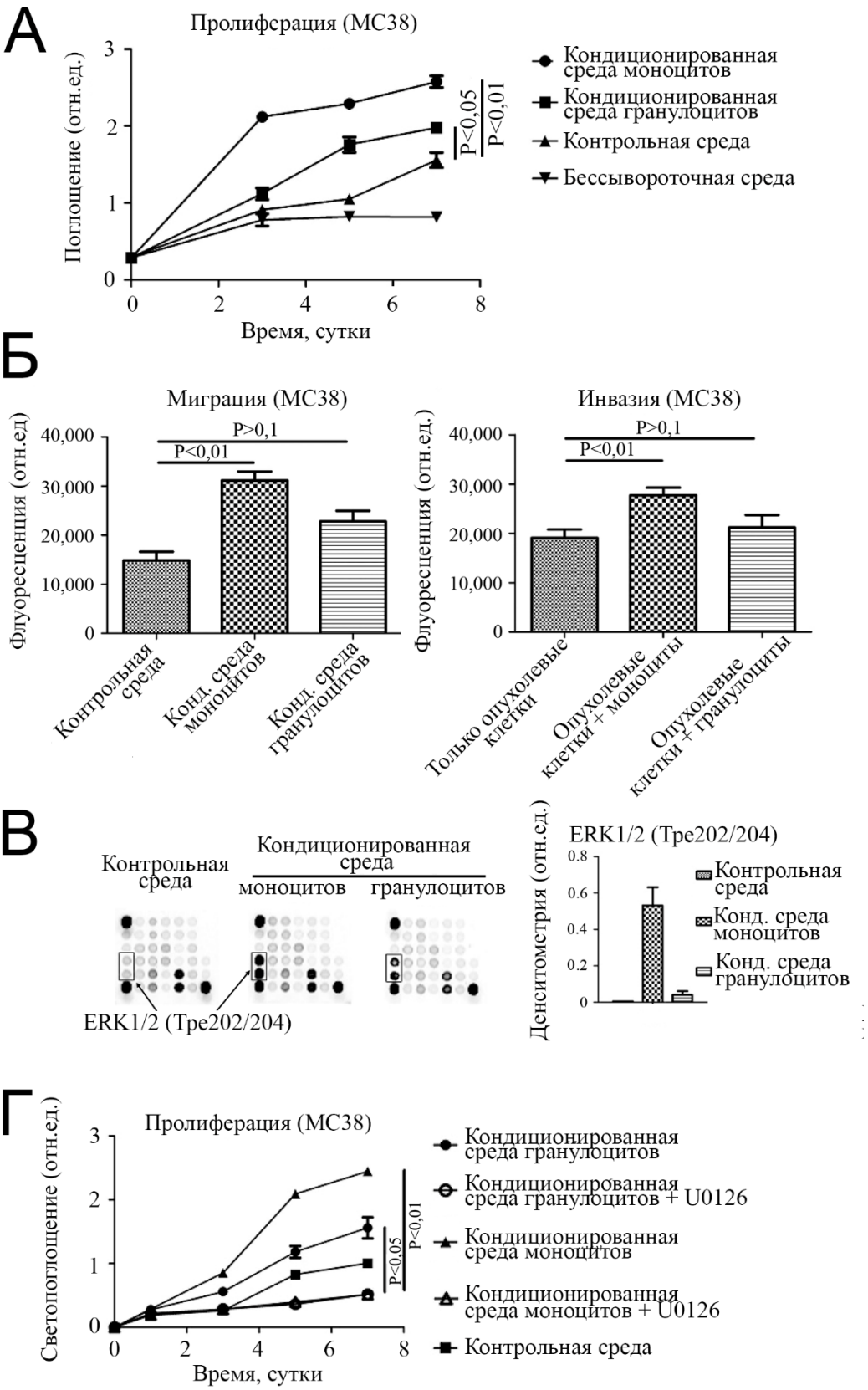


Рисунок 10 – Анализ кондиционированной среды миелоидных клеток на опухолевый фенотип: А – пролиферация клеток MC38; Б – миграция (слева) и инвазия (справа) клеток линии MC38; В – анализ сигнальных путей MC38; Г – пролиферация клеточной линии MC38, культивируемой в контрольной среде, среде, кондиционированной моноцитами/макрофагами или гранулоцитами в присутствии ингибитора ERK U0126 (10 мкМ). N=3 биологических повтора

Одним из ключевых этапов в противоопухолевом иммунном ответе является активация иммуногенного представления опухолевых антигенов. Ключевую роль в кросс-презентации антигенов для активации Т-клеток играют дендритные клетки, однако в опухолевом микроокружении они часто становятся дисфункциональными. Предполагается, что их активация может усилить ответ на иммунотерапию, в частности на ИИКТ. Для стимуляции дендритных клеток человека была использована панель пищевых добавок (витамины B, B2, B12, C, D, E, Омега-3). Выбор кандидатов был обоснован потенциальным влиянием нутритивного статуса, т.е. комплексного показателя состояния организма, отражающего степень его обеспеченности питательными веществами, такими как белки, жиры, углеводы, витамины и минералы, на иммунный гомеостаз и эффективность иммунотерапии.

Моноциты здоровых доноров дифференцировали в дендритные клетки, обрабатывали добавками в течение 48 часов и стимулировали липополисахаридом. Функциональный статус оценивали по уровню экспрессии ко-стимулирующих молекул CD40, CD86 и HLA-DR методом проточной цитометрии. Среди всех добавок лишь витамин E (50 мкг/мл) значимо повышал уровень всех исследуемых маркеров (Рис. 11А). Кроме того, обработка дендритных клеток витамином E усиливала продукцию гамма-интерферона CD8+ Т-лимфоцитами в совместной культуре (Рис. 11Б).

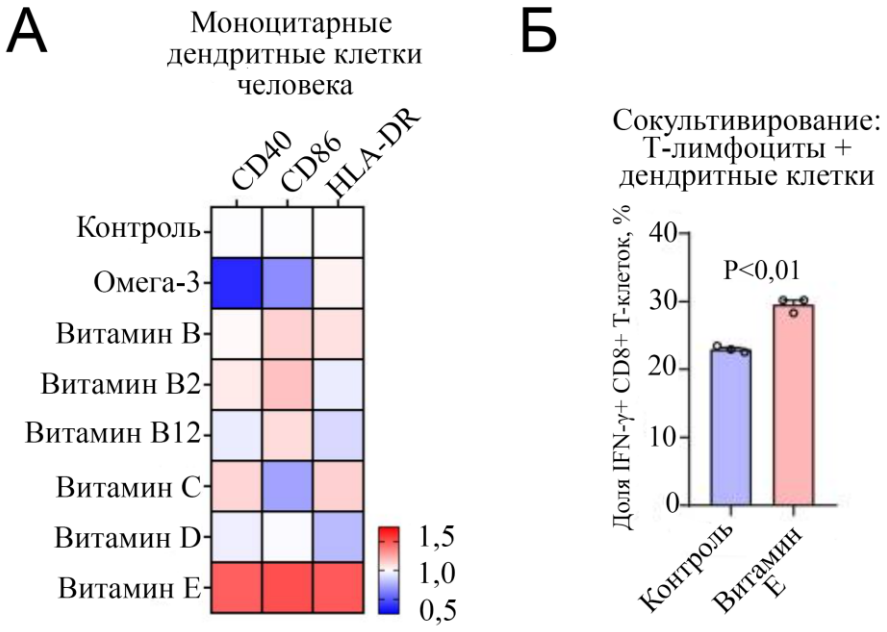


Рисунок 11 – Оценка влияния витаминов и добавок на функциональный статус дендритных клеток. А – тепловая карта уровня ко-стимулирующих молекул на поверхности дендритных клеток, обработанных указанными добавками. Б – процент человеческих CD8+ Т-клеток, экспрессирующих IFN-γ, от общего количества CD8+ Т-клеток, сокультивированных с моноцитарными дендритными клетками человека, обработанными контролем или витамином E

Для изучения механизмов влияния витамина Е на противоопухолевый иммунный ответ были использованы *in vivo* модели. В ортотопической мышиной модели РМЖ (клеточная линия EMT6) лечение витамином Е увеличивало инфильтрацию опухоли CD8+ Т-клетками и дендритными клетками, в особенности классическими дендритными клетками 1 типа, обладающими высокой способностью к кросс-презентации (Рис. 12А). В свою очередь, на моделях РМЖ и ПАПЖ, обычно резистентных к монотерапии ИИКТ, комбинация химиотерапии, ИИКТ (αPD-1) и витамина Е достоверно повышала выживаемость животных, в сравнении с контролем (Рис. 12Б, В). Эти данные позволили предположить роль витамина Е в усилении противоопухолевого ответа.

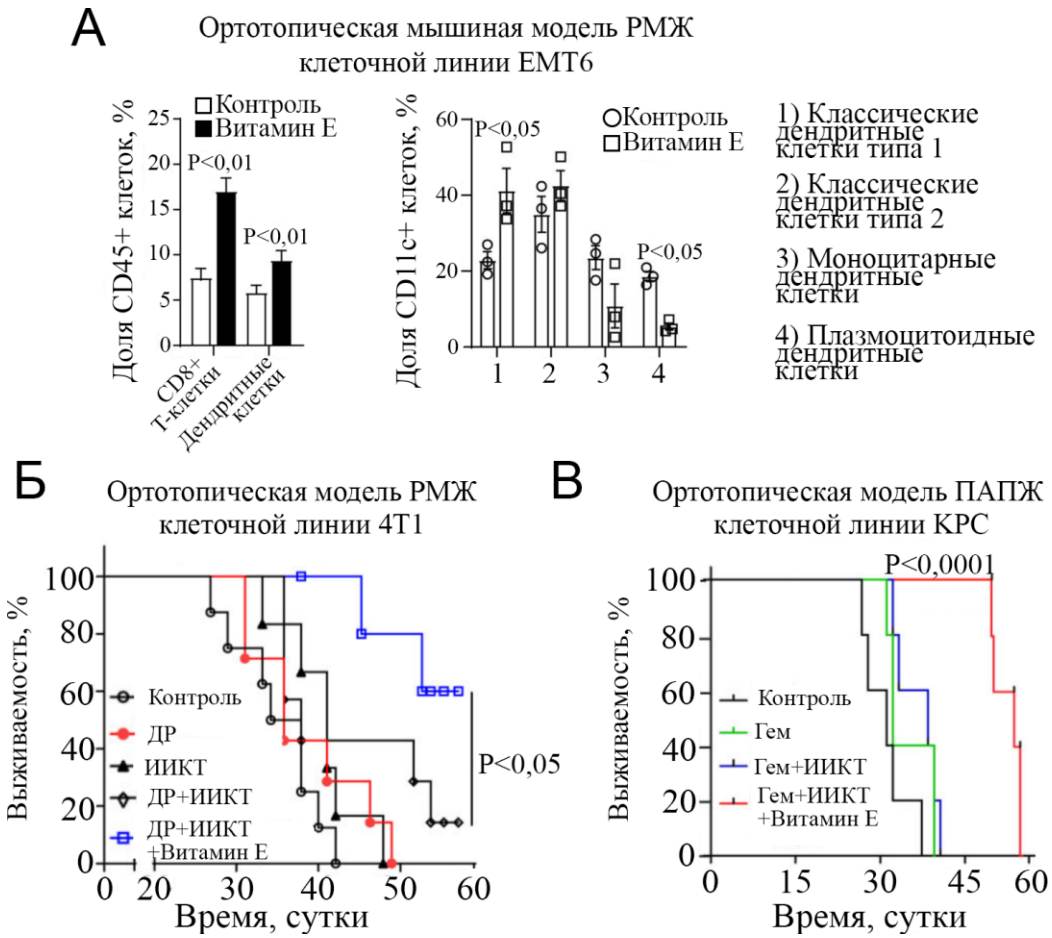


Рисунок 12 – Влияние витамина Е на рост опухоли: А – влияние витамина Е на количество иммунных клеток в опухоли. Слева: доля CD8+ Т-клеток и CD11c+ дендритных клеток в опухолях после курса лечения мышей витамином Е. N=6 биологических повторов. Справа: количественное определение различных субпопуляций CD11c+ дендритных клеток в том же эксперименте; Б, В – выживаемость мышей с ортотопическими опухолями, получавших указанное лечение. ДР – доксорубицин, Гем – гемцитабин

Для подтверждения клинической значимости приема витамина Е проводили ретроспективный анализ когорты пациентов с меланомой, получавших ИИКТ. Установлено, что прием витамина Е у больных был

ассоциирован со снижением смертности и увеличением общей выживаемости (Рис. 13). Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что витамин Е через активацию дендритных клеток усиливает антигенспецифичный Т-клеточный ответ и может усиливать эффективность ИИКТ.

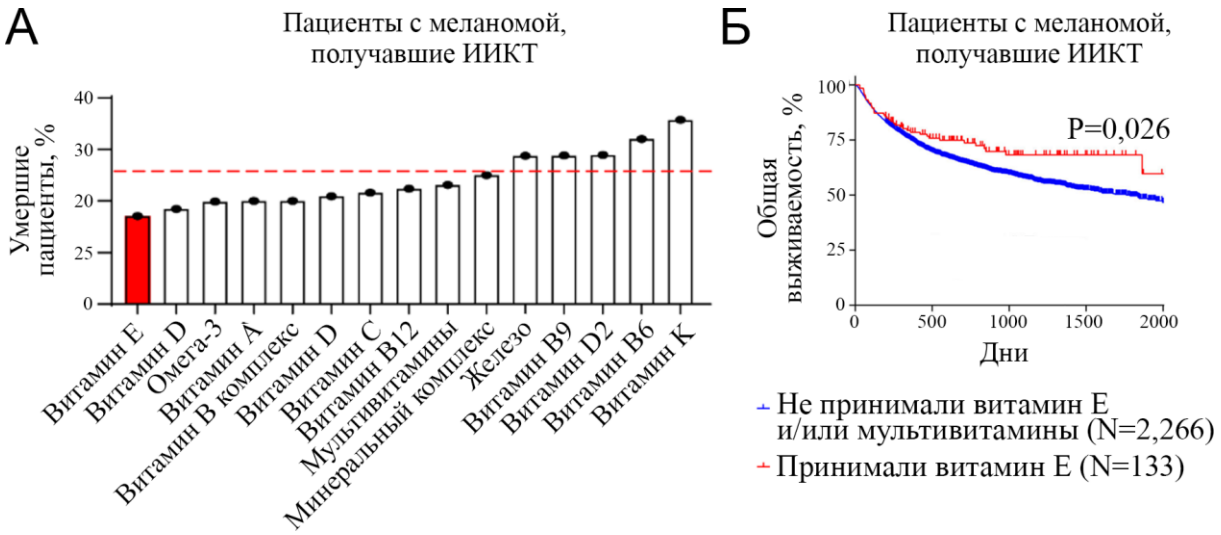


Рисунок 13 – Прием витамина Е связан с пониженной смертностью и улучшенной общей выживаемостью среди пациентов с меланомой, получавших ИИКТ. Слева: процент умерших пациентов с меланомой, принимавших указанные добавки в ходе терапии ИИКТ (α-PD-1/PD-L1). Когорта пациентов Онкологического центра им. М.Д. Андерсона за 2016-2019 гг., N=2,715. Красная пунктирная линия указывает медианный процент умерших пациентов с меланомой, которые не принимали витамин Е. Справа: общая выживаемость пациентов с меланомой, принимавших витамин Е во время лечения ИИКТ (α-PD-1/PD-L1), по сравнению с пациентами, не принимавшими витамин Е и/или мультивитамины

Жирорастворимый витамин Е необходим для нормальной функции многих органов (Zingg, 2015). Его потенциальное противораковое действие изучается десятилетиями, а результаты остаются противоречивыми (Hall и др., 2019; Kristal и др., 2014). Ранние работы указывали на противоопухолевую активность витамина Е (K.-Y. Lee и др., 2015; Singh и др., 2005), однако клинические испытания (I.-M. Lee и др., 2005; Lippman и др., 2009) не выявили значимого эффекта. Результаты данного исследования проливают свет на возможную причину этой неэффективности. Так, витамин Е усиливает презентацию антигенов дендритными клетками, а опосредуемый им противоопухолевый иммунитет зависит от индуцируемого дендритными клетками антиген-специфического ответа. Возможный механизм действия витамина Е может быть обусловлен его влиянием на иммунные контрольные точки дендритных клеток, такие как SHP1. Следовательно, добавки витамина Е могут проявлять значимый эффект преимущественно у пациентов с высокоиммуногенным микроокружением опухоли, обогащенным дендритными клетками, где его действие направлено на усиление уже существующего, но недостаточного для уничтожения опухоли иммунного ответа.

Помимо дендритных клеток, в микроокружении солидных опухолей встречаются и другие миелоидные популяции. Например, было выявлено значительное увеличение количества Ly6G+ нейтрофилов в мышиных метастазах КРР по сравнению со здоровой тканью печени (Рис. 14). При этом введение мышам нейтрализующих антител αLy6G приводило к значимому снижению метастазов печени по результатам биолюминесцентной визуализации (Рис. 15). Кроме того, в опухолях животных, получавших αLy6G, наблюдалось снижение плотности микрососудистой сети по результатам окрашивания на маркер CD31 (Рис. 16). Это указывает на возможную регуляцию нейтрофилами ангиогенеза опухоли.

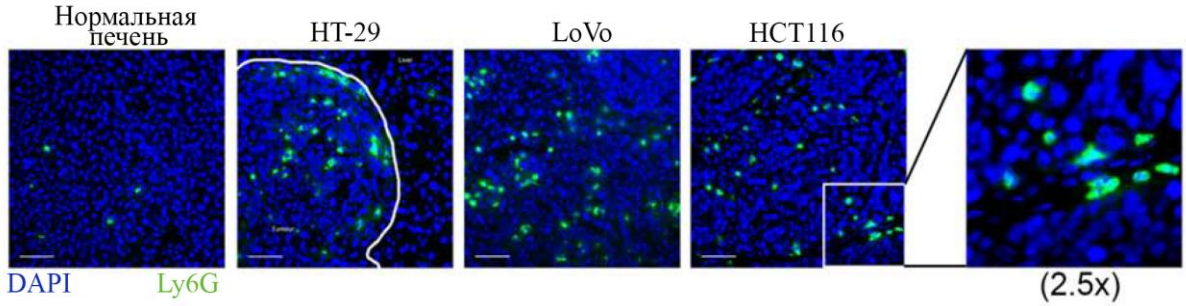


Рисунок 14 – Микрофотографии репрезентативных образцов печени контрольных мышей линии SCID и мышей с метастазами КРР, окрашенных на маркеры Ly6G (зеленый) и DAPI (синий). Белая линия обозначает границу между нормальной тканью печени и зоной метастаза, где виден участок нормальной печени. Шкала=40 мкм

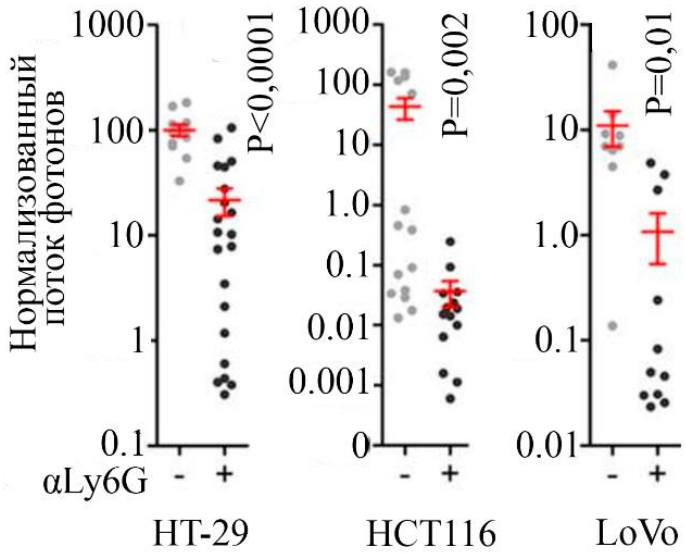


Рисунок 15 – Нормализованная люминесценция печени, зарегистрированная *ex vivo*, у мышей с метастазами КРР

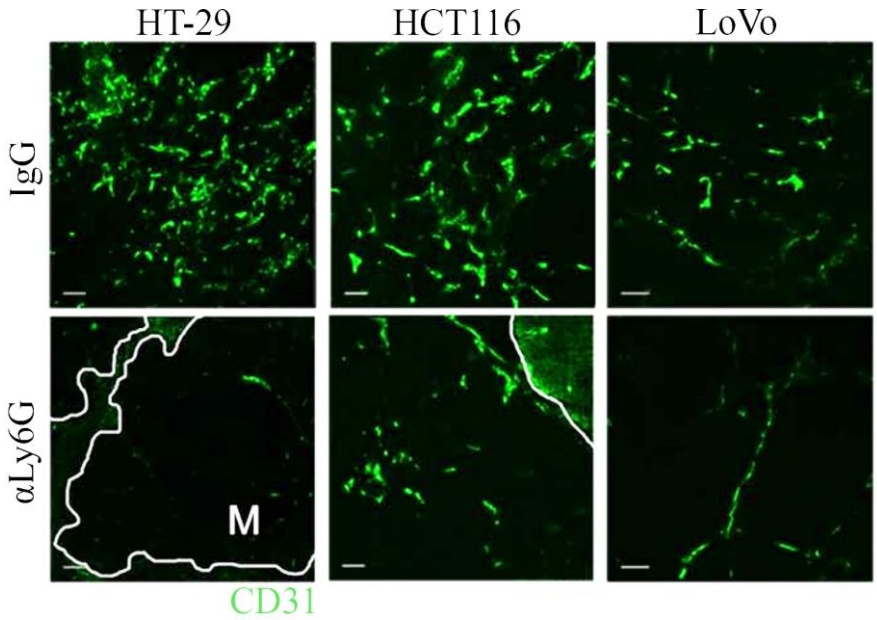


Рисунок 16 – Иммуногистохимическое окрашивание на CD31 в образцах печени мышей с метастазами КРР, которые получали лечение антителами IgG или αLy6G. Шкала=80 мкм

Сравнительный профиль мРНК нейтрофилов, выделенных из мышиных метастазов КРР и здоровой печени, выявил десятикратное увеличение экспрессии фактора роста фибробластов 2 (FGF-2), фибронектина и серпина E1 в опухоль-ассоциированных нейтрофилах (Рис. 17). Ранее была показана роль FGF-2 в ангиогенезе (Presta и др., 2009). Наибольший уровень мРНК *FGF-2* был обнаружен именно в нейтрофилах печени (Рис. 18), при этом терапия αLy6G достоверно снижала уровень FGF-2 в метастазах КРР (Рис. 19).

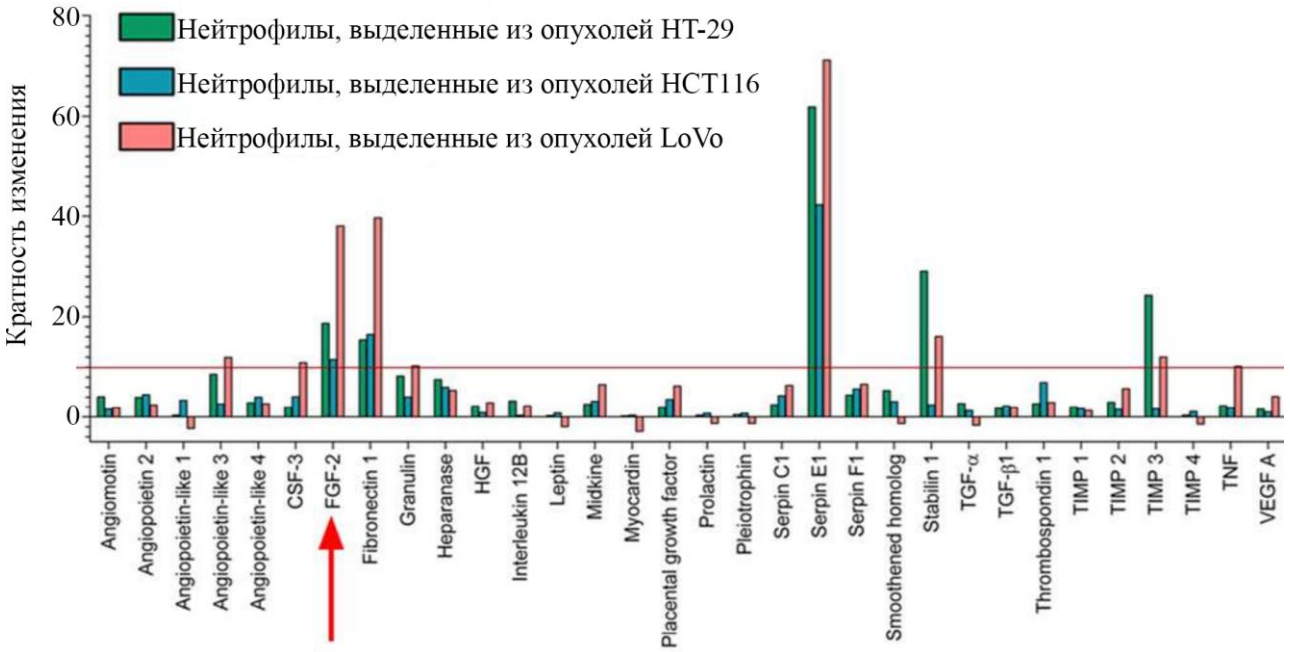


Рисунок 17 – Количественная ПЦР в реальном времени для определения генной экспрессии факторов, стимулирующих ангиогенез, в нейтрофилах, выделенных из печеночных метастазов клеточных линий HT-29, HCT116 или LoVo. Уровни экспрессии представлены относительно интактных нейтрофилов.

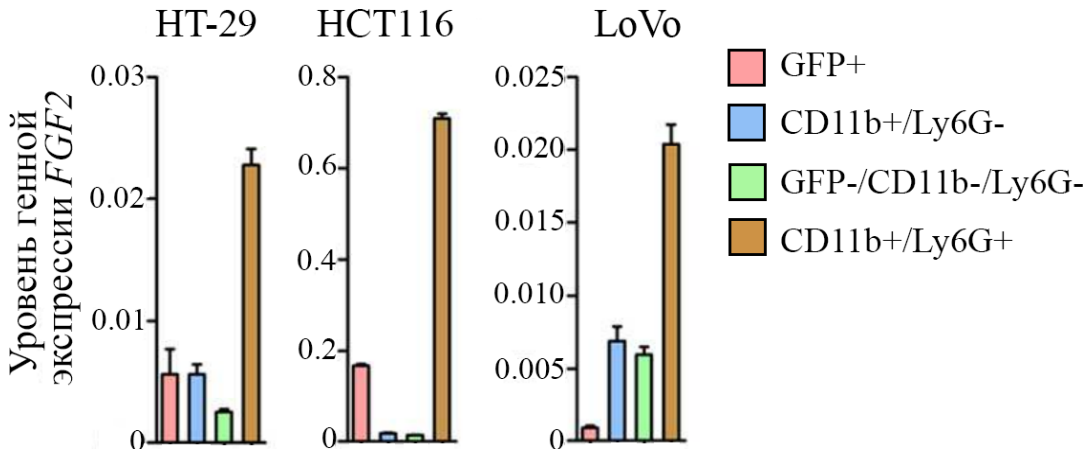


Рисунок 18 – Относительный уровень генной экспрессии FGF2 в клетках, выделенных методом клеточного сортинга из печеночных метастазов указанных клеточных линий

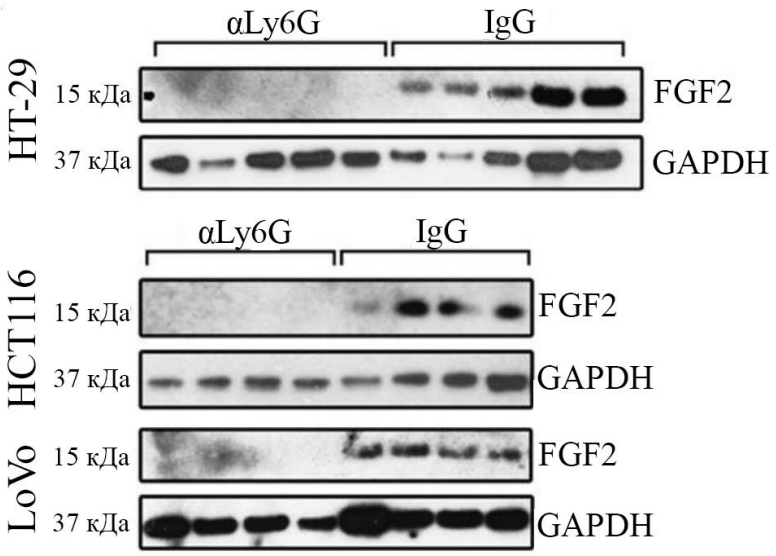


Рисунок 19 – Результаты иммуноблоттинга на белок FGF2 в образцах печеночных метастазов мышей, которые получали лечение антителами IgG или αLy6G

Для лечения метастазов КРР была испытана экспериментальная терапия моноклональными антителами, блокирующими FGF-2 (GalF2). Лечение снижало количество и размер печеночных метастазов (Рис. 20), а также уменьшало плотность и ветвление CD31+ сосудов, что может быть объяснено процессами сосудистой нормализации (Рис. 21). Это подтверждалось значительным снижением гипоксии (окрашивание по EF5+) в опухолях мышей, получавших антитело GalF2 (Рис. 22).

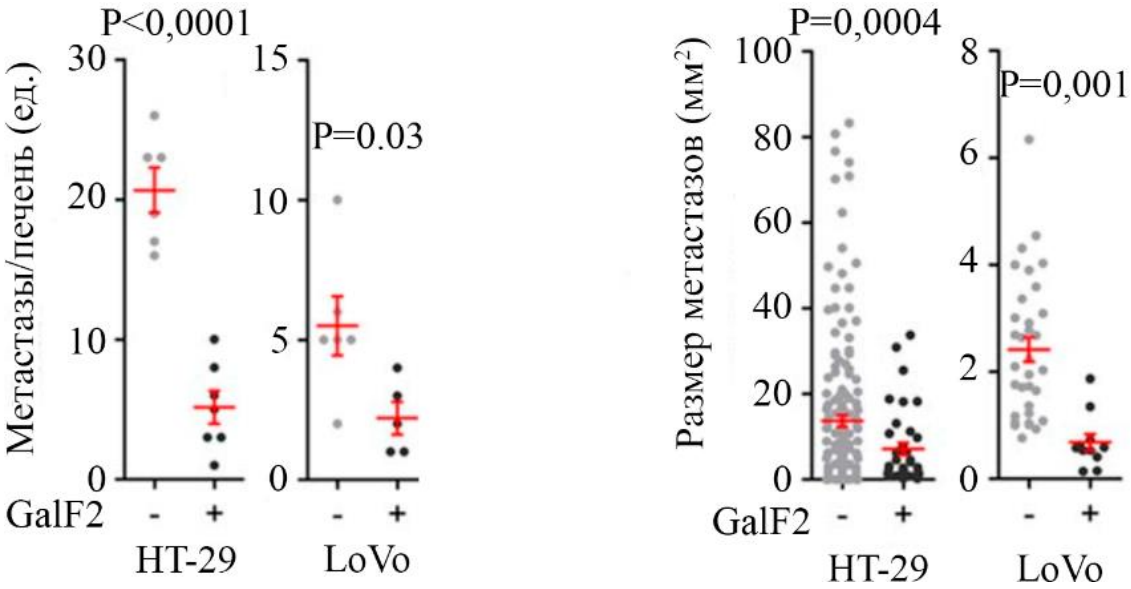


Рисунок 20 – Количество видимых метастазов (слева) и площадь поверхности (мм²) каждого метастатического очага печени (справа) у мышей, получавших лечение IgG или антителом GalF2 с интервалом в 72 часа, начиная со 2-й недели после инъекции указанных опухолевых клеточных линий

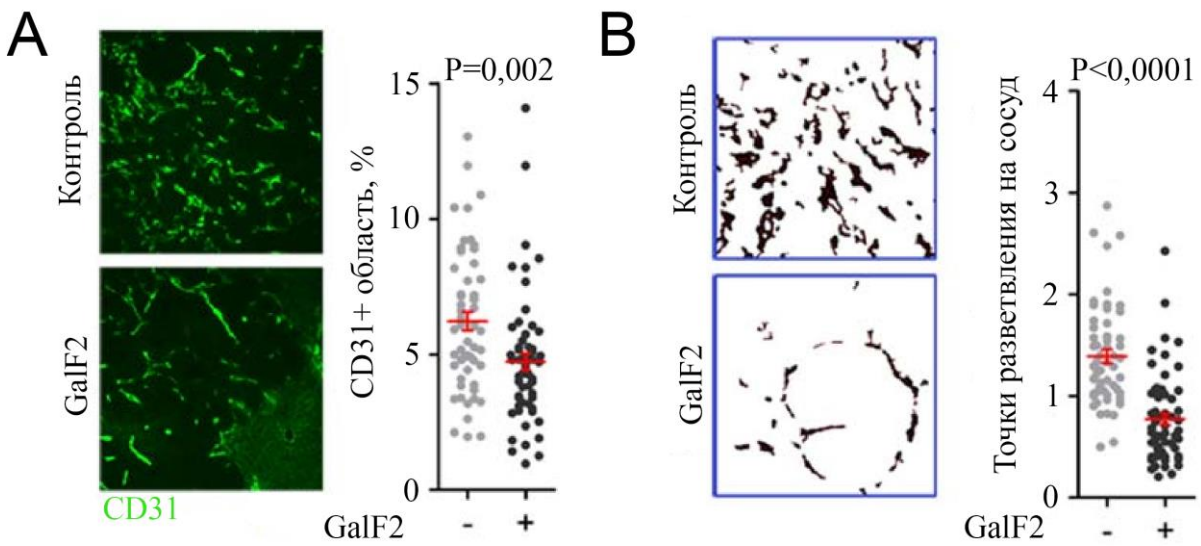


Рисунок 21 – Слева: иммуногистохимическое окрашивание и количественная оценка площади окрашивания CD31 (зеленый) в печеночных метастазах линии HT-29 у мышей, которые получали лечение IgG или антителом GalF2. Шкала=80 мкм. Справа: визуализация и количественная оценка точек ветвления сосудов в печеночных метастазах линии HT-29 у мышей, получавших лечение IgG или антителом GalF2 с интервалом в 72 часа, начиная со 2-й недели после инъекции опухолевых клеточных линий

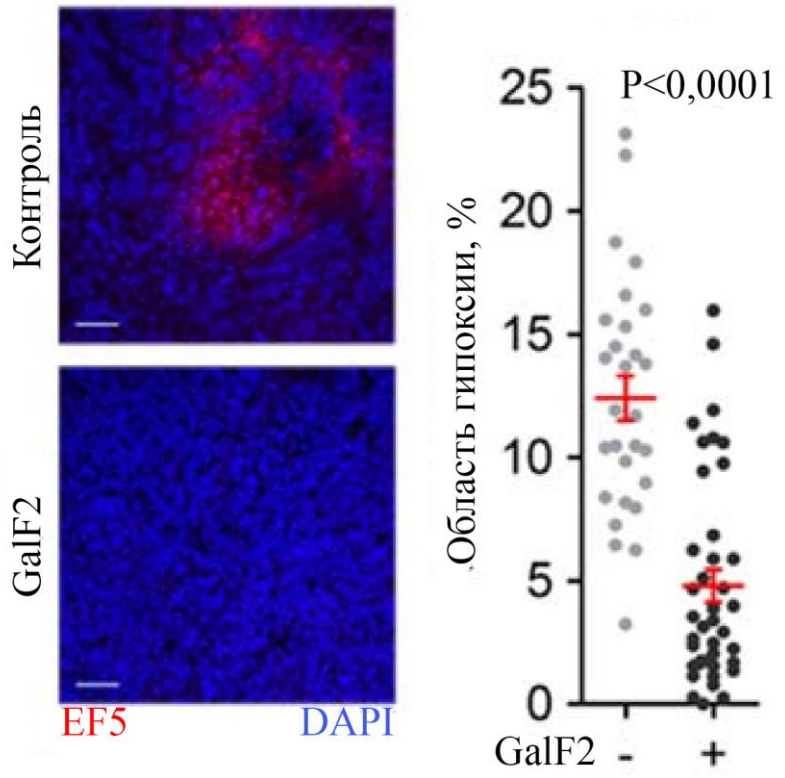


Рисунок 22 – Иммуноокрашивание (слева) и количественная оценка (справа) EF5+ зоны гипоксии в печеночных метастазах HT-29 в процентах от общей площади опухолевого очага у мышей, получавших лечение IgG или GalF2

Таким образом, нейтрофилы в микроокружении печеночных метастазов КРР способствуют прогрессированию заболевания за счет секреции FGF-2 и стимуляции ангиогенеза.

В заключительной части иммунологического блока диссертационного исследования была изучена возможность терапевтически активировать противоопухолевый Т-клеточный ответ в метастазах головного мозга. Был исследован механизм уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора в модели церебральных метастазов РМЖ (РМЖ-ММ). Биоинформатический анализ опухолевых образцов онкобольных выявил значительное повышение уровня экспрессии гена *CDK5* в РМЖ-ММ по сравнению с первичной опухолью (Рис. 23А). Валидация этих *in silico* результатов методом иммуногистохимического анализа подтвердила увеличение количества белка CDK5 в метастазах пациентов в сравнении с первичным РМЖ (Рис. 23Б). Таким образом, была показана клиническая значимость CDK5 для прогрессирования метастазов головного мозга.

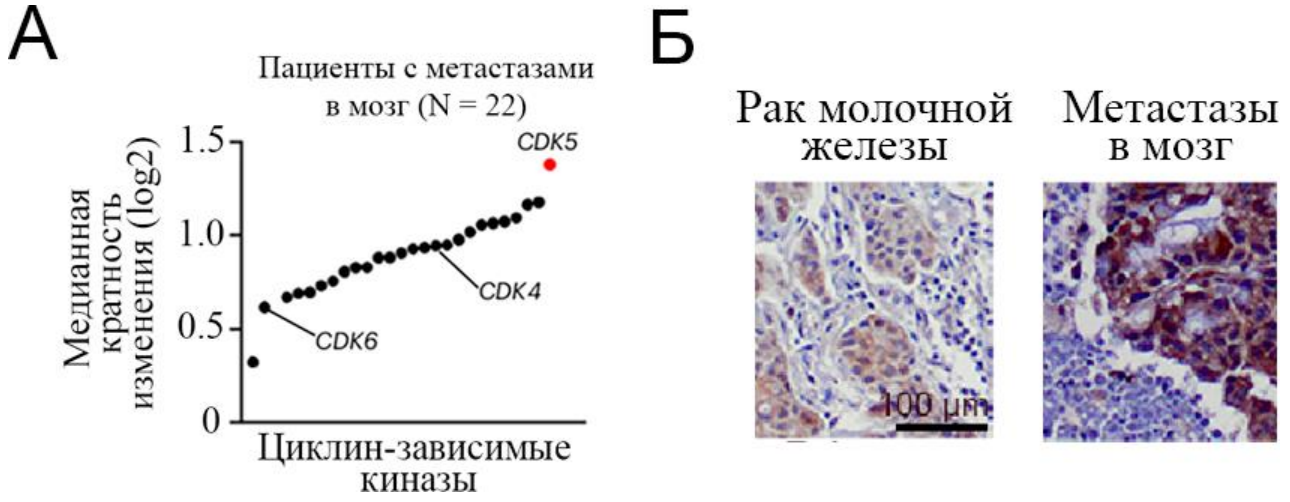


Рисунок 23 – Анализ циклин-зависимых киназ: А – медианное изменение уровня экспрессии генов семейства *CDK* в церебральных метастазах пациентов (N=22), нормализованное относительно соответствующей экспрессии в спаренных первичных опухолях РМЖ; Б – Иммуноокрашивание на CDK5. Шкала=100 мкм

Для выяснения функциональной значимости CDK5 в контексте церебральных метастазов, был проведен ряд *in vivo* экспериментов. Нокдаун гена *CDK5* (shCDK5) в мышиной клеточной линии РМЖ EO771.Br3 достоверно повышал выживаемость в сингенной модели индуцированных церебральных метастазов (Рис. 24А, Б).

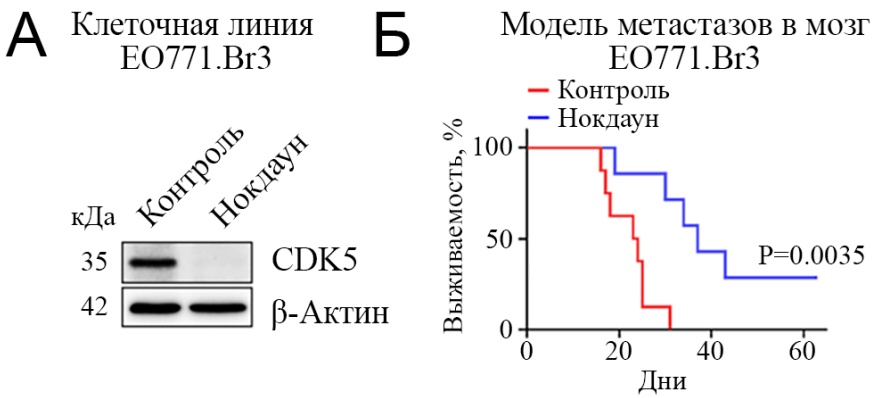


Рисунок 24 – А – иммуноблоттинг на указанные белки в клетках EO771.Br3 с нокдауном гена *CDK5* и без такового (контроль). Б – выживаемость мышей с церебральными метастазами, индуцированных клетками EO771.Br3 с нокдауном *CDK5* и без такового (контроль)

Секвенирование единичных клеток (scRNA-seq) GFP+ опухолевых клеток, выделенных из метастазов головного мозга мышей, показало обогащение ряда генов, связанных с презентацией антигена и функцией MHC-I, в условиях нокдауна CDK5 (Рис. 25). Для подтверждения этой находки был проведен иммуноблоттинг на опухолевых клеточных линиях, показавший повышение уровня MHC-I на мембране клеток с shCDK5. Помимо этого, гистологический анализ выявил увеличение инфильтрации CD8+ Т-лимфоцитами метастазов с shCDK5 (Рис. 26).

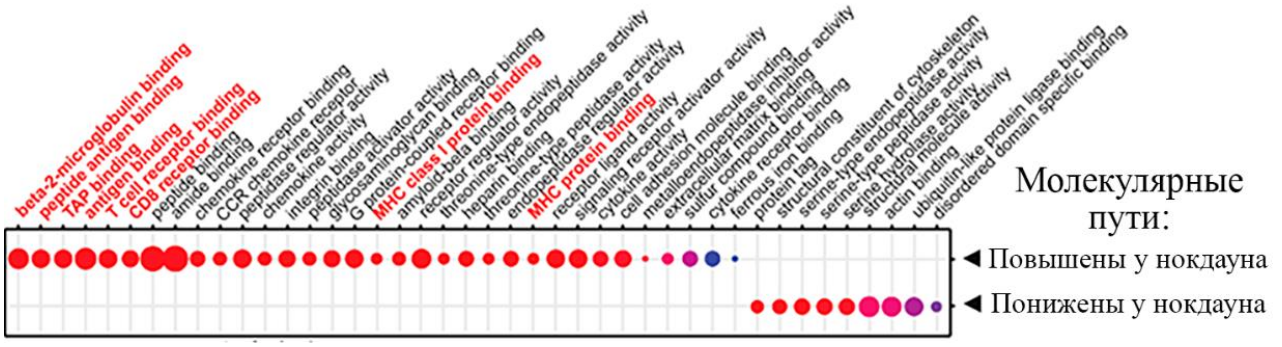


Рисунок 25 – Основные молекулярные пути, обогащенные в раковых клетках церебральных метастазов с нокдауном гена *CDK5* по сравнению с контрольными клетками, по результатам scRNA-seq анализа. Пути, участвующие в представлении антигена и связанных с MHC-I процессах, отмечены красным цветом

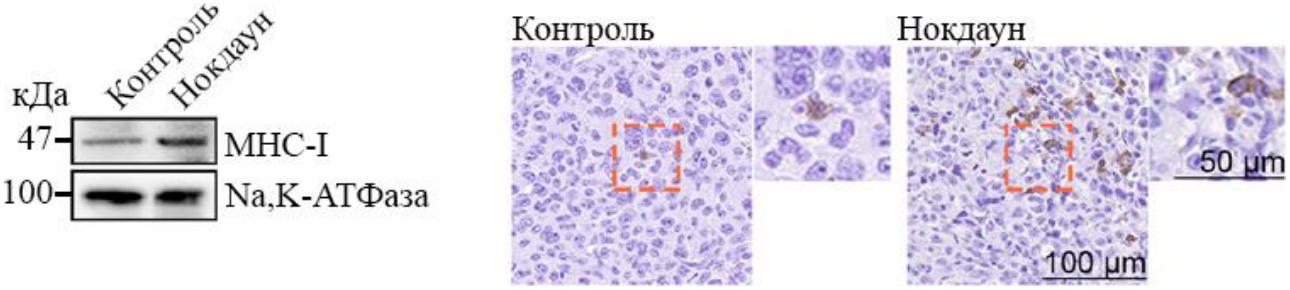


Рисунок 26 – Слева: иммуноблоттинг на указанные белки в клетках EO771.Br3 с нокдауном CDK5 и без такового (контроль). Справа: репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания на CD8 в церебральных метастазах мышей, индуцированных клетками EO771.Br3 с нокдауном *CDK5* и без такового (контроль)

Полученные данные послужили патогенетическим обоснованием нацеливания на CDK5 для терапии церебральных метастазов. В качестве ингибитора был использован экспериментальный лекарственный препарат росковитин, производное пурина, который действует как селективный ингибитор CDK5 и в меньшей степени CDK1 и CDK2. Росковитин характеризуется конкурентным связыванием с АТФ-связывающим сайтом циклин-зависимых киназ. Терапевтическое ингибирование CDK5 росковитином снижало частоту и размер церебральных метастазов в моделях 4T1.Br3 и T11 (Рис. 27), при этом наблюдалось достоверное усиление инфильтрации опухоли CD8+ Т-клетками в сравнении с контрольной группой (Рис. 28).

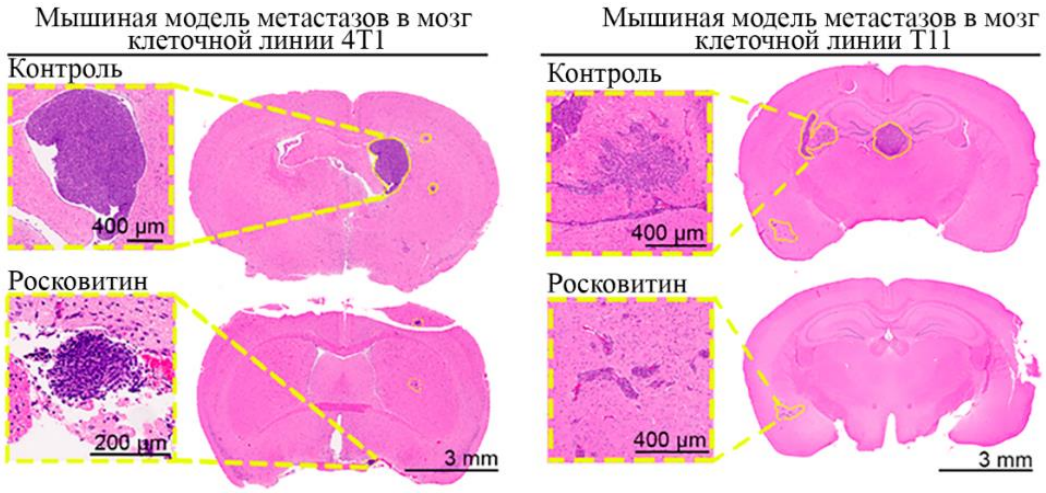


Рисунок 27 – Репрезентативные микрофотографии головного мозга мышей, получавших указанное лечение, после окрашивания ГЭ.

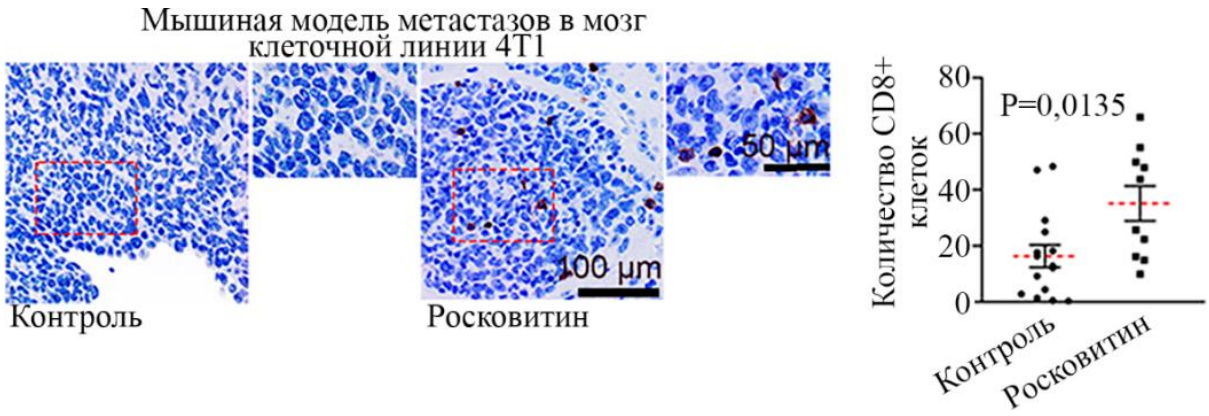


Рисунок 28 – Слева: репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания на CD8 в церебральных метастазах мышей, индуцированных клетками 4T1.Br3 после курса лечения росковитином или контролем (ДМСО). Справа: подсчет количества CD8+ клеток в группах. N=3 биологических повтора

Поскольку в литературе не было обнаружено данных о связи между CDK5 и регуляцией MHC-I и/или адаптивным иммунным ответом, проводили углубленный анализ этого взаимодействия. Был проведен анализ субстратов CDK5 с использованием фосфопротеомики в клетках РМЖ линии 4T1 с нокдауном CDK5 и в контрольных клетках. Было выявлено, что большинство дефосфорилированных белков в нокдауне были связаны с известной функцией CDK5 - сборкой микротубулярных структур, включая Map1b и другие (Рис. 29). Среди других белков, Nop56 известен своим участием в биогенезе рибосом, белок GM44505 является убиквитинлигазой, а Aftph является белком, связывающимся с клатрином. Кроме того, среди выявленных дефосфорилированных белков был идентифицирован интерферон-регуляторный фактор 2-связывающий белок 1 (Irf2bp1), который регулирует иммунные функции посредством контроля сигнального пути интерферона (Рис. 29). Анализ показал, что фосфорилирование Irf2bp1 по остатку серина S66 было ингибировано на 51% при нокдауне CDK5 (Рис. 29).

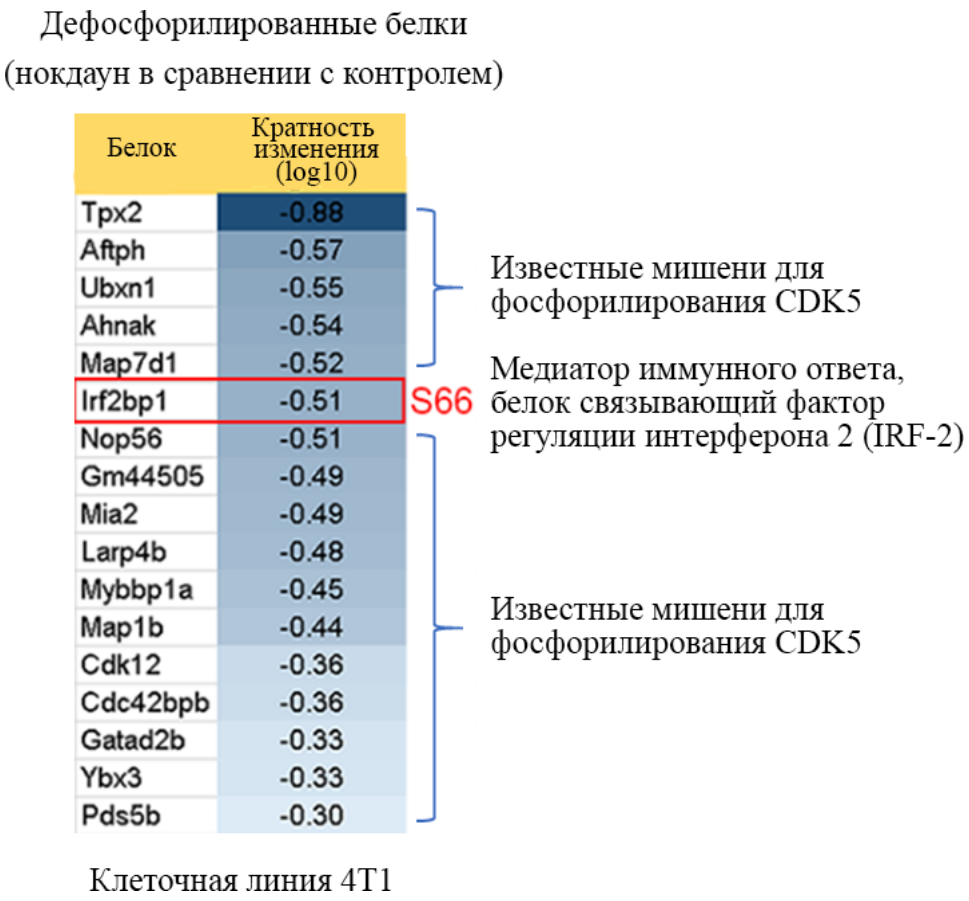


Рисунок 29 – Результаты масс-спектрометрического исследования фосфорилированных белков в культурах клеточных линий 4T1 с нокдауном CDK5 и без такового (контроль)

При проведении экспериментов иммунопреципитации CDK5 с последующим иммуноблоттингом на Irf2bp1 было установлено, что две молекулы образуют белок-белковый комплекс в опухолевых клетках (Рис. 30). Эта находка допустила возможность фосфорилирования Irf2bp1 киназой CDK5. Для экспериментальной проверки был проведен анализ методом прямой киназной активности *in vitro*. Было выявлено, что очищенный человеческий белок CDK5 в комплексе с его активатором p25 напрямую фосфорилирует как мышиный, так и человеческий рекомбинантный Irf2bp1 (Рис. 31). При этом добавление росковитина полностью блокировало фосфорилирование Irf2bp1, подтверждая зависимость от киназной активности CDK5 (Рис. 31). В опухолевых клеточных линиях нокдаун гена *CDK5* повышал уровни транскрипционных факторов STAT1 (с фосфорилированием по остатку S727) и NLRC5, напрямую активирующих экспрессию MHC-I (Рис. 32).

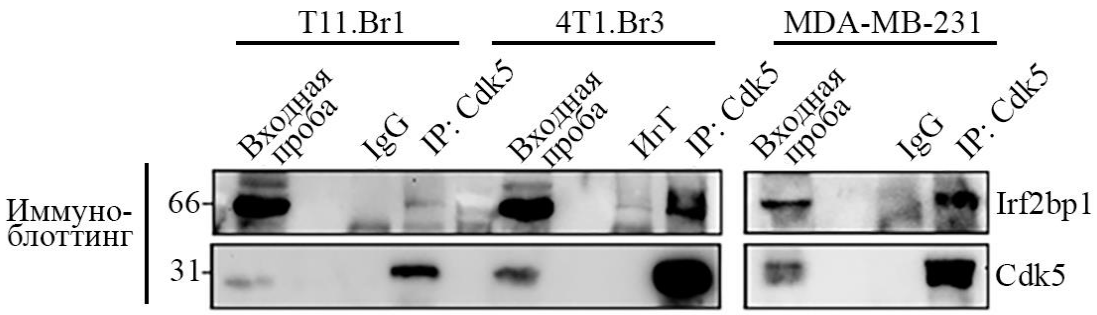


Рисунок 30 – Результаты иммуноблоттинга на белок Irf2bp1 после иммунопреципитации CDK5 из указанных опухолевых клеточных линий

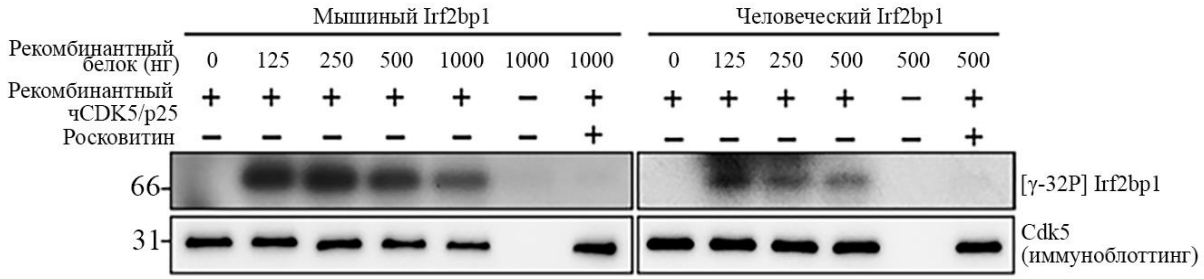


Рисунок 31 – Оценка *in vitro* киназной активности CDK5 в отношении Irf2bp1 с использованием [γ-32P]АТФ, где γ-фосфат мечен изотопом фосфора-32, высокоэнергетическим β-излучателем.

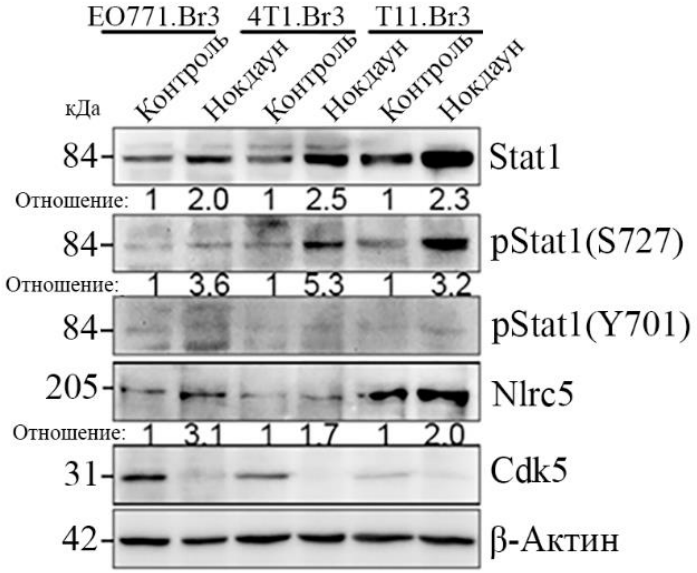


Рисунок 32 – Результаты иммуноблоттинга мышиных опухолевых клеточных линий РМЖ с нокдауном CDK5 и без такового (контроль) на указанные белки.

Дополнительно были изучены молекулярные механизмы повышения уровня CDK5 в опухолевых клетках в головном мозге. Было предположено, что рассматриваемый эффект обусловлен влиянием одного или нескольких компонентов опухолевого микроокружения. В ходе анализа литературных данных было выдвинуто предположение, что астроциты головного мозга могут

быть наиболее вероятной причиной феномена, поскольку данная клеточная популяция активно инфильтрирует злокачественные новообразования ЦНС и может быть вовлечена в патофизиологические процессы роста и развития опухоли (Catalano и др., 2023). Культивирование клеток РМЖ в кондиционированной среде от первичных мышиных астроцитов увеличивало экспрессию CDK5 (Рис. 33). Протеомный анализ выявил значительное увеличение секреции белка emilin-1 мышиными астроцитами, «обученными» кондиционированной средой опухолевых клеток (Рис. 34). Обработка клеток РМЖ рекомбинантным белком emilin-1 вызывала дозо- и времязависимое увеличение уровня CDK5 (Рис. 35). Таким образом, можно предположить, что emilin-1, секретируемый активированными астроцитами головного мозга, способен активировать экспрессию CDK5 в РМЖ-ММ.

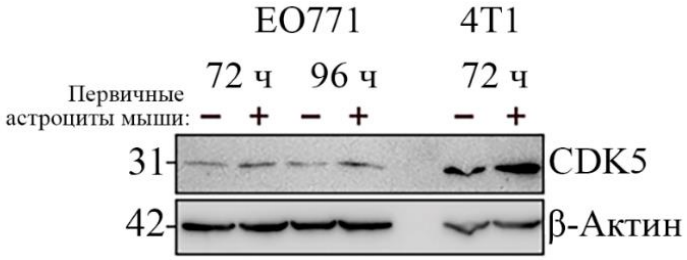


Рисунок 33 – Результаты иммуноблоттинга, отражающие уровень CDK5 в указанных клеточных линиях в присутствии первичных мышиных астроцитов после культивирования в камере Бойдена.

Белок	Кондиционированная среда: Контрольная #1	Контрольная #2	Активированная #1	Активированная #2	Кратность изменения
Emilin-1	5.95E+06	4.84E+06	2.82E+07	1.29E+06	2.7
Versican core protein	1.17E+07	1.99E+07	6.76E+07	7.08E+06	2.4
ITIH2	5.40E+07	5.08E+07	1.56E+08	7.07E+07	2.2
Fibulin-2	7.67E+06	4.64E+06	1.79E+07	8.08E+06	2.1
Antithrombin-lll	3.28E+07	3.18E+07	8.39E+07	5.22E+07	2.1
Fibulin-1	1.68E+08	1.27E+08	3.72E+08	1.70E+08	1.8
α-2-Macroglobulin-P	1.23E+08	1.04E+08	3.06E+08	1.07E+08	1.8
Secreted frizzled-related protein 1	2.47E+08	2.21E+08	4.77E+08	3.60E+08	1.8
Serine protease inhibitor A3F	4.44E+07	3.69E+07	8.64E+07	4.84E+07	1.7
Procathepsin L	2.64E+07	2.78E+07	5.69E+07	2.80E+07	1.6
Osteomodulin	3.35E+06	2.49E+06	6.47E+06	1.50E+06	1.4
Biglycan	3.76E+07	2.16E+07	5.54E+07	2.24E+07	1.3
Laminin subunit α-5	4.61E+06	4.87E+06	8.36E+06	4.09E+06	1.3
Lysosomal protective protein	2.86E+07	2.41E+07	4.51E+07	2.36E+07	1.3

Рисунок 34 – Сравнение белкового состава кондиционированной среды наивных и обученных астроцитов

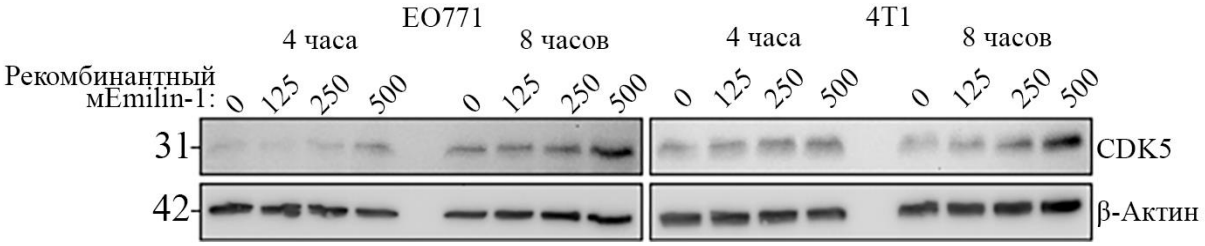


Рисунок 35 – Результаты иммуноблоттинга, отражающие динамику изменения уровня CDK5 в указанных опухолевых клеточных линиях после обработки рекомбинантным белком emilin-1. Дозы указаны в нг.

В заключение по данному блоку работ была выявлена роль и механизм действия CDK5 в подавлении экспрессии MHC-I и уклонении от иммунного ответа при РМЖ-ММ. Было установлено, что комбинация росковитина, таргетирующего CDK5, с ИИКТ более эффективна для лечения мышиных РМЖ-ММ, чем ИИКТ в монотерапии. Полученная терапевтическая стратегия имеет потенциал для клинического внедрения с целью улучшения прогноза у пациентов с метастазами головного мозга.

Комплекс MHC-I играет ключевую роль в иммунном ответе за счет презентации антигенов CD8+ Т-клеткам (Neefjes и др., 2011). На ранних стадиях канцерогенеза раковые клетки имеют разные уровни MHC-I, но опосредованное Т-клетками иммунноредактирование уничтожает клетки с высокой экспрессией комплекса, отбирая клоны с низкой/отсутствующей экспрессией MHC-I, которые известны слабой иммуногенностью (Neefjes и др., 2011) и агрессивным ростом (Yamamoto и др., 2020). В данной работе было показано, что церебральные метастазы могут уклоняться от иммунного распознавания путем подавления MHC-I, в то время как использование росковитина *in vivo* повышало чувствительность церебральных метастазов к ИИКТ. Важно отметить, что в проведенном исследовании использовалась низкая (субцитотоксическая) доза росковитина (7,5 мкМ *in vitro*), в то время как другие работы показали, что более высокие дозы росковитина (20-100 мкМ) способны уничтожать опухоль-инициирующие клетки РМЖ (Mandl и др., 2017), что может обеспечить дополнительную терапевтическую выгоду. Однако росковитин имеет свои ограничения, включая короткий период полувыведения в мозге (Sallam и др., 2008) и частичное ингибирование других CDK (Meijer и др., 1997). Тем не менее, ингибирование других CDK может быть полезным. Например, лечение абемациклибом у пациентов с церебральными метастазами при гормон–рецептор–положительном HER2-отрицательном РМЖ привело к 24% внутричерепной клинической пользе с медианной внутричерепной выживаемостью без прогрессирования 4,9 месяца (Tolaney и др., 2020). Аналогично, палбоциклиб показал клиническую активность у пациентов с

церебральными метастазами различных типов первичных опухолей, демонстрируя 53,3% внутричерепной пользы и медианное время до внутричерепного прогрессирования заболевания 9 недель (Brastianos и др., 2021). Таким образом, вполне вероятно, что комбинация ингибиторов CDK4 и CDK6 с росковитином окажется эффективной стратегией лечения церебральных метастазов. Проведенное исследование показывает, что росковитин в комбинации с ИИКТ более эффективен для контроля церебральных метастазов, чем ИИКТ в монотерапии. Эта терапевтическая стратегия обладает потенциалом для быстрой трансляции в клинику с целью улучшения прогноза пациентов с метастазами в головной мозг.

Особенности качественного и количественного состава микробиома опухолевого микроокружения: популяционное исследование

Опухолевый микробиом присутствует практически при всех видах ЗНО, при этом его наиболее доказанное и клинически значимое влияние наблюдается при КРР, ПАПЖ и РЛ (Ross и др., 2024; Sexton и др., 2022). Состав опухолевого микробиома зависит не столько от особенностей опухоли как таковой, сколько от индивидуальных факторов и особенностей образа жизни, такие как диета (для микробиоты кишечника (Ross и др., 2024) или статус курения (для микробиоты дыхательных путей (Frati и др., 2018). Современные исследования подчеркивают ключевую роль микробиома в регуляции иммунного ответа и прогрессировании ЗНО. Микробные сообщества, локализованные в опухолевых тканях и связанные с ними микробные метаболиты способны воздействовать на течение заболевания, регулируя воспалительные процессы, иммунную толерантность и противоопухолевую активность (Yang и др., 2024). Кроме того, микробиом существенно влияет на иммунный ответ посредством ряда механизмов, включая выработку метаболитов, презентацию микробных антигенов опухолевыми и иммунными клетками, а также регуляцию иммунных контрольных точек, таких как PD-L1 (Richards и др., 2025). Таким образом, микробиом является значимым, но недостаточно изученным компонентом опухолевого микроокружения.

В заключительной главе представлена характеристика таксономического состава микробиоты в образцах мокроты, полученных от здоровых людей (N=107) и больных РЛ (N=190) в российской популяции в зависимости от статуса курения. Образцы мокроты характеризуют состояние нижних дыхательных путей и опосредованно указывают на состав микробиома РЛ.

Целью этой части исследования было установление различий в составе микробиома мокроты в группах сравнения, а также оценка влияния статуса, длительности и интенсивности курения на структуру бактериальных сообществ.

После выделения ДНК из мокроты участников исследования и секвенирования V3–V4 региона гена 16S рРНК было выявлено девять

бактериальных типов (Рис. 36). Преобладающими типами были Firmicutes и Bacteroidetes (около 70% от общего микробиома). Всего было идентифицировано 43 бактериальных рода, среди которых наиболее распространенными были *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* и *Anaerosinus*.

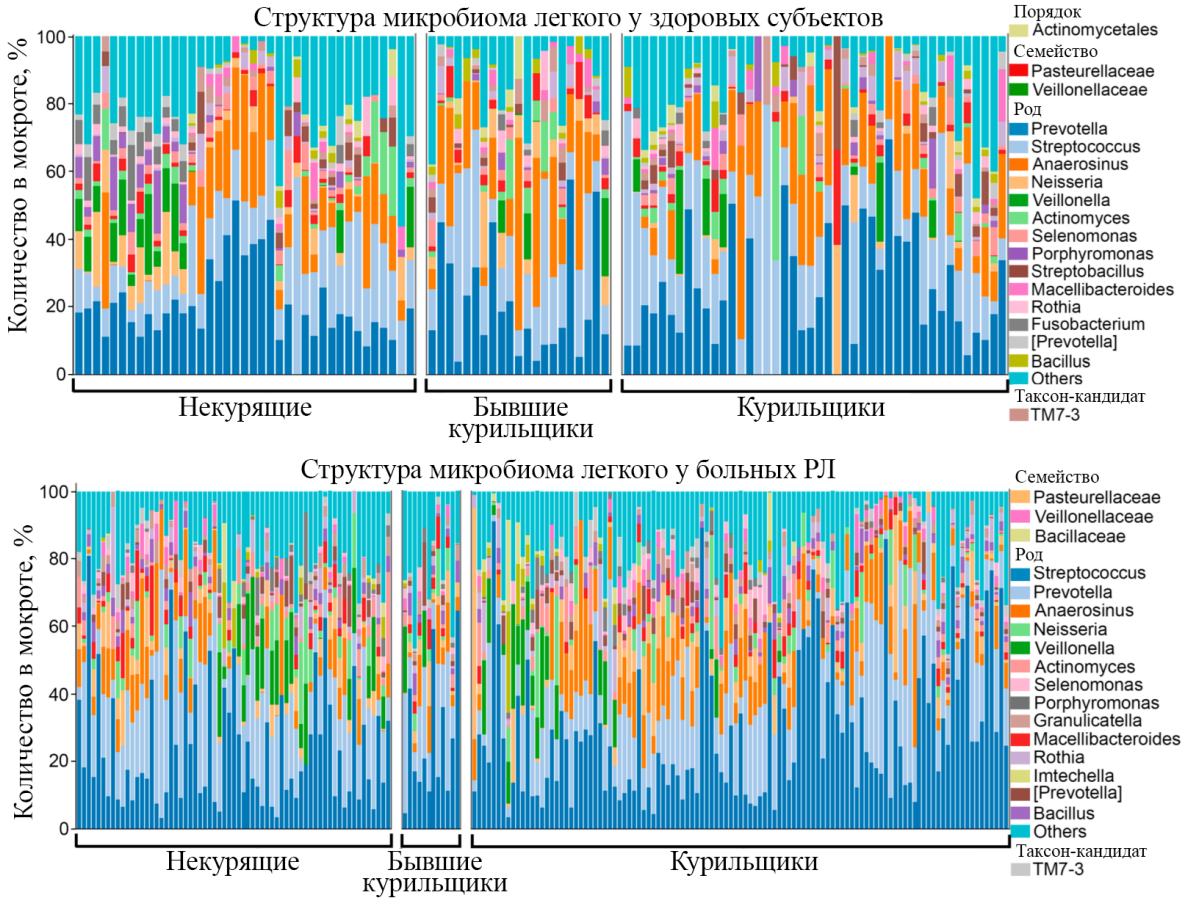


Рисунок 36 – Микробиомные карты, отображающие наиболее распространенные бактериальные семейства и роды, обнаруженные в образцах мокроты здоровых людей (N=107, сверху) и пациентов с РЛ (N=190, снизу) с различным статусом курения

Была проведена оценка разнообразия микробиомных сообществ среди групп. У здоровых лиц статус курения не влиял на альфа-разнообразие (Рис. 37А). У курящих пациентов с РЛ наблюдалось сниженное альфа-разнообразие по сравнению с некурящими и бывшими курильщиками, что предполагает ослабленную микробную экосистему у субъектов, испытывающих респираторный дистресс (Рис. 37А). Значимых различий в бета-разнообразии в зависимости от статуса курения в обеих когортах не выявлено.

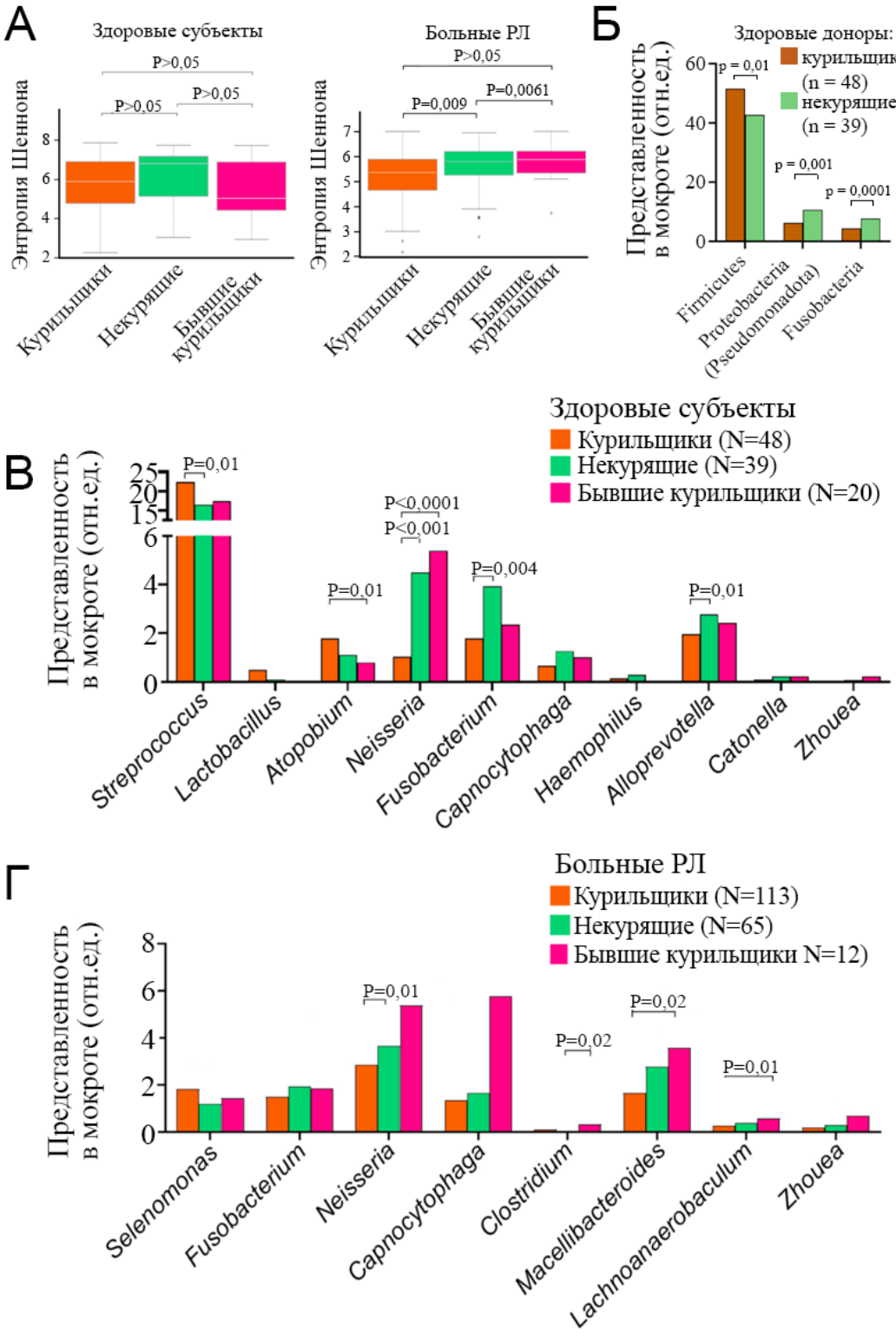


Рисунок 37 – Анализ микробиома мокроты: А – энтропия Шеннона (альфа-разнообразие) бактериальных сообществ в образцах мокроты указанных лиц; Б – Бактериальные типы, достоверно различавшиеся в микробиоме нижних дыхательных путей у указанных лиц; В, Г – ключевые бактериальные роды, различающиеся в группах.

Далее проводили распространенности таксономических единиц в исследуемых группах. Анализ филумов здоровых доноров показал, что типы Proteobacteria и Fusobacteria были достоверно снижены у курильщиков, при этом тип Firmicutes был значимо повышен, в сравнении с некурящими (Рис. 37Б). При

анализе представленности родов было выявлено, что *Streptococcus* был единственным родом, достоверно обогащенным в мокроте здоровых курильщиков (Рис. 37Б).

Микробиом мокроты бывших курильщиков был более схож с таковым у некурящих. Например, численность *Neisseria* у бывших курильщиков (5,39%) была сопоставима с некурящими (4,49%) и достоверно выше, чем у активных курильщиков (Рис. 37В), что указывает на восстановление некоторых автохтонных популяций после отказа от курения.

У пациентов с РЛ микробный состав мокроты был схож между курильщиками и некурящими, за исключением рода *Neisseria*, который был менее распространен среди курильщиков (Рис. 37Г).

Микробиом мокроты бывших курильщиков с РЛ не показал существенных отличий от активно курящих пациентов, за исключением увеличения родов *Macellibacteroides* и *Lachnoanaerobaculum* (Рис. 37Г). Это позволяет предположить, что РЛ оказывает более значительное влияние на состав микробиоты, чем курение, и отказ от курения может быть недостаточным для восстановления микробиома.

III.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги исследования

В настоящем диссертационном исследовании раскрыты молекулярные и иммунологические аспекты влияния опухолевого микроокружения на рост и развитие первичных и метастатических злокачественных новообразований. В частности, установлено, что повышенная экспрессия ряда белков ВКМ, в том числе образующих прогностические сигнатуры генов, ассоциирована с неблагоприятным прогнозом у пациентов с аденокарциномами легкого, желудка, толстой кишки и яичников. Лучевая терапия вызывает ремоделирование ВКМ с усилением продукции его структурных компонентов, при этом химиотерапевтический стресс активирует в опухолевых клетках и фибробластах сигнальные пути, связанные с формированием химиорезистентности. Таргетирование этих путей (YAP1 в опухолевых клетках, COX-2 в фибробластах) повышает эффективность цитостатической терапии. В иммунном компартменте опухоли макрофаги и астроциты способствуют прогрессии ЗНО. Так, макрофаги стимулируют пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток через активацию онкогенных путей (ERK1/2), а астроциты головного мозга индуцируют в метастатических клетках механизмы уклонения от иммунного надзора, включая снижение экспрессии MHC-I через ось emilin-1–CDK5–Irf2bp1. В то же время дендритные клетки могут быть активированы витамином E (повышение CD40, CD86, HLA-DR), что усиливает презентацию антигена и эффективность химио- и иммунотерапии, в том числе у пациентов с меланомой, получающих ингибиторы иммунных контрольных точек. Анализ микробиома нижних дыхательных путей выявил, что состав бактериального сообщества при РЛ существенно отличается от такового у здоровых лиц.

Выводы

1. Проанализирован состав внеклеточного матрикса печеночных метастазов колоректального рака и выявлены белки, чрезмерно представленные в опухоли. Показано, что лучевая терапия вызывает ремоделирование структурных компонентов внеклеточного матрикса, в том числе Cola2, Fbn1 и Bgn;
2. Установлено, что стресс, вызванный химиотерапией изменяет молекулярный фенотип клеток аденокарциномы поджелудочной железы и стромальных фибробластов, активируя сигнальные пути, ассоциированные с химиорезистентностью. Таргетирование ключевых путей (YAP1 в опухолевых клетках и COX-2 в опухоль-ассоциированных фибробластах) повышает чувствительность опухоли к химиотерапии;

3. Выявлен синтез опухолевыми клетками колоректального рака компонентов ламинина-511 (α5, β1, γ1), окружающих микрососудистое русло и способствующих ангиогенезу; экспрессия ламинина-511 и LAMA5 стимулируется опухоль-инфильтрирующими миелоидными клетками путем секреции цитокинов (в т.ч. TNF), а нокдаун LAMA5 в модели метастатического колоректального рака достоверно снижает количество метастатических очагов;
4. Продемонстрировано влияние экспрессии комбинаций генов внеклеточного матрикса на прогноз пациентов с аденокарциномами яичника, желудка, легкого, кишечника;
5. Установлена роль опухоль-ассоциированных макрофагов в активации пролиферации, миграции и инвазии опухолевых клеток колоректального рака через активацию онкогенного пути ERK1/2;
6. Лучевая терапия усиливает инфильтрацию опухоли макрофагами, которые приобретают иммуносупрессивный фенотип. Лечение мышей антителами αM-CSF аподавляет иммуносупрессию, активирует Т-клеточный ответ и замедляет опухолевый рост;
7. Впервые показано повышение экспрессии CD40, CD86 и HLA-DR в дендритных клетках в ответ на стимуляцию витамином Е; применение витамина Е как адъюванта к химио- и иммунотерапии замедляет рост аденокарциномы поджелудочной железы и рака молочной железы in vivo, а у пациентов с меланомой, получающих ингибиторы иммунных контрольных точек, ассоциировано с благоприятным прогнозом;
8. Выявлен механизм «обучения» астроцитов метастатическими клетками рака молочной железы с индукцией emilin-1, повышающего уровень CDK5 в опухолевых клетках; CDK5 фосфорилирует Irf2bp1, подавляя STAT1 и NLRC5, что снижает экспрессию MHC-I, ингибирует CD8+ Т-клеточный ответ и способствует росту церебральных метастазов;
9. Сформированы микробиомные сигнатуры нижних дыхательных путей в норме и при раке легкого с учетом статуса курения.

Рекомендации

1. В клинической практике целесообразно учитывать экспрессию компонентов внеклеточного матрикса (ламинин-511, LAMA5, Cola2, Fbn1, Bgn) и соответствующих генетических сигнатур для прогноза у пациентов с ЗНО.
2. Для повышения эффективности химиотерапии ПАПЖ рекомендуется таргетирование YAP1 в опухолевых клетках и COX-2 в опухоль-ассоциированных фибробластах.
3. Применение витамина Е в качестве адъюванта к химио- и иммунотерапии может улучшить клинический прогноз.

4. После лучевой терапии для преодоления иммуносупрессии, опосредованной макрофагами, перспективно использование антител к M-CSF.
5. Для профилактики церебральных метастазов РМЖ рекомендовано блокирование оси emilin-1–CDK5–Irf2bp1, восстанавливающее экспрессию MHC-I.
6. Учет микробиомных сигнатур нижних дыхательных путей может быть полезен для диагностики и оценки риска рака легкого.

Перспективы разработки темы

1. Дальнейшие испытания низкомолекулярных ингибиторов и моноклональных антител, нацеленных на выявленные проопухолевые компоненты микроокружения (YAP1, COX-2, CDK5, emilin-1, M-CSF, ламинин-511, FGF-2).
2. Изучение комбинированного воздействия на разные компартменты опухолевого микроокружения (ВКМ, иммунные клетки, микробиом) для повышения эффективности терапии.
3. Расшифровка механизмов взаимодействия опухоли с астроцитами и другими клетками микроокружения для разработки новых терапевтических стратегий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук

1. Lim S.Y., **Yuzhalin A.E.**, Gordon-Weeks A.N., Muschel R.J. Tumor-infiltrating monocytes/macrophages promote tumor invasion and migration by upregulating S100A8 and S100A9 expression in cancer cells // Oncogene. — 2016. — Vol. 35, № 44. — pp. 5735–5745. EDN: XYVSXZ. Импакт-фактор 9,1 (JIF). 0,31 из 1,27 п.л.*
2. Gordon-Weeks A.N., Lim S.Y., **Yuzhalin A.E.**, Jones K., Markelc B., Kim K.J., Buzzelli J.N., Fokas E., Cao Y., Smart S., Muschel R. Neutrophils promote hepatic metastasis growth through fibroblast growth factor 2-dependent angiogenesis in mice // Hepatology. — 2017. — Vol. 65, № 6. — pp. 1920–1935. EDN: FBSMJQ. Импакт-фактор 18,0 (JIF). 0,16 из 1,84 п.л.
3. **Yuzhalin A.E.**, Lim S.Y., Kutikhin A.G., Gordon-Weeks A.N. Dynamic matrisome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Reviews on Cancer. — 2018. — Vol. 1870, № 2. — pp. 207–228. EDN: WLWBHZ. Импакт-фактор 11,2 (JIF). 1,27 из 2,54 п.л.
4. **Yuzhalin A.E.**, Lim S.Y., Gordon-Weeks A.N., Fischer R., Kessler B.M., Yu D., Muschel R.J. Proteomics analysis of the matrisome from MC38 experimental mouse liver metastases // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. — 2019. — Vol. 317, № 5. — pp. G625–G639. EDN: MLZZAH. Импакт-фактор 3,0 (JIF). 0,49 из 1,73 п.л.
5. Gordon-Weeks A., Lim S.Y., **Yuzhalin A.E.**, Lucotti S., Vermeer J.A.F., Jones K., Chen J., Muschel R.J. Tumour-Derived Laminin α5 (LAMA5) Promotes Colorectal Liver Metastasis Growth, Branching Angiogenesis and Notch Pathway Inhibition // Cancers. — 2019. — Vol. 11, № 5. — P. 630. EDN: XXZCZO. Импакт-фактор 4,8 (JIF). 0,25 из 2,07 п.л.
6. **Yuzhalin A.E.**, Yu D. Brain Metastasis Organotropism // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. — 2020. — Vol. 10, № 5. — P. a037242. EDN: PSYYDD. Импакт-фактор 4,9 (JIF). 0,92 из 1,84 п.л.
7. Saito Y., Xiao Y., Yao J., Li Y., Liu W., **Yuzhalin A.E.**, Shyu Y.M., Li H., Yuan X., Li P., Zhang Q., Li Z., Wei Y., Yin X., Zhao J., Kariminia S.M., Wu Y.C., Wang J., Yang J., Xia W., Sun Y., Jho E.H., Chiao P.J., Hwang R.F., Ying H., Wang H., Zhao Z., Maitra A., Hung M.C., DePinho R.A., Yu D. Targeting a chemo-induced adaptive signaling circuit confers therapeutic vulnerabilities in pancreatic cancer // Cell Discovery. — 2024. — Vol. 10, № 1. — P. 109. EDN: KINRUD. Импакт-фактор 16,9 (JIF). 0,07 из 2,31 п.л.

8. **Yuzhalin A.E.**, Urbonas T., Silva M.A., Muschel R.J., Gordon-Weeks A.N. A core matisome gene signature predicts cancer outcome // British Journal of Cancer. — 2018. — Vol. 118, № 3. — pp. 435–440. EDN: KXRCXU. Импакт-фактор 7,8 (JIF). 0,27 из 0,69 п.л.
9. Jones K.I., Tiersma J., **Yuzhalin A.E.**, Gordon-Weeks A.N., Buzzelli J., Im J.H., Muschel R.J. Radiation combined with macrophage depletion promotes adaptive immunity and potentiates checkpoint blockade // EMBO Molecular Medicine. — 2018. — Vol. 10, № 12. — P. e9342. EDN: MVRJLK. Импакт-фактор 7,9 (JIF). 0,26 из 1,84 п.л.
10. Yuan X., Duan Y., Xiao Y., Sun K., Qi Y., Zhang Y., Ahmed Z., Moiani D., Yao J., Li H., Zhang L., **Yuzhalin A.E.**, Li P., Zhang C., Badu-Nkansah A., Saito Y., Liu X., Kuo W.L., Ying H., Sun S.C., Chang J.C., Tainer J.A., Yu D. Vitamin E Enhances Cancer Immunotherapy by Reinvigorating Dendritic Cells via Targeting Checkpoint SHP1 // Cancer Discovery. — 2022. — Vol. 12, № 7. — pp. 1742–1759. EDN: CLNOUJ. Импакт-фактор 29,5 (JIF). 0,09 из 2,07 п.л.
11. **Yuzhalin A.E.** Parallels between the extracellular matrix roles in developmental biology and cancer biology // Seminars in Cell & Developmental Biology. — 2022. — Vol. 128. — pp. 90–102. EDN: XAIHXW. Импакт-фактор 6,7 (JIF).
12. **Yuzhalin A.E.**, Yu D. Critical functions of extracellular matrix in brain metastasis seeding // Cellular and Molecular Life Sciences. — 2023. — Vol. 80, № 10. — P. 297. EDN: QPFCKM. Импакт-фактор 6,5 (JIF). 0,75 из 1,50 п.л.
13. **Yuzhalin A.E.**, Lowery F.J., Saito Y., Yuan X., Yao J., Duan Y., Ding J., Acharya S., Zhang C., Fajardo A., Chen H.N., Wei Y., Sun Y., Zhang L., Xiao Y., Li P., Lorenzi P.L., Huse J.T., Fan H., Zhao Z., Hung M.C., Yu D. Astrocyte-induced Cdk5 expedites breast cancer brain metastasis by suppressing MHC-I expression to evade immune recognition // Nature Cell Biology. — 2024. — Vol. 26, № 10. — pp. 1773–1789. EDN: YOWNLT. Импакт-фактор 22,7 (JIF). 0,17 из 1,96 п.л.
14. Druzhinin V.G., Baranova E.D., Demenkov P.S., Matskova L.V., Larionov A.V., **Yuzhalin A.E**. Lower Respiratory Tract Microbiome Signatures of Health and Lung Cancer Across Different Smoking Statuses // Cancers. — 2025. — Vol. 17, № 16. — P. 2643. EDN: CWIHTQ. Импакт-фактор 4,8 (JIF). 0,73 из 2,19 п.л.
15. Арсентьев К.А., Кузьмин Д.А., **Южалин А.Е**. Изучение влияния фосфорилирования STAT1 в позиции Ser727 на инфильтрацию CD8+ Т-клеток в опухоли центральной нервной системы // Медицинская иммунология. — 2026. — Т. 28, № 3. — С. 545–556. DOI: 10.15789/1563-0625-IOS-3378. Импакт-фактор 0,48 (РИНЦ). 0,92 из 1,39 п.л.
16. Илюшин Д.Р., Шардина К.Ю., Арсентьев К.А., **Южалин А.Е.** Анализ эффекта нокдауна cdk5 на цитотоксический потенциал Т-клеточных субпопуляций //

Медицинская иммунология. — 2026. — Т. 28, № 3. — С. 509–522. DOI: 10.15789/1563-0625-EOC-3381. Импакт-фактор 0,48 (РИНЦ). 0,82 из 1,62 п.л.

17. Druzhinin V.G., Baranova E.D., Demenkov P.S., Matskova L.V., Larionov A.V., Zhivotovskiy A.S., **Yuzhalin A.E**. Bacterial effectors disrupt host DNA: Linking sputum microbiome profiles to chromosomal aberrations in leukocytes of lung cancer patients and healthy controls // Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. — 2026. — Vol. 911. — P. 503928. EDN: HXHWCK. Импакт-фактор 2,8 (JIF). 0,36 из 1,27 п.л.
18. **Южалин А.Е.**, Арсентьев К.А., Савицкий С.А. Уровни экспрессии ламинина α5 и маркера эндотелия CD146 в опухолевых тканях у пациентов с колоректальным раком // Успехи молекулярной онкологии. — 2026. — Т. 13, № 2. — С. 94–101. EDN: SDOQMF. Импакт-фактор 0,55 (РИНЦ). 0,61 из 0,92 п.л.
19. Derzhavina V.M., Khalymbadzha I.A., **Yuzhalin A.E**. A patent review of cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) inhibitors (1999-2025) // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. — 2026. — Vol. 14. — P. 1843047. DOI: 10.3389/fbioe.2026.1843047. Импакт-фактор 5,8 (JIF). 1,15 из 1,73 п.л.
20. Amikishiev S.V., Kuzmina D.O., **Yuzhalin A.E.** Remodeling of colorectal cancer extracellular matrix after radiotherapy // Biochemistry (Moscow). — 2026. — Vol. 91. №7 — pp. 1216–1229. EDN: GDSLWQ. Импакт-фактор 2,1 (JIF). 1,07 из 1,61 п.л.
21. Druzhinin V.G., Baranova E.D., Demenkov P.S., Zhivotovskiy A.S., Matskova L.V., Larionov A.V., Avdeev K.S., **Yuzhalin A.E**. Features of the Intestinal and Respiratory Microbiome in Colorectal Cancer Patients in Western Siberia // Microorganisms. — 2026. — Vol. 14, № 7. — P. 1392. EDN: RTXMSK. Импакт-фактор 4,7 (JIF). 0,46 из 1,84 п.л.

Прочие публикации

22. **Южалин А.Е.**, Мушел Р.Ж. Сравнение белкового состава экстрацеллюлярного матрикса печеночных метастазов колоректального рака и нормальных тканей печени // Фундаментальная и клиническая медицина. — 2018. — Т. 3, № 1. — С. 16–21. EDN: YVFNVY. Импакт-фактор 0,81 (РИНЦ). 0,60 из 0,69 п.л.

* - объем в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ARG-1 – Аргиназа-1
ВКМ – внеклеточный матрикс
ЗНО – злокачественные новообразования
ИИКТ – ингибиторы иммунных контрольных точек
КРР – колоректальный рак
M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор
МСК – миелоидные супрессорные клетки
МЯ – микроядра
ОР – относительный риск
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПАПЖ – протоковая аденокарцинома поджелудочной железы
ПРIX – протопорфирин IX
РЛ – рак легкого
РМЖ – рак молочной железы
РМЖ-ММ – метастазы рака молочной железы в головной мозг
УЗ – ультразвук
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ХА – хромосомные аберрации
ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
Цел – целекоксиб
ЦНС – центральная нервная система
CD – кластеры дифференцировки
CDK – циклин-зависимая киназа
CDK5 – циклин-зависимая киназа 5
COL –коллаген
COX-2 – циклооксигеназа-2
CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами
DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол
ДИ – доверительный интервал
ДМСО – диметилсульфоксид
ERK1/2 – киназы, регулируемые внеклеточными сигналами
FDR – уровень ложных открытий
FGF-2 – фактор роста фибробластов 2
GEO – Gene Expression Omnibus (база данных)
GFP – зеленый флуоресцентный белок
GZMB – гранзим B

HLA-DR – человеческий лейкоцитарный антиген
IFN-γ – интерферон гамма
IL – интерлейкин
Irf2bp1 – интерферон-регуляторный фактор 2-связывающий белок 1
LAMA5 –альфа-5 цепь ламинина
LEfSe – линейный дискриминантный анализ размеров эффекта
MHC-I – главный комплекс гистосовместимости I класса
NK-клетки – естественные киллеры
NLRC5 – NLR семейство, CARD домен содержащий 5
PD-1/PD-L1 – белок программируемой клеточной смерти 1 / его лиганд 1
RPPA – обратный фазовый протеиновый массив
SCID – тяжелый комбинированный иммунодефицит
scRNA-seq – секвенирование РНК единичных клеток
SPP1 – секретируемый фосфопротеин 1
STAT1 – сигнальный белок и активатор транскрипции 1
TNF – фактор некроза опухоли
UMAP – равномерная аппроксимация и проекция многообразий
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
YAP1 – Yes-ассоциированный белок 1