

АВТОНОМНАЯ НЕКОММЕРЧЕСКАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ «НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «СИРИУС»

На правах рукописи

Южалин Арсений Евгеньевич

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

3.2.7. Иммунология

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Сириус – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 РОЛЬ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО ТАРГЕТИРОВАНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	18
1.1. ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ – НЕРЕШЕННАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА	18
1.1.1. Причины стагнирующего прогресса в лечении злокачественных новообразований в мире и возможные пути решения	18
1.1.2. Необходимость ускоренного развития фундаментальной и клинической онкологии в России	26
1.2. МЕТАСТАЗЫ – ОСНОВНАЯ ПРИЧИНА СМЕРТНОСТИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ	27
1.3. МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ ПЕРВИЧНЫХ И МЕТАСТАТИЧЕСКИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ.....	30
1.3.1. Общая характеристика опухолевого микроокружения.....	30
1.3.2. Внеклеточный компонент опухолевого микроокружения (экстрацеллюлярный матрикс)	32
1.3.3. Неиммунные резидентные клетки опухолевого микроокружения – миофибробласты печени.....	35
1.3.4. Неиммунные резидентные клетки опухолевого микроокружения – астроциты головного мозга	38
1.3.5. Опухолевое иммунное микроокружение.....	40
1.3.6. Влияние внеклеточного матрикса на клетки иммунного микроокружения опухоли ...	42
1.4. ВЛИЯНИЕ МИКРОБИОМА ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ НА ФОРМИРОВАНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ВНЕКЛЕТОЧНЫМ МАТРИКСОМ	45
1.5. ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО НАЦЕЛИВАНИЯ НА ОПУХОЛЕВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ПРОГНОЗА ПАЦИЕНТОВ С ЗНО	49
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.1. Объекты, материалы, дизайн и общая методология исследования	50
2.2. Клеточные линии	51
2.3 Характеристика лабораторных животных.....	53

2.4 Мышиные модели ЗНО	53
2.5. Обогащение внеклеточного матрикса и масс-спектрометрия.....	55
2.6 Окрашивание белков нитратом серебра	59
2.7 Иммунофлуоресценция и иммуногистохимия.....	60
2.8 Иммуноблоттинг	60
2.9 Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени	61
2.10 Молекулярное клонирование.....	61
2.11 Анализ киназной активности <i>in vitro</i>	62
2.12 Секвенирование РНК единичных клеток	63
2.13 Эксперименты с первичными астроцитами	65
2.14 Популяционное исследование состава микробиома у пациентов с РЛ.....	65
2.15 Сбор образцов мокроты	66
2.16 Выделение ДНК, подготовка библиотек и секвенирование	67
2.17 Таксономический анализ по результатам секвенирования	67
2.18 Клиническое исследование влияния витамина Е на выживаемость больных с меланомой	68
2.19 Манипуляции с миелоидными клетками.....	69
2.20 Экспериментальные терапевтические агенты.....	70
2.21 Биоинформатический анализ.....	71
2.22 Статистический анализ.....	73
ГЛАВА 3 КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПРИ ЗНО: РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ, ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ	73
3.1 Разработка методики обогащения внеклеточного матрикса опухоли для сравнительного протеомного анализа	74
3.2 Оценка воздействия лучевой терапии на процессы ремоделирования внеклеточного матрикса методом протеомного анализа	77
3.3 Терапевтическое нацеливание на сигнальные пути активированных фибробластов при ЗНО	80
3.4 Анализ вклада белков внеклеточного матрикса опухолевого происхождения в прогрессию ЗНО.....	89
3.5 Определение ключевых генов внеклеточного матрикса для прогноза течения солидных ЗНО.....	95

ГЛАВА 4 КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ: ПОИСК МИШЕНЕЙ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА	103
4.1 Оценка инфильтрации опухоли иммунными клетками после лучевой терапии, с выявлением ключевой роли макрофагов в развитии иммуносупрессии.....	103
4.2 Оценка роли моноцитов/макрофагов опухолевого в пролиферации, миграции и инвазии раковых клеток.....	110
4.3 Разработка метода стимуляции дендритных клеток с целью повышения эффективности ингибиторов контрольных точек.....	115
4.4 Нейтрофилы опухолевого микроокружения как фактор активации ангиогенеза солидных ЗНО.....	122
4.5 Подавление экспрессии МНС-I опухолевыми клетками посредством взаимодействия с нормальными клетками опухолевого микроокружения, для уклонения от антигенспецифичного Т-клеточного ответа.....	131
ГЛАВА 5 ОСОБЕННОСТИ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА МИКРОБИОМА ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ: ПОПУЛЯЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	152
5.1 Изучение микробиома нижних дыхательных путей у больных раком легкого и здоровых субъектов в зависимости от статуса курения.....	151
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	165
ВЫВОДЫ	180
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	182
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	185

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования (ЗНО) остаются значимой медицинской проблемой в России и мире. Заболеваемость ЗНО находится на пике 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 случаев 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) [1]. При этом многие нозологии остаются крайне трудно поддающимися лечению, такие как, например, протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПАПЖ), при которой 5-летняя выживаемость не превышает 10% даже при использовании самых передовых схем лечения [2].

Метастазы являются серьезным осложнением течения заболевания и являются причиной летального исхода у более чем 90% онкологических больных [3]. Поскольку возможности лечения метастатических очагов в отдаленных органах крайне ограничены, необходимы дополнительные исследования фундаментальных основ развития и прогрессирования ЗНО для разработки инновационных видов терапевтических вмешательств. Нацеливание на компоненты опухолевого микроокружения представляется перспективным направлением таких исследований, так как разработки в этом направлении уже показали эффективность. Например, применение ингибитора фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) бевацизумаба улучшило показатели общей выживаемости больных с метастатическим КРР за счет снижения ангиогенеза опухоли [4]. Раскрытие молекулярных и иммунологических механизмов модулирующего действия опухолевого микроокружения на прогрессию ЗНО может способствовать развитию и внедрению новых методов лечения и улучшить прогноз и качество жизни онкологических больных.

Степень разработанности темы исследования

ЗНО остаются значимой причиной смертности и инвалидизации населения, несмотря на улучшение ранней диагностики, оптимизацию существующих схем лечения, снижения объемов курения табака, а также разработки инновационных терапевтических подходов, например, ингибиторов иммунных контрольных точек (ИИКТ) [5]. В последние годы опухолевое микроокружение признается одним из основных факторов, ограничивающих эффективность многих стратегий лечения ЗНО.

Микроокружение солидной опухоли состоит из множества структурных и функциональных компонентов, включая иммунные клетки (такие как лимфоциты и макрофаги), фибробласты, кровеносные сосуды, внеклеточный матрикс (ВКМ), а также различные сигнальные молекулы – факторы роста, хемокины, цитокины. Взаимодействие злокачественных

клеток с остальными элементами микроокружения формирует динамичную среду, которая вносит определяющий вклад в прогрессирование заболевания. Клетки микроокружения нередко поддерживают опухолевый рост на всех стадиях канцерогенеза, способствуя пролиферации и инвазии злокачественных клеток [6]. В то же время некоторые элементы микроокружения могут оказывать ингибирующее влияние на рост и развитие рака. Ключевые компоненты опухолевого микроокружения включают:

а) эндотелиальные клетки, формирующие сосудистую сеть и защищающие опухолевые клетки от иммунного надзора. Сосуды, ассоциированные с опухолью, образуются либо путем разрастания существующих сосудов, либо из клеток-предшественников, обеспечивая опухоль питательными веществами;

б) иммунные клетки (гранулоциты, лимфоциты, миелоидные клетки), участвующие в воспалительных и иммунных реакциях. Среди них наиболее многочисленными являются опухоль-ассоциированные макрофаги, выполняющие разнообразные проопухолевые функции, включая содействие инвазии, подавление противоопухолевого иммунитета и содействие формированию метастазов;

в) фибробласты и другие мезенхимальные клетки, которые депонируют ВКМ, облегчают перемещение опухолевых клеток в кровоток и способствуют ангиогенезу за счет создания структурной основы для эндотелия новых сосудов;

г) белки ВКМ и его небелковые компоненты, такие как гиалуроновая кислота, формируют соединительнотканную оболочку вокруг опухоли, которая образует десмопластическую строму, чаще всего способствующую опухолевому росту и инвазии.

Роль ВКМ в развитии ЗНО активно изучается ведущими мировыми лабораториями. ВКМ представляет собой взаимосвязанную сеть макромолекул — гликопротеинов, коллагенов и ферментов, обеспечивающих механическую поддержку тканей. Его динамическая структура регулирует адгезию, пролиферацию и межклеточные коммуникации. В ВКМ локализованы факторы роста и интегрины, посредством которых клетки взаимодействуют со своим микроокружением. Изменение физико-химических свойств и топографии матрикса направляет миграцию опухолевых клеток; траектория и скорость движения определяются градиентами адгезии и плотности ВКМ.

Современные исследования показывают, что опухолевое микроокружение представляет собой смесь злокачественных клеток, а также кроветворных, мезенхимных и внеклеточных элементов, формирующих опухолевую гетерогенность [7]. Микроокружение опухоли функционирует как постоянно изменяющаяся система, в которой клетки и внеклеточные компоненты действуют в реципрокном взаимодействии, тем самым поддерживая опухолевый

процесс. Опухоли поддерживают тесную связь с местной средой и отдаленными органами через сосудистые и лимфатические каналы, влияя на них посредством паракринных сигналов, стимулирующих ангиогенез и иммунную толерантность.

Микроокружение опухоли рассматривается как структурно и функционально неоднородная часть солидных опухолей. Расшифровка клеточных и молекулярных взаимодействий в рамках этой системы 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.

В последние годы в исследованиях биологии рака особое внимание уделяется ВКМ. Эта структура состоит из воды, фибриллярных белков, протеогликанов и гликопротеинов, при этом состав ВКМ подвержен постоянному ремоделированию под действием протеиназ и их ингибиторов. ВКМ служит направляющей структурой для клеточной миграции и пролиферации, а градиенты плотности ВКМ влияют на движение клеток. ВКМ выступает резервуаром трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- β), ключевого регулятора роста, заживления и иммунного ответа [8]. При опухолевом росте сигнальные пути TGF- β часто нарушены [9], а опухолевые клетки используют этот фактор для ухода от иммунного надзора и активации стромальных клеток, таких как миофибробласты.

Биомеханические свойства ВКМ опосредуют сигналы интегринов, влияя на пути, связанные с процессами эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) и регуляцией пролиферации. Нарушение экспрессии отдельных субъединиц интегринов способствует метастатическому поведению опухоли [10].

Микроокружение опухоли также формируется за счет взаимодействия опухолевых и иммунных клеток, влияющих на исход терапии. Ключевые звенья противоопухолевого ответа – цитотоксические CD8⁺ Т-клетки [11] и Th1-хелперы, однако другие субпопуляции Т-лимфоцитов (Th2, Th17, Treg) [12] могут, напротив, усиливать иммуносупрессию. Высокое содержание FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток в микроокружении опухоли часто ассоциируется с неблагоприятным прогнозом [13].

Роль В-лимфоцитов, NK- и NKT-клеток в микроокружении опухоли остается предметом активного изучения. Эти клетки могут регулировать выживаемость злокачественных клеток, а также ответ на лечение, а их модуляция может нарушить иммунный контроль опухоли.

Опухоль-ассоциированные макрофаги, дендритные клетки [14] и опухоль-ассоциированные фибробласты [15] усиливают инвазию и метастазирование, способствуют ремоделированию ВКМ и выработке провоспалительных цитокинов.

Кроме того, в последние годы все больше внимания уделяется роли микробиоты в формировании опухолевого микроокружения. Микроорганизмы (МО), обитающие в полостях и тканях организма, продуцируют метаболиты, влияющие на развитие опухоли и эффективность иммунотерапии. Широкомасштабные популяционные исследования показали, что микробиом метастатических ЗНО сформирован преимущественно анаэробными бактериями, в особенности в опухолях с высоким уровнем гипоксии [16]. Некоторые роды бактерий, например *Fusobacterium*, ассоциированы с резистентностью к иммунотерапии РЛ [16]. Трансплантация фекальной микробиоты у больных с метастатической меланомой, невосприимчивых к ИИКТ, приводила к усилению противоопухолевого иммунного ответа и полной ремиссии у некоторых пациентов [17]. Однако многие аспекты влияния опухолевой микробиоты на прогрессирование заболевания остаются недостаточно изученными и требуют дополнительных исследований.

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 ($\alpha 5$, $\beta 1$ и $\gamma 1$). Эти белки окружают микрососудистое русло опухоли, что указывает на их роль в развитии ангиогенеза. Высокий уровень ламинина-511 и LAMA5 обусловлен влиянием опухолевыми инфильтрирующими миелоидных клеток, которые секретируют ряд цитокинов, включая TNF, который индуцирует повышение экспрессии LAMA5 в раковых клетках. Кроме того, нокаунт гена LAMA5 в экспериментальной модели метастатического КРР достоверно снижает количество опухолевых очагов. Эти результаты согласуются с независимыми исследованиями.

Продemonстрировано, 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 α M-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

В работе были использованы самые современные методы исследования. Эксперименты *in vitro* проводили с использованием опухолевых клеточных линий (человеческие, мышинные), а также первичных мышинных астроцитов, моноцитарных дендритных клеток, гранулоцитов, моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, Т-клеток и фибробластов. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ в среде Roswell Park Memorial Institute-1640 или Dulbecco's Modified Eagle Medium, с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 100 МЕ/мл пенициллина-стрептомицина.

Для проведения экспериментов были использованы наиболее актуальные сингенные и ксеногенные животные модели опухолевых заболеваний. Постановку моделей *in vivo* проводили путем инъекций опухолевых клеток: интрапанкреатическая инъекция, интраселезеночная инъекция, подкожная инъекция, интракаротидная инъекция и инъекция в молочную жировую прослойку. Все манипуляции с животными были выполнены в соответствии с протоколами, одобренными этическими комитетами Оксфордского университета и Онкологического центра им. М.Д. Андерсона. Для анализа динамики роста опухоли были использованы системы прижизненной визуализации IVIS Perkin Elmer, или измерение подкожных опухолей штангенциркулем. Оценку размера опухоли *post mortem* проводили одним из следующих способов: 1) взвешиванием пораженного органа, 2) визуальным подсчетом метастатических очагов, 3) измерением площади опухолевой ткани по результатам гистологического анализа с окрашиванием гематоксилин-эозином (ГЭ). Гамма-облучение опухолей *in vivo* проводили на аппарате Gulmay 320.

Фракцию ВКМ метастазов печени выделяли с использованием оригинальной методики, сочетающей децеллюляризацию ткани и биохимическое обогащение. Масс-спектрометрию белков ВКМ проводили на системе Acquity LC (колонка C18, 75 мкм × 250 мм, размер частиц 1,7

мкм; Nanoacquity Waters), сопряженной с масс-спектрометром Thermo LTQ Orbitrap Elite. Фосфорилированные пептиды обогащали с помощью набора Thermo High-Select™ TiO2 Phosphopeptide Enrichment Kit. Масс-спектрометрию фосфорилированных пептидов проводили на системе Dionex UltiMate 3000 Binary RSLCnano System, сопряженной с масс-спектрометром Thermo Orbitrap Fusion™ Tribrid™. Секвенирование гипервариабельного региона V3–V4 гена 16S pPHK проводили на системе Illumina MiSeq. Секвенирование РНК единичных клеток также как и bulk-секвенирование РНК проводили на системе Illumina NextSeq 550 System.

Уровни белков в клетках и тканях определяли методом иммуноблоттинга в системе Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell. Уровни генной экспрессии в клетках и тканях определяли методом количественной ПЦР в реальном времени на приборе Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR System. Экспрессию поверхностных маркеров в клетках или тканях проводили методом проточной цитофлуориметрии на приборе BD FACSanto II. Визуализацию белков или клеточных маркеров в тканях опухолей осуществляли методом конфокальной микроскопии или методом иммуногистохимии. Количественный анализ изображений проводили в программе ImageJ (National Institutes of Health). Для окрашивания белков в акриламидном геле использовали нитрат серебра. Для киназного анализа проводили радиоактивный *in vitro* тест с использованием γ -³²P-АТФ. Для оценки белок-белковых взаимодействий использовали метод иммунопреципитации.

Жизнеспособность клеток анализировали с помощью реагента WST-1. Инвазию и миграцию клеток анализировали в камере Бойдена с помощью вставок с различным диаметром пор. Активацию сигнальных путей оценивали с помощью набора PathScan Intracellular Signaling Array либо с помощью анализа методом обратного фазового протеинового массива. Для исследования гипоксии использовали нитроимидазольное соединение EF5.

Для ретроспективного исследования больных меланомой исследовали медицинские карты пациентов Онкологического центра им. М.Д. Андерсона за 2016-2019 гг. Исследование микробного состава мокроты проводили среди больных РЛ, получавших лечение в Кемеровском областном онкологическом диспансере. Образцы опухолевых тканей от пациентов были получены из архивных коллекций Онкологического центра им. М.Д. Андерсона и John Radcliffe Hospital после получения разрешения всех локальных этических комитетов на проведение гистологических исследований.

Биоинформатические анализы проводились с использованием наборов данных, полученных из системы Gene Expression Omnibus, а также набора TCGA, в пакете R.

Все результаты, описанные в работе, воспроизводимы в независимых экспериментах и подкреплены соответствующим статистическим анализом. Примененные методы обеспечили комплексное решение поставленных задач с разных ракурсов: от *in vitro* исследований на

клеточных культурах до *in vivo* на животных моделях и *ex vivo* на клинических образцах пациентов.

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 ($\alpha 5$, $\beta 1$ и $\gamma 1$). 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 α M-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 МНС-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 клинико-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 ежегодном собрании American Association for Cancer Research Annual Meeting (14-18 апреля 2018 года, Chicago, USA), Конгрессе ASGBI International Surgical Congress (9-11 мая 2018 года, Ливерпуль, Англия), Виртуальном ежегодном собрании American Association for Cancer Research Annual Meeting (24-29 апреля 2020 года, San Diego, USA), Симпозиуме PCCSM Summer Research Symposium (6 августа 2021 года, Houston, USA), Ежегодном собрании American Association for Cancer Research Annual Meeting (8-13 апреля 2022 года, New Orleans, USA), Саммите UT Austin and MD Anderson Collaborative Research Summit (2 ноября 2022 года, Austin, USA), Ежеженедельном институтском форуме Research Town Hall в Онкологическом центре им. М.Д. Андерсона (21 февраля 2025 года, Houston, USA), Семинаре Отдела функционирования живых систем Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (5 ноября 2024 года, Москва), Форуме генетических технологий «Сириус.ТехноГенетика.2025» (10-14 ноября 2025 года, пгт. Сириус), V Конгрессе молодых ученых (26-28 ноября 2025 года,

пгт. Сириус), Научной школе-конференции «молекулярные аспекты биомедицины» (12-13 декабря 2025 года, пгт. Сириус), Семинарах Центра высокоточных генетических технологий для медицины Национального медицинского исследовательского центра гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации (17 марта и 13 мая 2026 года, г. Москва).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 18 оригинальных статей и 4 аналитических литературных обзора в журналах, состоящих в научной базе Scopus и платформе Web of Science, а также рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени доктора 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. — V. 35, No 44. — PP. 5735–5745.
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. — V. 65, No 6. — PP. 1920–1935.
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. — V. 1870, No 2. — PP. 207–228.
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. — V. 317, No 5. — PP. G625–G639.
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 $\alpha 5$ (LAMA5) Promotes Colorectal Liver Metastasis Growth, Branching Angiogenesis and Notch Pathway Inhibition // *Cancers*. — 2019. — V. 11, No 5. — Art. No. 630.
6. **Yuzhalin A.E.**, Yu D. Brain Metastasis Organotropism // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. — 2020. — V. 10, No 5. — Art. No. a037242.
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. — V. 10, No 1. — Art. No. 109.
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. — V. 118, No 3. — PP. 435–440.
 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. — V. 10, No 12. — Art. No. e9342.
 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. — V. 12, No 7. — PP. 1742–1759.
 11. **Yuzhalin A.E.** Parallels between the extracellular matrix roles in developmental biology and cancer biology // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. — 2022. — V. 128. — PP. 90–102.
 12. **Yuzhalin A.E.**, Yu D. Critical functions of extracellular matrix in brain metastasis seeding // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2023. — V. 80, No 10. — Art. No. 297.
 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. — V. 26, No 10. — PP. 1773–1789.
 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. — V. 17, No 16. — Art. No. 2643.
 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.
 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.
 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. — V. 911. — Art. No. 503928.
18. **Южалин А.Е.**, Арсентьев К.А., Савицкий С.А. Уровни экспрессии ламинина $\alpha 5$ и маркера эндотелия CD146 в опухолевых тканях у пациентов с колоректальным раком // Успехи молекулярной онкологии. — 2026. — Т. 13, № 2. — С. 94–101.
 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. — V. 14. — Art. No. 1843047.
 20. Amikishiev S.V., Kuzmina D.O., **Yuzhalin A.E.** Remodeling of colorectal cancer extracellular matrix after radiotherapy // Biochemistry (Moscow). — 2026. — V. 91. №7 — PP. 1216–1229.
 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. — V. 14, No 7. — Art. No. 1392.
 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.

Личный вклад

Оптимизация протоколов масс-спектрометрии, децеллюляризации тканей, биохимического обогащения, проведение масс-спектрометрических исследований образцов метастазов печени, и последующий биоинформатический анализ (разделы 3.1, 3.2), проводились в сотрудничестве с профессором Benedikt Kessler (Target Discovery Institute, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford) и его группой специалистов по масс-спектрометрии (Rebecca Konietzny, Roman Fischer). В этом разделе личный вклад автора заключался в постановке животных моделей ЗНО, пробоподготовке (децеллюляризация, биохимическое обогащение), анализе протеомных данных, написанию и редактированию рукописи.

Исследования терапевтического нацеливания на сигнальные пути активированных фибробластов при ЗНО (раздел 3.3) проводились в сотрудничестве с Онкологическим Центром им. М.Д. Андерсона под руководством профессора Dihua Yu, и сотрудников ее лаборатории, включая Yohei Saito, Yi Xiao, Jun Yao, Yunhai Li и других. В этом разделе личный вклад автора заключался в разработке дизайна исследования, проведению *in vitro* и *in vivo* экспериментов, анализу данных, обсуждению результатов, написанию и редактированию рукописи.

Биоинформатические исследования роли генов ВКМ в патогенезе ЗНО (раздел 3.5) проводились в сотрудничестве с гепатопанкреатобилиарным хирургом и доктором медицины Alex N. Gordon-Weeks (Nuffield Department of Surgical Sciences, University of Oxford, John Radcliffe Hospital). В этом разделе личный вклад автора заключался в поиске релевантных наборов данных, анализе распакованных биоинформатических данных, построении таблиц и графиков, написании и редактированию рукописи.

Работы по исследованию влияния витамина Е на активацию дендритных клеток в опухолевом микроокружении (раздел 4.3) выполнены в сотрудничестве с Онкологическим Центром им. М.Д. Андерсона под руководством профессора Dihua Yu, и сотрудников ее лаборатории, включая Xiangliang Yuan, Yi Xiao, Yimin Duan, Lin Zhang и других. В этом разделе личный вклад автора заключался в проведении *in vitro* и *in vivo* экспериментов, ретроспективном анализе данных пациентов, обсуждении результатов и редактировании рукописи.

Исследования, посвященные изучению роли макрофагов и нейтрофилов в опухолевом микроокружении (разделы 4.1–4.4) проводились в сотрудничестве с Оксфордским университетом под руководством профессора Ruth Muschel и сотрудников ее лаборатории Su Yin Lim, Keaton Jones и других. В этих разделах личный вклад автора заключался в проведении *in vitro* и *in vivo* экспериментов, обсуждении результатов и редактировании рукописи.

Все исследования, выполненные в разделе 4.5 выполнены автором лично в Онкологическом Центре им. М.Д. Андерсона. Секвенирование РНК (единичных клеток и bulk) и сопутствующие биоинформатические анализы полученных данных проводилось в сотрудничестве с профессорами 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).

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 Владимира Геннадьевича Дружинина и сотрудников его лаборатории, включая Ларионова А.В., Барановой Е.Д., Деменкова П.С., и других. В данном разделе личный вклад автора заключался в написании грантовой заявки, планировании исследования, первичной обработке результатов, анализу данных, подготовке рисунков и написании рукописи.

ГЛАВА 1 РОЛЬ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО ТАРГЕТИРОВАНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ – НЕРЕШЕННАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА

1.1.1. Причины стагнирующего прогресса в лечении злокачественных новообразований в мире и возможные пути решения

Исследования онкологических заболеваний относятся к наиболее финансируемым областям науки. Ежегодно этой теме посвящаются тысячи оригинальных исследовательских статей; многие из них предлагают концептуально новые механизмы роста и развития опухоли, инвазии, метастазирования, выживания, иммунного уклонения и т.д. Некоторые эксперты ставят под сомнение обоснованность и необходимость подобных исследований, выражая опасения по поводу массовой публикации невоспроизводимых, избыточных и бездоказательных работ, как фундаментальных, так и клинических [18–21].

Три основных столпа лечения злокачественных новообразований (ЗНО) — хирургия, химиотерапия и лучевая терапия — которые активно применялись как минимум 60 лет назад и до сих пор остаются ключевыми методами лечения. В последние десятилетия наблюдается значительный рост выживаемости пациентов, проходящих лечение химиотерапией и лучевой терапией. Однако эти улучшения главным образом связаны с разработкой более эффективных химиотерапевтических препаратов и их комбинаций [22] а также совершенствованием методов лучевой терапии [23], благодаря постепенному (но не прорывному) научно-техническому прогрессу человечества. Улучшенные ранняя диагностика и стратификация пациентов, а также более эффективное ведение лечения также способствуют повышению выживаемости.

Безусловно, инновационные методы лечения, такие как таргетная терапия и иммунотерапия в последние десятилетия принесли значительную пользу онкологическим больным. К сожалению, широкое внедрение этих методов сопряжено с рядом ограничений: (а) их применение ограничено конкретными молекулярными подтипами опухолей, (б) чрезмерно высокая стоимость, (в) ограниченная доступность и (г) развитие устойчивости опухолей к терапии. Так, в 2018 году только около 40% пациентов с ЗНО в США были кандидатами на лечение ИИКТ, и лишь 12,46% из них ответили на лечение [24]. При этом дороговизна таких

методов лечения является критической проблемой: например, расходы на лечение Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T) могут достигать 500 000 долларов США для пациентов, страдающих такой частой побочной реакцией на терапию, как тяжелый синдром высвобождения цитокинов [25]. Кроме того, доступность таргетных и иммунотерапевтических препаратов в государствах с низким и средним уровнем доходов минимальна [26]; следовательно, приблизительно 85% населения Земли по-прежнему вынуждены полагаться только на хирургические, химио- и радиотерапевтические методы для лечения ЗНО. Также следует отметить, что большинство подходов таргетной и иммунотерапии способны значительно продлить выживаемость, но редко приводят к полной ремиссии без хирургического вмешательства и использования химиотерапии или лучевой терапии. Устойчивость к таргетной терапии зачастую неизбежна и приводит к рецидиву опухолей у большинства пациентов [27]. Например, препараты нацеленные на BRAF привели к революции в лечении меланомы, увеличив медиану выживаемости с 6 до 30 месяцев [28]. Однако у большинства пациентов с BRAF-мутацией при метастатической меланоме рецидив происходит в течение первого года после прекращения таргетной терапии, из которых 50% приходится на первые 3 месяца [29]. Таким образом, очевидна необходимость инновационных, прорывных подходов к лечению ЗНО. В связи с этим представляется критически важным исследовать причины стагнирующего прогресса в лечении ЗНО и предложить корректировку развития исследований в этой области в последующие десятилетия.

Доказательная медицина развивалась благодаря применению методологического редукционизма – подхода, который разбивает сложные явления на более простые составные элементы, что облегчает понимание системы в целом (Рисунок 1).

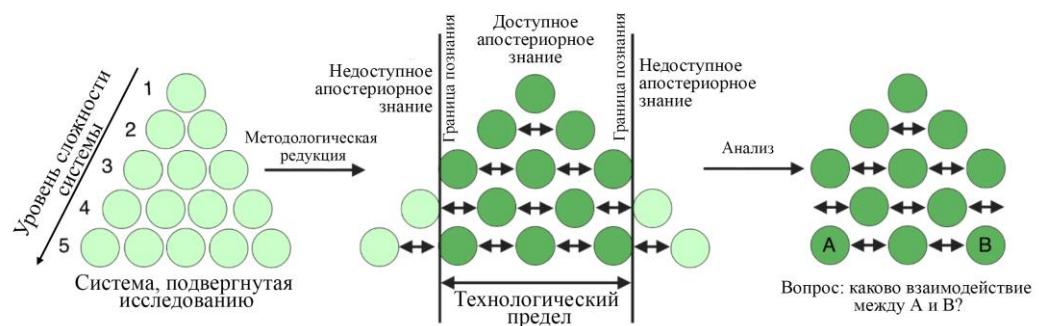


Рисунок 1 – Методологический редукционизм рассматривает сложные сущности как совокупность более мелких компонентов, причем сложность системы зависит от количества малых единиц, составляющих целое. Разложение сложной системы на такие составные части способствует лучшему пониманию природы вещей, однако технологические ограничения зачастую мешают в полной мере постичь всю систему. Отдельные части сложной системы можно

углубленно исследовать, однако взаимодействия между отдельными компонентами, а также функционирование системы в целом часто остаются неясными.

Действительно, сокращение числа переменных в сложных системах, таких как организм человека, позволяет выявлять ключевые аспекты этиологии и патогенеза заболеваний. Основой методологического редукционизма и доказательной медицины являются рандомизированные клинические испытания (КИ), в которых интервенции разбиваются на конкретные компоненты для оценки их отдельных эффектов [30]. Методологический редукционизм также применяется в мета-анализах, фармакологических, доклинических и диагностических исследованиях. Несмотря на то, что методологический редукционизм чрезвычайно полезен для изучения моноэтиологических заболеваний, таких как β -талассемия, серповидно-клеточная анемия, наследственный сфероцитоз, анемия Фанкони и другие генетические болезни [31], он не позволяет полноценно объяснить и охарактеризовать многофакторные заболевания, такие как шизофрения или ЗНО [32]. Эти недуги характеризуются несколькими уровнями сложности (молекулярный, клеточный, тканевой, и системный), при этом ограниченность существующих технологий, а также неспособность охватить все взаимодействия компонентов в сложной организованной системе, ограничивают полное понимание течения патологических процессов (Рисунок 1). Более того, углубленное понимание отдельных фрагментов системы далеко не всегда позволяет точно предсказать поведение всей системы в целом. Таким образом, если методологический редукционизм был крайне полезен на ранних этапах развития научного знания, то ныне, когда человечеству доступно общее онтологическое понимание природы вещей, включая многие тяжелые заболевания, этот подход становится менее эффективным. Существующие пробелы в знаниях этиологии, патогенеза, и патологической физиологии сложно заполнить разбиением проблемы на более мелкие части и их исследованием по отдельности.

Здоровье человека по своей природе целостно, а ЗНО – одна из самых сложных групп патологий. В качестве альтернативы редукционизму получил распространение холистический (т.е. целостный, всесторонний) подход, который стал популярным в исследованиях ЗНО с развитием системной биологии в начале XXI века [33]. В отличие от редукционизма, холистический подход нацелен на изучение сложных систем как единого целого [34]. Его преимущество очевидно: он позволяет исследователям лучше понимать сложные взаимосвязи внутри системы, обеспечивая более полное и комплексное представление о ней.

Примером холистического подхода в онкологии может служить секвенирование единичных клеток, которое позволяет изучить клональную эволюцию и внутриопухолевую гетерогенность первичных и метастатических ЗНО [35]. В меньшей степени эти методы также

проливают свет на особенности предраковых состояний и микроокружения опухоли [35]. Подобные исследования обычно генерируют массивы больших данных, включающие идентификацию типов клеток (т.н. аннотацию), анализ их состояния, генетические сигнатуры и сигнальные пути, выявление экспрессионных подтипов, реконструкцию клеточной линии развития опухоли и т.п. [36].

На сегодняшний день созданы пространственно разрешенные атласы единичных клеток для различных типов опухолей — это значительное достижение, которое, однако, пока не привело к созданию эффективных методов терапии. Важно отметить, что и холистический подход не лишен недостатков: к ним относятся (а) трудности в выявлении ключевых факторов, отвечающих за конкретные исходы; (б) техническая сложность проведения хорошо контролируемых экспериментов; и (в) ограниченная возможность обобщения массивов данных, поскольку каждое такое исследование уникально по своему дизайну и контексту.

Несмотря на взрывной рост числа одобренных препаратов для таргетной терапии ЗНО в XXI веке [37], показатель пятилетней выживаемости онкологических больных с 2000 по 2014 год практически не изменился по сравнению с периодом 1975–1999 годов (Рисунок 2). Более свежие статистические данные [38] показывают, что общая ежегодная смертность от ЗНО с 1975 года только растет, несмотря на то, что многие случаи летальности удалось предотвратить (Рисунок 3).

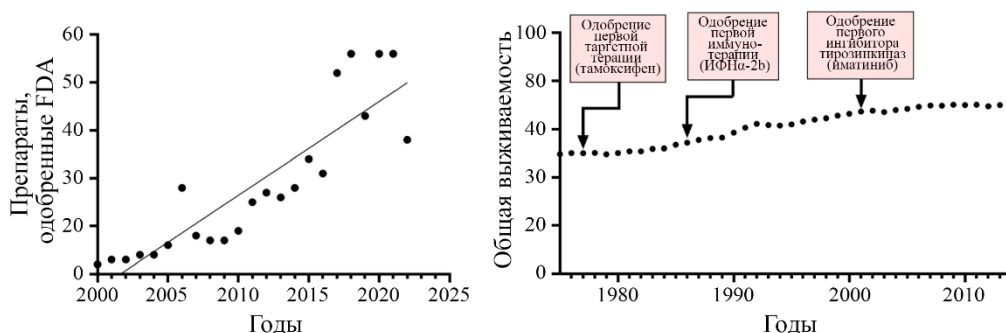


Рисунок 2 – Перспективы победы над ЗНО. Слева: Частота одобрения FDA таргетных и иммунотерапевтических препаратов для онкологии в период с 2000 по 2022 год (цитотоксические препараты исключены). Источник: анализ набора данных из исследования Scott et al., 2023 [37]. Справа: Пятилетняя относительная выживаемость при всех типах рака в США в период с 1975 по 2014 год. Источник: программа SEER, Национальный институт рака.

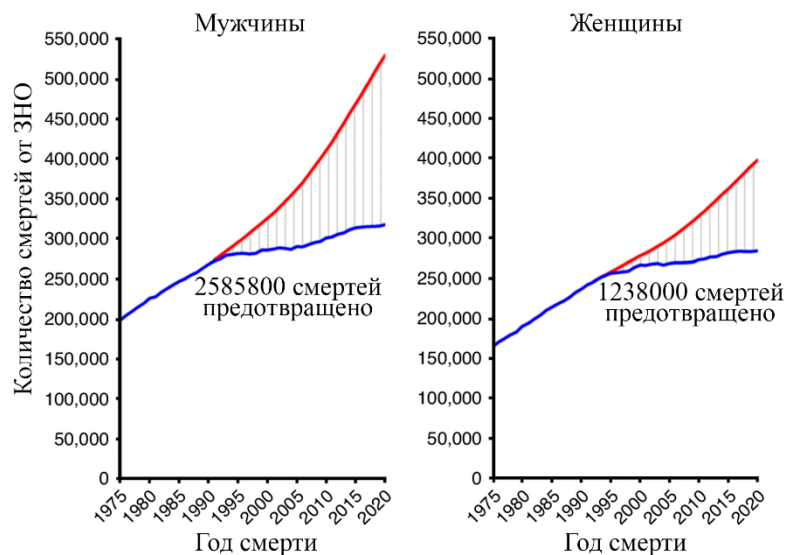


Рисунок 3 – Общее число смертей от ЗНО в США (синяя линия) и расчетное число смертей от ЗНО, которое следовало бы ожидать, если бы уровень смертности от рака оставался на пиковом значении (красная линия). (Воспроизведено из Рисунка 8 в статье Siegel et al. [38], на условиях лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Объем усилий и ресурсов, направляемых на онкологические исследования, не всегда напрямую коррелирует с улучшением показателей выживаемости – это особенно характерно для трудноизлечимых опухолей, таких как глиобластома (ГБМ) или ПАПЖ, для которых показатели общей пятилетней выживаемости редко превышают 10% [38].

Ключевым фактором, лежащим в основе роста глобальной заболеваемости и смертности от ЗНО, остается старение и увеличение численности населения. Согласно недавнему анализу, в ближайшие десятилетия прогнозируется рост заболеваемости ЗНО во всех странах, независимо от уровня их экономического развития [39]. Эта тенденция сохраняется, несмотря на значительные усилия по внедрению методов ранней диагностики [40] и разработке противоопухолевых вакцин [41].

Другой возможной причиной стагнирующего прогресса в лечении ЗНО является устойчивое снижение прорывного характера науки и технологий за последние десятилетия [42]. Во всех областях знаний скорость научного прогресса замедляется, несмотря на экспоненциальный рост числа публикаций. Увеличение количества опубликованных статей сопровождается снижением качества исследований, новизны, ростом самоцитирования и преобладанием т.н. «суперредукционизма» – феномена, при котором научные исследования сосредоточены на крайне узкоспециализированных темах [42]. Статьи по фундаментальной биологии ЗНО все чаще объясняют сложные фенотипы опухолей, такие как устойчивость к

терапии, метастатический потенциал, способность к уклонению от иммунного надзора и прочее, через небольшие изменения в одном гене или белке, либо связывают их с посттрансляционной модификацией конкретной аминокислоты. Такие причинно-следственные связи можно установить, используя упрощенные экспериментальные модели, но автору представляется маловероятным, что они будут иметь значимую роль в реальных клинических ситуациях.

Вероятно, человечество уже достигло или близко подошло к пределу объема научных знаний. Это означает, что существует чрезвычайно большой объем знаний с глубоким пониманием нюансов известных явлений, при этом наблюдается недостаток революционных или прорывных открытий (Рисунок 4). Если это предположение верно, данная проблема требует принципиально новых управленческих и научно-технологических решений.

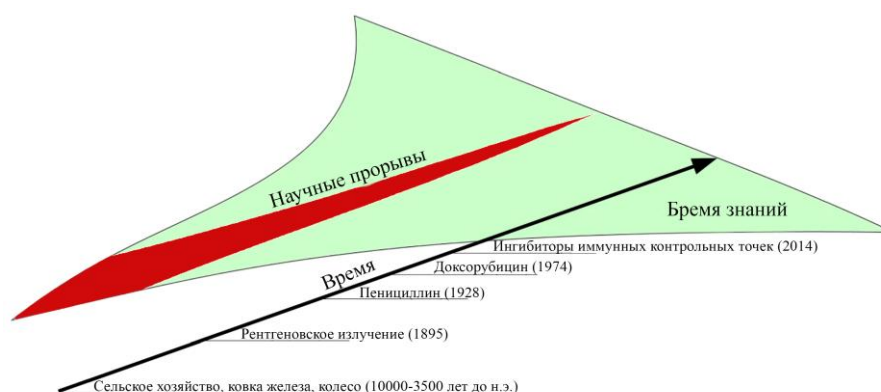


Рисунок 4 – Прорывы в науке становятся более редкими, в то время как наши знания о мире стремительно расширяются. Временная шкала является условной.

Таким образом, перед мировым научным сообществом молекулярных и клеточных биологов, биохимиков, иммунологов, онкологов, и медицинских химиков возникает вопрос – каким образом следует развивать фундаментальные, трансляционные, и клинические исследования ЗНО в ближайшие десятилетия для получения инновационных открытий, которые приведут к терапевтическим прорывам? Стоит рассмотреть несколько перспективных направлений:

- 1) Не следует полностью отказываться от редукционизма, однако при планировании исследований необходим разумный баланс между ним и холизмом. Кроме того, было бы ошибочным ставить механистические исследования выше функциональных. Значимость многих препаратов (таких как парацетамол, метформин или литий) невозможно переоценить даже при отсутствии полного понимания молекулярных механизмов их действия. Недавнее исследование показало, что внецелевая (англ. off-target) токсичность является распространенным механизмом действия противоопухолевых препаратов,

находящихся в стадии КИ [43]. Данная работа объясняет, почему многие КИ терпят неудачу, и показывает, что реальная сложность биологических систем зачастую превосходит наши ожидания. Таким образом, наряду с изучением отдельных молекулярно-генетических механизмов, целостное понимание сложных взаимодействий в биологических системах становится критически важным для разработки лекарств и терапевтических вмешательств;

- 2) Постепенное накопление знаний, безусловно, необходимо, однако именно рискованные проекты с высоким потенциалом отдачи (англ. high-risk, high-reward) способны привести к революционным открытиям. Разумеется, риски в таких проектах должны находиться под строгим надзором контролирующих органов. Для достижения максимальной синергии и настоящих прорывов необходимы масштабные международные коллаборации, объединяющие уникальную экспертизу и практико-ориентированный подход. Ярким примером служит британо-американская инициатива CRUK-NCI Cancer Grand Challenge [44]. Однако некоторые из ее задач, к сожалению, носят скорее эпистемологический, нежели практический характер (например, влияние электронных сигарет или старения на развитие рака). Другой пример – американская программа Cancer Moonshot [45], запущенная в 2016 году с целью сократить смертность от ЗНО вдвое за 25 лет. За первые четыре года в ее рамках было инициировано 49 клинических испытаний и подано более 30 патентов [45]. Тем не менее, реальное влияние этих инициатив на выживаемость и качество жизни пациентов еще предстоит оценить. Ключевым критерием успеха подобных проектов должен стать конкретный прогресс в клинических исходах;
- 3) При планировании фундаментальных исследований приоритет следует отдавать протеомным подходам, поскольку именно белки являются конечными функциональными единицами, в то время как мРНК подвержена спонтанной деградации. К сожалению, в современных поисковых исследованиях новых мишеней и маркеров ЗНО, использование протеомных методов исследования остается на периферии с большим отрывом уступая место транскриптомике. Учитывая тот факт, что большинство таргетных препаратов воздействуют на белки, а не на гены, протеомный анализ крайне важен для выявления новых терапевтических мишеней и биомаркеров, что является основой для разработки лекарств и персонализированной медицины. Необходимо поощрять прозрачность данных: практика открытого доступа к исходным данным должна распространяться не только на высокопроизводительные методы (такие как транскриптомика и протеомика), но и на все первичные данные, использованные в исследовании. К сожалению, лишь немногие научные журналы придерживаются такого подхода;

- 4) Существует потребность в реформе института рецензирования (англ. peer review). Традиционная модель критикуется за низкую эффективность, предвзятость, субъективность, непоследовательность, давление в пользу публикации положительных результатов и неспособность выявлять нарушения [46, 47]. Рецензенты часто ограничены во времени, ресурсах и узкой специализации, а также могут иметь конфликт интересов с авторами, что снижает объективность оценок. Кроме того, авторы из менее престижных учреждений и незападных стран сталкиваются с барьерами для сотрудничества с признанными учеными, что снижает их видимость в сообществе и возможность публикации в ведущих журналах, таких как Cell, Nature, Science. Консерватизм рецензентов нередко подавляет инновационные и нестандартные идеи, замедляя научный прогресс. Показательно, что около двух третей рецензентов Nature поддерживают идею альтернативных моделей публикации, например как у журналов Elife, PeerJ или F1000Research [48]. Возможно, ведущим онкологическим журналам стоит рассмотреть возможность: (а) поощрять размещение препринтов и их рецензирование (например, на платформе BioRxiv); (б) исключить возможность предложения рецензентов авторами при подаче рукописи для предотвращения конфликта интересов; (в) внедрить двойное слепое рецензирование на начальном этапе (за исключением случаев, когда рукопись связана с препринтом); (г) после принятия статьи раскрывать имена рецензентов и публиковать их отчеты в целях повышения прозрачности;
- 5) Традиционная модель «публикации → гранты → публикации» не стимулирует решение практических задач и зачастую поощряет проведение повторяющихся исследований, не ведущих к научным прорывам. Альтернативный подход можно наблюдать в успешном опыте борьбы с коронавирусной болезнью (COVID-19), когда беспрецедентная мобилизация ресурсов позволила создать эффективные вакцины за 6–12 месяцев вместо обычных 10–15 лет [49]. Это стало возможным благодаря небольшой группе высокоэффективных исследователей, применявших концептуально новые подходы, такие как мРНК-технологии [50]. Можно предположить, что аналогичным образом централизованные и сфокусированные усилия на государственном уровне с четко определенными целями и персональной ответственностью ключевых исполнителей позволят совершить качественный скачок в лечении ЗНО.

1.1.2. Необходимость ускоренного развития фундаментальной и клинической онкологии в России

Заболеваемость ЗНО в России стабильно растет: в 2022 г. показатель достиг 2742,4 случая на 100 тыс. населения, что отражает рост на 33,9% за десятилетие [51]. Ключевые эпидемиологические показатели подтверждают данную тенденцию: индекс накопления контингента больных вырос на 25% (с 6,2 до 7,7 за 2012-2022 гг.), а доля первичной диагностики ЗНО в IV стадии (метастазы) приблизилась к 20% [52]. Ускорение старения населения — основного фактора онкологического риска [53] — создает дополнительную нагрузку на систему здравоохранения, актуализируя потребность в исследованиях фундаментальных механизмов развития ЗНО для разработки инновационных диагностических и терапевтических стратегий. Объем затрат на амбулаторную фармакотерапию распространенных форм ЗНО в России в 2022 г. составил 65,8 млрд руб., при этом межрегиональная диспропорция расходов на одного пациента достигает десятикратного уровня [54, 55]. Внутренняя разработка и локализация производства высокотехнологичных препаратов в условиях санкционного давления и внешних ограничений могла бы обеспечить как снижение стоимости лечения, так и повышение его доступности. Например, цена на онкологические генерики может снижаться на величину от 26% до 93% по сравнению с оригинальными лекарствами: капецитабин (500 мг) подешевел на 93,1%, темозоломид (20 мг) — на 80,6%, а флутамид (250 мг) — на 26,2% [56].

Несмотря на значительный научный потенциал российской онкологии, сохраняется разрыв между фундаментальными исследованиями и их трансляцией в клиническую практику. Исторически сформированная в СССР модель здравоохранения, ориентированная на профилактику моноэтиологических заболеваний и массовую диспансеризацию, была крайне эффективна в борьбе с инфекциями и другими заболеваниями. Однако она не стимулировала развитие высокотехнологичных направлений, требующих длительных инвестиций в наукоемкие разработки для узких групп пациентов. В результате большинство современных онкологических препаратов разрабатываются и патентуются за рубежом, что делает их критически важным импортным товаром для России.

Таким образом, с учетом (а) демографического старения как драйвера роста заболеваемости ЗНО, (б) зависимости от импорта критически важных онкопрепаратов в условиях санкционного давления, и (в) фрагментарной интеграции исследовательской работы в клинику поиск новых подходов к лечению ЗНО является стратегической задачей для отечественной биомедицины. Таким образом, необходима разработка новых эффективных противоопухолевых препаратов для контроля роста опухолей, преодоления их устойчивости и восстановления чувствительности к терапии. Также важно создавать более эффективные схемы лечения за счет оптимизации и комбинирования различных терапевтических подходов, а также снижения

побочных эффектов. В конечном итоге эти нововведения должны значительно улучшить качество жизни онкологических больных.

1.2. МЕТАСТАЗЫ – ОСНОВНАЯ ПРИЧИНА СМЕРТНОСТИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Терапевтический контроль первичных ЗНО во многом достижим благодаря их локализованному характеру. Однако распространение злокачественных клеток в отдаленные органы значительно ограничивает возможности терапевтического вмешательства и ухудшает прогноз. Метастазы являются причиной более чем 90% летальных исходов [57], при этом возможности лечения пациентов с метастазами сильно ограничены. Большинству таких больных доступно лишь паллиативное лечение.

Для прохождения каждого этапа метастатического каскада злокачественным клеткам необходимо приобрести ряд свойств. Некоторые из этих черт появляются уже в первичной опухоли и являются результатом генетических мутаций, которые активируют онкогены и нарушают функцию генов-супрессоров. В результате происходит неконтролируемое деление, выживание, миграция и инвазия клеток [58]. Однако даже обладая этими свойствами, подавляющее большинство клеток, открепляющихся от первичной опухоли, не выживает в условиях турбулентного кровотока и быстро погибает вследствие напряжения сдвига (англ. shear stress) [59]. Таким образом, процесс метастазирования представляет собой эволюционное «бутылочное горлышко», которое отбирает самые устойчивые клоны злокачественных клеток. Специфические для метастазирования черты возникают либо в результате отбора таких клонов из генетической гетерогенности, присутствующей в популяции первичных опухолевых клеток, либо в результате случайной динамической адаптации клеток, покидающих первичную опухоль, к требованиям и установкам различных фаз метастазирования [60].

Таким образом, опухолевые клетки подвергаются жесткому эволюционному отбору на каждой стадии метастатического процесса: инвазии в паренхиму исходного органа, интравазации в сосудистое русло, пассивного перемещения в кровотоке и экстравазации из сосуда в паренхиму отдаленных органов с последующей реактивацией транскрипционных программ G2/M перехода [61]. Вследствие этого метастатические клоны обладают высокой агрессивностью, низкой иммуногенностью, а также устойчивостью к онкологическим препаратам, применяемым у данного пациента [62]. Не так давно было высказано предположение, что метастазы инициируются злокачественными клетками, фенотип которых схож со стволовыми клетками, с уникальным набором черт, обуславливающих метастатический потенциал [57].

Основным способом распространения метастатических клеток в организме служит гематогенный путь, однако метастазирование через лимфатическую систему также возможно [63]. При попадании в кровоток, значительная часть циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) погибает вследствие механического стресса, вызванного потоком крови [64], а также благодаря распознаванию и элиминации иммунными клетками [65]. Преимущественная колонизация того или иного органа (органоотропизм) зависит от общности сосудистого русла (например, вследствие того, что кровь от кишечника оттекает через воротную вену прямо в печень, рак кишечника метастазирует преимущественно в этот орган) и особенностей микроокружения отдельного органа, обуславливающих появление предметастатической ниши [66]. Например, гемопоэтические клетки-предшественники, экспрессирующие рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1), колонизируют органы до появления метастазов и создают благоприятную микросреду для ЦОК [67].

При заселении паренхимы отдаленных органов одиночные опухолевые клетки или их кластеры (10-15 клеток) локализуются в периваскулярной нише, где погружаются в покоящееся G0-состояние, при котором существенно замедляются метаболические и физиологические процессы [68]. Переход в такое состояние по меньшей мере частично обусловлен опухолевым микроокружением. Так, астроциты головного мозга депонируют белки внеклеточного матрикса, такие как ламинин-211, которые вызывают арест клеточного цикла через активацию белка, ассоциированного с Yes-киназой 1 в метастатических клетках РМЖ [69]. Важно, что пониженный уровень экспрессии главного комплекса гистосовместимости I класса (MHC-I) позволяет покоящимся клеткам уклоняться от иммунного надзора со стороны резидентных иммунных клеток органа (клетки Купфера печени, микроглия головного мозга, и т.д.) [70]. Выход из состояния покоя и переход к неконтролируемому делению может произойти как достаточно быстро (24 месяца после постановки диагноза) [71], так и спустя десятилетия после успешного лечения первичной опухоли [72], однако причины такого «пробуждения» не вполне ясны и требуют дальнейших исследований. Таким образом, для разработки методов лечения метастазов необходимы более глубокие знания о фундаментальных основах этого многоступенчатого процесса. Потенциально прорывным подходом может стать терапия, направленная на непрерывное поддержание покоящихся метастатических клеток в G0-фазе, либо активация иммунной системы для выявления и элиминации таких клеток [73].

Большинство одобренных онкологических препаратов оказывают системное воздействие, и фармакотерапия метастазов *per se* практически не встречается. Редким исключением являются блокаторы циклинзависимых киназ (CDK) 4 и 6: с 2015 года они применяются для лечения РМЖ с положительным гормональным рецептором и отрицательным рецептором эпидермального

фактора роста 2-го типа на поздних стадиях. При этом они демонстрируют эффективность у пациентов с метастазами в головной мозг [74, 75].

Несмотря на это, существуют возможности нацеливания на органоспецифические медиаторы метастазирования. Некоторые виды ЗНО метастазируют практически всегда в один и тот же орган, тогда как в других органах метастазы возникают лишь через продолжительный промежуток времени. Классическим примером служит метастазирование КРР в печень. Периферическая кровь, дренирующая кишечник, сначала поступает в печень через воротную вену. Это анатомическая особенность приводит к тому, что подавляющему большинству ЦОК, диссеминирующих из КРР, необходимо сначала преодолеть печеночные синусоиды, где раковые клетки задерживаются и иницируют метастазы гораздо чаще чем в других органах. Хирургическая резекция небольших метастазов КРР в печень является стандартом лечения и приводит к ремиссии приблизительно у 20% пациентов [76]. Лечение печеночных метастазов находит все более широкое применение и включает внутриартериальную химиоинфузию в печеночную артерию, радиочастотную абляцию и эмболизацию [77]. Помимо метастазов КРР в печень, недавние рандомизированные КИ II фазы продемонстрировали улучшение общей выживаемости у пациентов с олигометастатическими ЗНО, получавших консолидирующую лучевую терапию для уничтожения остаточных злокачественных клеток в ложе опухоли после хирургической резекции первичного новообразования [78].

Кость зачастую является единственным местом метастазирования гормонально-зависимых раков молочной и предстательной железы. Так, было показано, что альфа-излучатель радий-223, который селективно связывается с зонами повышенного обмена костной ткани, улучшает общую выживаемость у пациентов с раком простаты, метастазирующим в кость [79]. Кроме того, перспективным направлением является нацеливание на органоспецифические компоненты опухолевого микроокружения. Например, мета-анализ КИ с участием тысяч больных РМЖ показал небольшое, но статистически значимое улучшение общей выживаемости от адъювантного применения бисфосфонатов, ингибирующих резорбцию кости, опосредованную остеокластами [80].

Еще одним органом, подходящим для органоспецифической терапии метастазов, является головной мозг. Благодаря наличию гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), этот орган обычно становится последним местом метастатического распространения ЗНО. Поскольку крупные образования в замкнутом пространстве черепа могут быстро привести к летальному исходу, любой контроль над заболеванием в головном мозге может значительно улучшить выживаемость онкологических больных IV стадии [81]. Действительно, профилактическое облучение головного

мозга повышает общую выживаемость и является стандартом лечения в адъювантной терапии мелкоклеточного рака легкого (РЛ), который часто метастазирует в головной мозг [82].

Таким образом, углубленное понимание молекулярных и клеточных механизмов органотропного метастазирования в специфических тканевых микроокружениях различных анатомических локализаций (например, печень или мозг) открывает перспективы для разработки новых персонализированных терапевтических стратегий. Дальнейшие исследования роли стромальных компонентов, включая фибробласты, астроциты, эндотелиальные клетки, иммунные популяции и ВКМ в формировании предметастатических ниш, позволит идентифицировать новые мишени для фармакологического воздействия. Интеграция современных омиксных технологий, включая транскриптомику единичных клеток, протеомику и метаболомику, с методами функциональной геномики и биоинформатики (т.е. анализами больших данных) может обеспечить более глубокое понимание метастатического процесса. Такой мультидисциплинарный подход может способствовать значительному улучшению клинических исходов у пациентов с запущенными формами ЗНО IV стадии и оптимизации существующих протоколов противоопухолевой терапии.

1.3. МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ ПЕРВИЧНЫХ И МЕТАСТАТИЧЕСКИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

1.3.1. Общая характеристика опухолевого микроокружения

Классический, но во многом устаревший подход к пониманию биологии ЗНО определял злокачественные клетки как основную причину роста и развития опухоли, при этом взаимодействие между нормальными клетками органа и опухолевыми клетками либо представлялось малозначительным, либо игнорировалось вовсе. Традиционные методы лечения ЗНО (хирургия, химиотерапия и лучевая терапия) направлены на борьбу именно со злокачественными клетками; между тем, опухолевое микроокружение вносит существенный вклад во все стадии развития ЗНО, включая зарождение опухоли, ее рост, инвазию и метастазирование [6]. Помимо злокачественных клеток как таковых, опухолевое микроокружение включает в себя локально депонированный ВКМ и здоровые клетки пораженного органа, среди которых иммунные популяции клеток лимфоцитарных и миелоидных линий кроветворения, опухоль-ассоциированные фибробласты, эндотелиальные клетки, перicytes, а также клетки, специфичные для того или иного органа, например астроциты головного мозга, звездчатые клетки печени (ЗКП), и т.д. [6]. Взаимодействие между отдельными элементами опухолевого микроокружения осуществляется как посредством прямого

физического контакта между клетками и/или внеклеточным матриксом (например, сигнальный путь PD-L1/PD-1 между опухолевыми клетками и Т-клетками [83]), так и с помощью паракринного взаимодействия, т.е. путем секреции внеклеточных везикул [84], цитокинов [85], хемокинов [85], и прочих сигнальных молекул [86]. Таким образом, рассмотрение ЗНО через призму взаимодействия злокачественных и здоровых клеток, может помочь лучше понять фундаментальную биологию рака и разработать новые стратегии лечения, в которых таргетируются не только опухолевые клетки, но и здоровые клетки местного микроокружения. Например, недавно был предложен механизм перепрофилирования иммуносупрессивных макрофагов глиобластомы посредством ингибирования рецептора TREM2, в результате чего опухоль-инфильтрирующие макрофаги демонстрировали противоопухолевый фенотип и повышенную экспрессию провоспалительных сигнатур (англ. signatures) [87].

Подавляющее большинство немалигнизированных клеточных популяций опухолевого микроокружения является «обоюдоострым мечом», то есть способны как провоцировать развитие ЗНО, так и выступать сдерживающим фактором роста опухоли, в зависимости от особенностей генетики пациента, состава его микробиома, доступности кислорода и питательных веществ, факторов внешней среды, терапевтических вмешательств, и других условий [88–90]. Например, при доказанной роли опухоль-ассоциированных фибробластов в ускорении роста ЗНО [91], удаление миофибробластов, экспрессирующих α -гладкомышечный актин (α SMA), из ПАПЖ статистически значимо снижало выживаемость в мышинных моделях данного заболевания [92]. Это происходило за счет подавления опухолевого иммунного ответа и ангиогенеза, усиления гипоксии, а также активации транскрипционной программы эпителиально-мезенхимального перехода [92]. ГБМ в свою очередь демонстрирует пластичность и неоднородность популяций клеток местного микроокружения, при этом высокопроизводительные исследования на единичных клетках показали сосуществование про-опухолевых и анти-опухолевых субпопуляций клеток [93]. Таким образом, функциональная гетерогенность здоровых клеток опухолевого микроокружения усложняет поиск его терапевтически значимых компонентов.

В контексте разработки новых методов лечения ЗНО современные исследования ставят своей задачей прояснить комплексный характер взаимодействий между различными клетками опухолевого микроокружения для решения практических задач: (а) выявить ключевые факторы микроокружения, стимулирующие развитие опухоли в конкретном органе, и (б) попытаться воздействовать на наиболее неблагоприятные из этих факторов с целью их устранения (посредством нейтрализующих антител либо специфических ингибиторов) или перепрограммирования их проопухолевого фенотипа в противоопухолевый, например,

реполяризации М2-подобных макрофагов в М1-подобные при лечении глиобластомы [87, 94]. Таргетирование здоровых клеток опухолевого микроокружения перспективно, поскольку они генетически стабильны и, в отличие от злокачественных клеток, менее склонны к развитию лекарственной устойчивости и более чувствительны к терапии [95]. В настоящий момент активно проводятся КИ [95–97], в которых таргетируются различные элементы опухолевого микроокружения, включая молекулы внеклеточного матрикса (лизилоксидазоподобный фермент-2, матриксные металлопротеиназы, гиалуронидаза), моноциты/макрофаги (рецепторы CSF1R, CCR2, CD40, CD47), фибробласты (фибробласт-активирующий белок, ФАБ), Т-клетки (рецепторы TIM-3, TIGIT). При положительном исходе, эти испытания повторяют терапевтический успех одобренных препаратов, направленных на такие элементы опухолевого микроокружения, как эндотелиальные клетки (бевацизумаб) и Т-клетки (пембролизумаб, ипилимумаб).

Ниже будут подробно разобраны особенности каждого компонента опухолевого микроокружения, исследуемого в данной работе, с целью наглядной демонстрации их роли в развитии и прогрессировании ЗНО.

1.3.2. Внеклеточный компонент опухолевого микроокружения (экстрацеллюлярный матрикс)

Экстрацеллюлярный или внеклеточный матрикс (ВКМ), является ключевым компонентом, присутствующим у всех многоклеточных организмов. Он представляет собой пространственно организованную сеть коллагенов, гликопротеинов и протеогликанов, называемую «основным матриксом» (англ. core matrisome) [98, 99]. «Основные» белки ВКМ обладают фибриллярной структурой и формируют плотно «сшитую» сеть, выполняющую разнообразные физиологические функции. Так, ВКМ служит каркасом ткани, поддерживая форму и целостность органов, а также передает биомеханические и биохимические сигналы, регулирующие клеточный фенотип посредством внешне-внутренней передачи молекулярных сигналов (англ. outside-in signaling) [100]. ВКМ является динамичной структурой благодаря процессу ремоделирования, обусловленному балансом между внеклеточными протеазами и их ингибиторами [101], которые образуют класс белков, называемых «регуляторами ВКМ».

Развитие ЗНО часто сопровождается патологическим ремоделированием ВКМ, которое способствует прогрессированию заболевания посредством двух основных механизмов. Первый механизм связан с индукцией профибротического ответа, приводящего к избыточному депонированию ВКМ [102]. Это происходит за счет привлечения и активации опухолеассоциированных фибробластов [103], что влечет за собой активацию киназ фокальной адгезии (КФА) в злокачественных клетках [104]. Активация КФА необходима для их инвазии [105], а

также способствует развитию тканевой гипоксии [106], которая в свою очередь вызывает устойчивость к лучевой терапии [107]. Кроме того, опухоль-ассоциированный фиброз (десмопластическая строма) как правило формирует иммуносупрессивную микросреду с привлечением миелоидных супрессорных клеток (МСКЛ) [108] и как следствие, сниженной функцией инфильтрирующих опухоль цитотоксических Т-клеток [109]. Также известно, что избыточное накопление фибриллярных коллагенов (I, II, III, V и XI типов) напрямую влияет на метастазирование [110]. Например, повышение плотности коллагена увеличивает натяжение базальной мембраны сосудов, делая ее более проницаемой для злокачественных клеток [111], в то время как высокая жесткость ВКМ усиливает адгезию метастатических клеток к сосудистому эндотелию [112]. Кроме того, избыточный коллаген нарушает межклеточную и клеточно-матриксную адгезию, что также провоцирует прогрессию опухоли [110]. Хотя основным источником ВКМ в солидных опухолях считаются опухоль-ассоциированные фибробласты [113], некоторые данные свидетельствуют о продукции белков матрикса злокачественными клетками *per se* [114]. Инфильтрация опухоль-ассоциированными фибробластами является маркером неблагоприятного прогноза [115], однако таргетирование фибробластов показало неоднозначные результаты: в ряде исследований удаление этих клеток *in vivo* приводило к усилению роста опухоли и снижало выживаемость [92, 116].

Второй механизм, посредством которого ВКМ способствует развитию и прогрессированию ЗНО, является деградация ключевых структурных белков матрикса. Этот процесс повышает подвижность и инвазивность злокачественных клеток за счет регуляции активности интегринов, ослабляя взаимодействия между злокачественными клетками и ВКМ, а также стимулируя интравазацию посредством усиленного образования инвадоподий – специализированных структур, используемых клетками для проникновения в ткань [117]. В зависимости от контекста, разрушение ВКМ является необходимым условием опухолевой инвазии [118]. Активное расщепление коллагена снижает плотность матрикса, облегчая открепление злокачественных клеток и их миграцию [106]. Значительную роль в этом процессе играют матриксные металлопротеиназы (ММП), высокая экспрессия которых связана с неблагоприятным прогнозом при различных типах ЗНО [119, 120]. Деградация ВКМ также способствует высвобождению прометастатических факторов роста и хемокинов, таких как факторы роста фибробластов (FGF) [121] и трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- β) [122], усиливающих патологический ангиогенез [123–125] и инвазию опухолевых клеток. Несмотря на отсутствие прямых доказательств причинно-следственной связи между распадом ВКМ, повышенной подвижностью опухолевых клеток, формированием инвадоподий и интравазацией, большинство современных исследований подтверждают эту концепцию.

Таким образом, нарушение гомеостаза ВКМ, вызванное совместным влиянием здоровых клеток внеклеточного микроокружения и клеток ЗНО, позволяет этим двум на первый взгляд противоположным процессам, избыточному депонированию и разрушению матрикса, одновременно способствовать прогрессированию и метастазированию ЗНО. Ремоделирование ВКМ приводит к архитектурным перестройкам посредством изменения структурных и биофизических свойств матрикса [106,109]. По мере того как опухолевые клетки приобретают метастатический фенотип, свойства ВКМ меняются от мягкого и эластичного к жесткому и ригидному из-за сшивания под действием ферментов лизилоксидаз [126]. Это в свою очередь влечет за собой изменения микроокружения опухоли, включая геометрию и сократимость ВКМ, пролиферацию и дифференцировку клеток, и т.д. [127]. Любопытно, что более тонкие изменения белков матрикса, например посттрансляционные модификации, также могут быть связаны с метастатическим прогрессированием. Например, гликозилирование фибронектина может стимулировать ЕМТ в злокачественных клетках, стимулируя инвазию [128]. С другой стороны, модификация коллагена, опосредованная ферментом пептидиларгининдеиминазой, может способствовать обратному процессу – мезенхимально-эпителиальному переходу ЦОК, который облегчает метастатическую колонизацию печени [129].

Механизмы ремоделирования ВКМ при ЗНО являются комплексными и многофакторными. Изменения тонкого баланса между протеазами (матриксными металлопротеазами и другими) и их ингибиторами могут запускать патологическое изменение ВКМ, стимулируя метастазирование в отдаленные органы. Смещение этого баланса может регулироваться злокачественными клетками для получения преимуществ на разных стадиях метастатической прогрессии. Первичные опухоли направленно вызывают деградацию ВКМ для успешной инвазии в окружающие ткани, тогда как сформированные метастазы, напротив, могут вызывать избыточное отложение ВКМ для улучшения клеточной адгезии и индукции гипоксии, что в конечном счете способствует устойчивости к лучевой и химиотерапии и уклонению от иммунного ответа.

Немаловажным аспектом также является активация фибробластов при патологических состояниях (в том числе при ЗНО), приводящая к чрезмерному депонированию белков ВКМ и развитию фиброза. Дифференцировка наивных фибробластов в активированные миофибробласты, активно секретирующие ключевые белки ВКМ, инициируется TGF- β и другими цитокинами, которые выделяются в опухолевое микроокружение как злокачественными так и здоровыми клетками [130].

Интересно, что состав кишечной микробиоты способен стимулировать развитие фиброза кишечника. Это подтверждается результатами исследований, которые выявили взаимосвязь

между комменсальными микроорганизмами и регуляторами ВКМ [131]. Учитывая значимую роль микробиома в развитии и прогрессировании ЗНО [132], представляется небезынтесным углубленно изучить вовлеченность ВКМ в микробиомные аспекты этиопатогенеза рака.

Наконец, стоит упомянуть о важности матрикриптинов – биологически активных фрагментов, высвобождаемых при деградации белков ВКМ, в особенности коллагенов и протеогликанов. Рядом авторов было показано, что эти молекулы участвуют в ремоделировании ВКМ [133], репарации тканей [134], ангиогенезе [135], а также в патогенезе ряда заболеваний, включая ЗНО [136]. Антиангиогенное действие некоторых матрикриптинов, таких как эндостатин, повышало частоту терапевтического ответа в ряде клинических испытаний, демонстрируя многообещающие результаты при их применении в комбинации с химиотерапевтическими препаратами [137, 138].

Таким образом, избыточное накопление и разрушение компонентов ВКМ создают условия для инвазии злокачественных клеток, позволяя им проникать в сосудистое русло и формировать метастазы в отдаленных органах. Однако вышеуказанные процессы зачастую изучаются по отдельности – или на *in vivo* моделях ЗНО, или на сериях образцов биопсии. Поэтому остается неясным, какой из двух вышеуказанных механизмов является доминирующим в формировании метастазов, зависят ли они исключительно от контекста, преобладают ли на разных стадиях метастатического развития или в различных участках первичной и вторичной опухоли; возможно, оба процесса необходимы для успешного метастазирования. Роль первичной опухоли в подготовке ВКМ в потенциальных метастатических очагах также остается малоизученной. Предполагается, что дальнейшие исследования регуляции ВКМ в контексте механических и биохимических свойств матрикса помогут выявить новые терапевтические мишени как для первичных, так и для метастатических ЗНО.

1.3.3. Неиммунные резидентные клетки опухолевого микроокружения – миофибробласты печени

Развитие ЗНО сопровождается активной коммуникацией между злокачественными и нормальными клетками пораженного органа. Такое взаимодействие, как правило, носит реципрокный характер: здоровые клетки меняют фенотип опухолевых, а злокачественные, в свою очередь, существенно модифицируют профиль экспрессии клеток микроокружения. Для метастатических опухолей печени, которые предметно рассмотрены в этом диссертационном исследовании, важнейшими неиммунными резидентными клетками опухолевого микроокружения являются фибробласты.

Фибробласты — основные клетки соединительной ткани, ответственные за синтез ключевых белков ВКМ, включая коллаген, эластин, протеогликаны и гликопротеины. Эти

мезенхимальные клетки присутствуют во многих органах, формируя структурный каркас кожи, легких, сердца, печени, почек и желудочно-кишечного тракта. Морфологически, фибробласты имеют веретенообразную форму, овальное ядро и развитый шероховатый эндоплазматический ретикулум.

В норме фибробласты поддерживают гомеостаз тканей, обеспечивая постоянное remodelирование ВКМ, что сохраняет их прочность и эластичность. Они также играют ключевую роль в заживлении ран: мигрируя в зону повреждения, они активно пролиферируют и секретируют сигнальные молекулы, координируя деятельность других клеток.

При повреждении, воспалении, и других патологических процессах, фибробласты активируются и трансформируются в миофибробласты, для которых характерна экспрессия α ГМ, ФАБ и рецепторов фактора роста тромбоцитов. Благодаря развитию стресс-волокон миофибробласты приобретают сократительную способность, участвуя в стягивании краев раны, и начинают усиленно производить компоненты ВКМ. Хроническая активация этого процесса приводит к фиброзу.

При таких патологиях, как хроническое воспаление, фиброз или солидные ЗНО, активированные фибробласты как правило способствуют прогрессированию заболевания. Они стимулируют рост, инвазию опухолевых клеток и remodelирование тканей, а также подавляют иммунный ответ посредством секреции цитокинов и факторов роста, создавая благоприятные условия для развития патологии. Таким образом, высокая пластичность и функциональное разнообразие фибробластов определяют их центральную роль как в поддержании нормальной архитектоники тканей, так и в развитии патологических процессов.

В опухолях печени (например, метастазы КРР в печень) большинство миофибробластов формируется путем дифференцировки активированных клеток Ито, также известных как ЗКП [139]. В норме ЗКП расположены в перисинусоидальном пространстве Диссе, и представляют собой мезенхимальные клетки [140] способные к накоплению витамина А [141]. ЗКП обладают способностью к сокращению под воздействием ангиотензина II [142] или эндотелина I [143], что может указывать на их потенциальную роль в регуляции печеночного кровотока. Было показано, что ЗКП экспрессируют ряд стволовых маркеров, включая CD133 [144], нестин [145] и фактор транскрипции Oct4 [144], а в экспериментах на мышах показана вовлеченность ЗКП в процессы регенерации печени [146]. Благодаря экспрессии стволовых маркеров, ЗКП обладают значительной пластичностью и способны дифференцироваться в клетки эндотелия, гепатоцитоподобные клетки, и миофибробласты.

Экспериментальные данные свидетельствуют, что пространство Диссе может функционировать как ниша для стволовых клеток ЗКП. В частности, в опытах *in vitro* было

показано повышение экспрессии маркеров стволовых клеток CD133, β -катенина и белков сигнального пути Wnt в ЗКП крысы в ответ на Wnt-лиганды, продуцируемые гепатоцитами. Кроме того, ЗКП способны к миграции в сторону стромального клеточного фактора-1 (SDF-1), экспрессируемого синусоидальными эндотелиальными клетками печени. Эти данные позволяют предположить, что пространство Диссе создает особое микроокружение, которое способствует поддержанию и функционированию стволовых клеток ЗКП и их взаимодействию с другими компонентами печени [147].

ЗКП являются ключевыми источниками белков ВКМ в процессе развития фиброза печени, при этом регресс фиброза сопровождается массовым апоптозом ЗКП [148]. При фиброзе ЗКП дифференцируются в миофибробласты, экспрессирующие α ГМ [148]. Присутствие α ГМ+миофибробластов также было показано в микроокружении печеночных метастазов [149], что указывает на способность метастатических опухолевых клеток индуцировать дифференцировку ЗКП. В свою очередь, ЗКП/миофибробласты формируют десмопластическую строму, поддерживающую рост метастазов. Помимо вторичных опухолей, ЗКП способны стимулировать пролиферацию и инвазию клеток гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) *in vitro* [150], а совместная инъекция ЗКП с клетками холангиокарциномы в мышцах линии BALB/c приводила к формированию опухолей большего размера по сравнению с моноинъекцией клеток холангиокарциномы [151]. Кроме того, повышенная частота внутриопухолевых ЗКП у пациентов с ГЦК служила независимым прогностическим фактором низкой общей и безрецидивной выживаемости [152].

ЗКП способствуют прогрессированию ЗНО посредством секреции некоторых цитокинов и депонированию белков ВКМ. Так, среди экспрессируемых ЗКП цитокинов выделяют TGF- β , SDF-1 и гепатоцитарный фактор роста, каждый из которых, как показано в экспериментах *in vitro*, способствовал пролиферации опухолевых клеток [153, 154]. В контексте печеночных метастазов, ЗКП/миофибробласты продуцируют основные компоненты ВКМ, такие как коллаген и фибронектин, обеспечивающие адгезию и миграцию злокачественных клеток посредством интегриновых рецепторов на их поверхности [155]. Кроме того, ЗКП печеночных метастазов секретируют матриксные металлопротеазы [156], которые обеспечивают инвазию опухолевых клеток за счет расщепления белков ВКМ [157].

Таким образом, миофибробласты и их предшественники ЗКП играют комплексную роль в регуляции опухолевого микроокружения печени. С одной стороны, они продуцируют ферменты, разрушающие ВКМ для обеспечения инвазии опухолевых клеток, с другой — непосредственно синтезируют ВКМ, формируя каркас, необходимый для роста и развития ЗНО.

Сокращение численности активированных фибробластов в опухоли является перспективным экспериментальным подходом к терапии ЗНО. В исследованиях *in vivo* этот метод использовался для направленного удаления популяции ФАБ+ фибробластов, что достоверно снижало количество депонированного ВКМ в моделях РЛ и ПАПЖ [158]. В исследованиях по лечению меланомы у мышей, удаление ФАБ+ фибробластов приводило к уменьшению количества МСКЛ [159], однако по всей видимости данный эффект был обусловлен паракринными механизмами, а не изменением состава опухолевого ВКМ *per se*. Наконец, низкомолекулярный ингибитор ФАБ талабостат не показал клинической эффективности в КИ II фазы для лечения КРР, несмотря на эффективное подавление ферментативной активности этого белка [160]. В последующей клинической литературе терапия, нацеленная на ФАБ, не встречалась.

Важно отметить, что направленное воздействие на активированные фибробласты в микроокружении опухоли может стимулировать прогрессирование ЗНО, что было продемонстрировано *in vivo* на примере ПАПЖ. Так, удаление αГМ+ миофибробластов способствовало ускоренному развитию заболевания и метастазированию [92]. Эти результаты подчеркивают необходимость более глубокого исследования гетерогенности фибробластов как внутри отдельных молекулярных подтипов ЗНО, так и между различными видами ЗНО, прежде чем рассматривать возможность нацеленного воздействия на фибробласты в клинической практике. По всей видимости, секвенирование единичных клеток является ключом к решению этой проблемы, и уже позволило выявить субпопуляции фибробластов, напрямую связанные с нарушениями противоопухолевого иммунного ответа [161]. Будущим исследованиям предстоит выяснить, приводит ли разнообразие субпопуляций фибробластов к вариабельности ВКМ и каковы последствия такого разнообразия для противоопухолевого иммунного ответа.

1.3.4. Неиммунные резидентные клетки опухолевого микроокружения – астроциты головного мозга

Астроциты относятся к макроглии и являются самым распространенным типом глиальных клеток в головном мозге. Астроциты характеризуются звездчатой формой с многочисленными отростками, которые взаимодействуют с нейронами, клетками эндотелия и другими глиальными клетками [162]. Для идентификации астроцитов используются несколько маркеров, главным из которых является глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), составляющий основу их промежуточных филаментов. Другими ключевыми маркерами астроцитов служат S100β, глутамат-аспаратный транспортер (GAT) и глутаматный транспортер 1 (GLT-1) [163].

Ключевые функции астроцитов в норме чрезвычайно разнообразны и критически важны для функционирования центральной нервной системы (ЦНС). Некоторые из этих функций приведены ниже:

- 1) Концевые ножки астроцитов плотно окружают капилляры головного мозга, регулируя проницаемость ГЭБ, транспорт питательных веществ и ионный гомеостаз;
- 2) Посредством «лактатного челнока» астроциты поставляют нейронам лактат в качестве энергетического субстрата в периоды высокой синаптической активности. Таким образом, астроциты осуществляют метаболическую поддержку нейронов;
- 3) Астроциты активно захватывают из синаптической щели избыток возбуждающего нейромедиатора глутамата с помощью транспортеров GAT и GLT-1, таким образом регулируя концентрации нейротрансмиттеров;
- 4) Поддерживают оптимальную концентрацию ионов калия во внеклеточном пространстве, буферизирует его избыток, который образуется при нейрональной активности;
- 5) Модуляция синаптической передачи: астроциты «молекулы-глиотрансмиттеры» (D-серин, АТФ, глутамат), которые непосредственно влияют на синаптическую пластичность и эффективность передачи сигнала.

Таким образом, в физиологических условиях астроциты выступают в роли ключевых медиаторов, обеспечивающих структурную целостность, обмен веществ и стабильность внутренней среды головного мозга [162].

В ответ на патологический процесс, будь то травма, ишемия, нейродегенеративный процесс или ЗНО, происходит активация астроцитов, известная как астроглиоз. Астроглиоз характеризуется гипертрофией клеточного тела и отростков, усиленной экспрессией GFAP и пролиферацией [164]. Он является эволюционно консервативным защитным механизмом, направленным на ограничение зоны повреждения, восстановление ГЭБ и секрецию нейропротекторных факторов.

В контексте ЗНО этот защитный ответ становится хроническим. Опухолевые клетки выделяют широкий спектр сигнальных молекул (цитокины, хемокины, факторы роста), которые перепрограммируют астроциты, превращая их в опухоль-ассоциированные клетки, которые утрачивают свои гомеостатические функции и начинают активно способствовать опухолевой прогрессии. Влияние астроцитов на опухоль реализуется через несколько ключевых механизмов.

Глиобластома обладает способностью к диффузной инфильтрации в паренхиму мозга, что делает ее радикальную резекцию практически невозможной [165]. Астроциты играют в этом процессе ключевую роль. Они секретируют протеазы, такие как ММП, которые разрушают ВКМ, освобождая путь для миграции опухолевых клеток. Кроме того, астроциты формируют каналы,

по которым раковые клетки активно распространяются. Было показано, что опухолевые клетки и астроциты образуют функциональные щелевые контакты [166], через которые происходит обмен ионами и вторичными мессенджерами, что дополнительно стимулирует миграционный потенциал глиомы.

1.3.5. Опухолевое иммунное микроокружение

Иммунное микроокружение солидных первичных и метастатических ЗНО представлено разнородной и динамичной популяцией иммунных клеток, которые тесно взаимодействуют как со злокачественными, так и с нормальными клетками (астроциты головного мозга, миофибробласты печени, и т.д.) местного микроокружения. Ассоциированные с опухолью макрофаги обладают высокой пластичностью и существуют в виде спектра функциональных состояний, формируемых под влиянием локальных сигналов микроокружения [167]. Фенотипически, макрофаги могут быть условно подразделены на категории M1 и M2, однако появление более точных данных по результатам РНК-секвенирования единичных клеток привело к переосмыслению этой устаревшей на сегодняшний день концепции [168]. Таким образом, опухоль-ассоциированные макрофаги могут приобретать смешанные фенотипы со сложными функциями, влияя на прогрессию опухоли, иммуносупрессию и ремоделирование локального ВКМ [169].

Нейтрофилы вносят вклад как в противоопухолевый иммунитет, так и в процессы, поддерживающие рост и развитие ЗНО, такие как метастазирование и ангиогенез [170]. Дендритные клетки, необходимые для презентации антигена, в условиях иммуносупрессивного опухолевого микроокружения могут подвергаться функциональному угнетению со стороны факторов, секретируемых злокачественными клетками [171].

Среди адаптивных иммунных клеток стоит отметить регуляторные CD4⁺ Т-клетки (Трег), подавляющие противоопухолевый ответ и тем самым способствующие уклонению опухоли от иммунного надзора [172]. В-лимфоциты также присутствуют и обладают двояким потенциалом: они могут как поддерживать противоопухолевый иммунитет, так и способствовать прогрессии опухоли посредством регуляторных функций [173].

Естественные киллеры (NK-клетки) обеспечивают врожденный иммунный надзор за опухолью. Они способны распознавать и уничтожать опухолевые клетки, не требуя предварительной активации антигеном. NK-клетки выявляют клетки с низкой экспрессией молекул МНС-I, которая характерна для многих ЗНО, и опосредуя механизм иммунного распознавания «чужой среди своих», уничтожают такие клетки посредством индуцированной цитотоксичности [174]. В частности, при контакте со злокачественными клетками NK-клетки выделяют цитокины (например, гамма-интерферон, фактор некроза опухоли, TNF), которые

усиливают противоопухолевый иммунитет и способствуют активации других иммунных клеток, включая Т-лимфоциты и макрофаги. Они также используют гранзимы и перфорин для индукции апоптоза опухолевых клеток. Эти процессы не зависят напрямую от ступенчатых взаимодействий с адаптивной иммунной системой, которые необходимы для активации цитотоксического действия со стороны CD8⁺ Т-лимфоцитов [174].

Особое место в опухолевом микроокружении занимают клетки приобретенного иммунного ответа - опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, поскольку терапия с использованием ингибиторов иммунных контрольных точек продемонстрировала реальную клиническую значимость таргетирования этих клеток. Передовые научные группы возлагают большие надежды на опухоль-инфильтрирующие CD8⁺ Т-лимфоциты [175], способные уничтожать раковые клетки как посредством секреции гамма-интерферона в опухолевое микроокружение, так и путем распознавания поверхностных МНС-I-презентированных опухолевых антигенов, с последующим уничтожением злокачественных клеток через секрецию перфорины-1 и гранзима Б (GZMB). Однако опухолевые клетки применяют разнообразные механизмы уклонения от иммунного ответа, такие как (а) камуфляж, «скрывающий» злокачественные клетки от иммунного распознавания, (б) принуждение иммунных клеток к снижению своей функции посредством различных молекулярных сигналов, а также (в) защита от цитотоксичности посредством изменений иммунологического синапса, выработки устойчивости к механизмам клеточной гибели, или переходу в покоящееся G0-состояние [97]. Поэтому представляется перспективным разработать новые виды терапии ЗНО, направленные на усиление инфильтрации солидных опухолей лимфоцитами (в том числе CD8⁺ Т-клетками), преодоления накопления истощенных (дисфункциональных) Т-клеток, а также повышения иммуногенности самих опухолевых клеток для стимуляции их распознавания и последующего уничтожения. Для этого активно ведутся разработки по нескольким направлениям, среди которых поиск специфичных опухолевых неоантигенов для создания персонализированных вакцин [176], усиление функции антигенпрезентирующих клеток (например, дендритных клеток) [177], и другие. Отдельного внимания заслуживает направление, посвященное восстановлению экспрессии МНС-I на поверхности злокачественных клеток.

Все клетки млекопитающих экспрессируют МНС-I – комплекс белков, обеспечивающий презентацию внутриклеточных антигенов, главным образом CD8⁺ Т-клеткам [178]. Неоантигены злокачественных клеток возникают из-за мутаций в опухолевом геноме. После презентации на МНС-I они способны активировать CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ, приводящий к уничтожению злокачественных клеток [179]. На ранних стадиях развития ЗНО, опухолевые клетки представлены широким репертуаром фенотипов МНС-I, однако Т-клеточный иммунный

надзор ведет к положительному отбору клеток с низким или околонулевым уровнем МНС-I, которые дают начало клонам с пониженной иммуногенностью [180] и агрессивным ростом [181]. Помимо такой селекции, раковые клетки могут самостоятельно подавлять собственную экспрессию МНС-I через различные механизмы, включая метилирование ДНК и другие модификации гистонов [181, 182], а также посредством синтеза некоторых микроРНК [183]. Восстановление экспрессии МНС-I на поверхности опухолевых клеток является перспективной стратегией для усиления противоопухолевого иммунного ответа. Современные исследования в этом направлении включают в себя ингибирование эпигенетических регуляторов, ответственных за подавление МНС-I [184], генную терапию для стимуляции экспрессии МНС-I в опухолевых клетках [185], использование онколитических вирусов [186], а также блокирование иммуносупрессивных МНС-I-подавляющих сигналов, вызванных опухолевым микроокружением [187]. Многие запущенные случаи ЗНО, такие как метастазы в головной мозг, характеризуются низкой инфильтрацией Т-клетками [188], однако ни одного из вышеупомянутых экспериментальных видов терапии до сих пор не было разработано и внедрено для лечения этого заболевания.

В целом, популяции иммунных клеток в опухоли гетерогенны и пластичны. Их функциональное состояние определяется сложным комплексом сигналов от клеток ЗНО и других компонентов опухолевого микроокружения, что оказывает существенное влияние как на прогрессирование заболевания, так и на терапевтический ответ.

1.3.6. Влияние внеклеточного матрикса на клетки иммунного микроокружения опухоли

Примечательно, что ВКМ опухолевого микроокружения играет важную роль в регуляции фенотипа иммунных клеток путем изменения их миграционных свойств и функциональной активности.

Движение иммунных клеток по своей природе является амебоидным, причем структура ВКМ и способность клеточного ядра к деформации служат основными детерминантами миграции [189]. Значимость ВКМ в регуляции подвижности иммунных клеток в физиологических условиях была показана в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [190]. Так, в трехмерных культуральных системах Т-лимфоциты [191] и НК-клетки [192] перемещались вдоль сетей фибриллярного коллагена независимо от активности интегринов или протеаз. Важно отметить, что вышеуказанные эксперименты проводились в отсутствие хемокиновых градиентов. Это доказывает, что одного наличия коллагеновых волокон достаточно для направления движения иммунных клеток.

Было показано, что миграция цитотоксических Т-лимфоцитов *in vitro* снижалась в концентрированных коллагеновых гелях [193] или в областях трехмерного коллагенового матрикса, где волокна не были выровнены [194]. В связи с этим было высказано предположение, что рыхлые и хорошо ориентированные коллагеновые волокна обеспечивают оптимальную среду для миграции Т-клеток. В подтверждение этой гипотезы, Т- и В-лимфоциты демонстрировали амебоидное движение лишь вдоль рыхлых ретикулярных волокон ВКМ лимфатических узлов [195]. Кроме того, в *in vivo* моделях подкожных тимом, активированные Т-клетки мигрировали вдоль коллагеновых волокон [196]. Помимо этого, Т-лимфоциты также использовали коллагеновые волокна для перемещения в пределах опухоли легкого [193]. Эти наблюдения указывают на то, что структурные свойства ВКМ предоставляют Т-клеткам ключевые ориентиры для миграции.

Помимо миграционных свойств иммунных клеток, ВКМ также способен напрямую влиять на их функции. Для клеток миелоидного ряда это в основном касается воздействия на поляризацию клеток, тогда как для лимфоидных клеток ВКМ может оказывать прямое влияние на клеточную цитотоксичность.

Опухолевый ВКМ способен регулировать поляризацию миелоидных клеток, поскольку подкожная со-инъекция злокачественных клеток совместно с ВКМ мочевого пузыря приводила к замедлению роста опухоли по сравнению с контрольной группой мышей [197]. Повышенная выживаемость мышей, получавших ВКМ, была обусловлена привлечением в опухолевый очаг CD4⁺ Т-клеток и макрофагов, как M1-подобных так и M2-подобных. При этом именно ВКМ-опосредованная поляризация макрофагов способствовала регрессии опухоли [197]. В подтверждение этих данных, обработка культур макрофагов белками ВКМ, выделенными из тонкой кишки или мочевого пузыря свиньи, приводила к повышенной экспрессии M2-маркеров, таких как CD206, трансглутаминаза-2 (TGM-2), белок воспалительной зоны-1 (FIZZ-1) и аргиназа-1 (ARG-1) [197]. Это подтверждается и другими работами, в которых продукты деградации ВКМ, полученные из различных органов, способствовали поляризации макрофагов в провоспалительный M2-фенотип [198–200]. Например, децеллюляризованная дерма стимулировала формирование M2-подобных ARG-1⁺ макрофагов, для которых характерна продукция факторов заживления ран, включая матриксные металлопротеиназы, а также факторов роста, вовлеченных в ангиогенез и ремоделирование ВКМ [200].

Т-лимфоциты являются основным цитотоксическим эффектором в опухолевом микроокружении, и их активность зависит в том числе от перекрестного представления антигена дендритными клетками. Последние данные свидетельствуют о том, что ВКМ способен регулировать эти взаимодействия, и следовательно, напрямую участвовать в противоопухолевом

иммунном ответе. Любопытно, что плотность ВКМ опухоли способна регулировать функциональный статус инфильтрирующих Т-клеток [201]. Так, Т-лимфоциты культивируемые в ВКМ высокой плотности характеризовались нарушением пролиферации и снижением экспрессии генов, вовлеченных в противоопухолевую цитотоксичность [201].

Гликопротеины ВКМ также способны изменять фенотип Т-клеток в опухолевом микроокружении. Например, протеолиз ключевого гликопротеина версикана приводил к увеличению инфильтрации Т-клеток при КРР независимо от статуса нестабильности микросателлитов [202]. Один из таких протеолитических фрагментов, верскин, способствовал дифференцировке CD103+CD11c+MHC-II+ дендритных клеток, экспрессирующих высокие уровни регуляторного фактора интерферона-8 (IRF-8) и транскрипционного фактора BATF3 [202]. Поскольку данные транскрипционные факторы регулируют перекрестное представление антигена, можно предположить, что верскин может усиливать цитотоксичность Т-клеток в опухоли посредством регуляции фенотипа дендритных клеток. Подтверждение этой гипотезы было продемонстрировано *in vivo*: в мышинных опухолях легкого, молочной железы и миеломы с гиперэкспрессией версикана наблюдалось значительное увеличение количества дендритных клеток, экспрессирующих BATF3, по сравнению с опухолями контрольных клеток, модифицированных пустым вектором. В модельной системе антигена овальбумин-ОТ-I, анализ опухолей подтвердил увеличение количества антиген-специфичных CD8+ Т-клеток в новообразованиях, экспрессирующих версикан, что подтверждает способность BATF3+ дендритных клеток стимулировать противоопухолевый иммунитет [203].

Остеопонтин (OSP) — это фосфорилированный гликопротеин ВКМ, который обладает иммуномодулирующими свойствами [204]. Высокий уровень OSP связан с неблагоприятным прогнозом при ряде ЗНО [205], при этом он является лигандом для CD44 — поверхностного рецептора Т-клеток, ответственного за их активацию. В физиологических условиях транскрипционный фактор IRF-8 подавляет экспрессию OSP клетками миелоидного происхождения. Однако в микроокружении мышинного КРР нокдаун *PFI8* приводил к усиленной выработке OSP полиморфноядерными миелоидными супрессорными клетками (ПМЯ-МСКЛ) а также злокачественными клетками. OSP, в свою очередь, функционировал как ингибирующий лиганд для Т-клеток посредством связывания с CD44, подавляя цитотоксичность в отношении раковых клеток и способствуя прогрессированию заболевания [206].

В мышинных моделях рака предстательной железы тенасцин-С (TNC), депонированный в ВКМ, ингибировал активацию, пролиферацию и продукцию цитокинов инфильтрирующими Т-клетками [207]. TNC выступал в роли лиганда для интегрина $\alpha 5 \beta 1$ на Т-клетках, ингибируя актиновый цитоскелет, что в результате приводило к подавлению активации лимфоцитов.

Аналогичная роль TNC была выявлена при глиоме, где совместное культивирование злокачественных клеток с Т-лимфоцитами ингибировало активацию Т-клеток, также посредством активации интегрина $\alpha 5\beta 1$ [208]. У онкологических больных TNC секретируется опухолевыми клетками в составе внеклеточных везикул, при этом везикулы пациентов с глиомой демонстрировали значительно более высокую экспрессию TNC по сравнению с экзосомами условно здоровых субъектов [208].

Другой важный компонент ВКМ, галектин-3, способен взаимодействовать с активирующим поверхностным рецептором NK-клеток – NKp30 [209]. Было показано, что пониженная экспрессия галектина-3 раковыми клетками способствовала активации NK-опосредованного уничтожения опухолевых клеток. При этом в модели подкожной мышечной карциномы шейки матки ингибирование галектина-3 способствовало уничтожению раковых клеток после адаптивного переноса NK-клеток [209]. Интересно, что NK-клетки мышей с нокаутом гена галектина-9 имели повышенную продукцию гамма-интерферона и показали усиленную дегрануляцию в ответ на инфекцию цитомегаловирусом [210]. Это позволяет предположить, что несмотря на ингибирующее влияние галектина-3 на функцию NK-клеток в опухолевом микроокружении, для галектина-9 может быть верно обратное. В подтверждение этого свидетельствуют данные пациентов с КРР, среди которых высокая экспрессия галектина-9 была связана с благоприятным прогнозом и повышенным уровнем инфильтрации NK-клетками [215]. Кроме того, NK-клетки в культуре демонстрировали усиленную миграцию в ответ на галектин-9 за счет Rho/ROCK1-опосредованной полимеризации F-актина [215].

Таким образом, внеклеточный компонент опухолевого микроокружения способен напрямую влиять на функционал его клеточного компонента (иммунные клетки), что является важным аспектом для понимания комплексного влияния опухолевого микроокружения на процессы роста и развития ЗНО.

1.4. ВЛИЯНИЕ МИКРОБИОМА ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ НА ФОРМИРОВАНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ВНЕКЛЕТОЧНЫМ МАТРИКСОМ

Несмотря на то, что в опухолевом микроокружении было обнаружено присутствие микроорганизмов (МО), долгое время этот вопрос оставался недостаточно изученным. Благодаря достижениям секвенирования нового поколения было установлено, что многие МО являются неотъемлемой составляющей опухолевого микроокружения и представления о «стерильности» опухоли было опровергнуто. Опухолевое микроокружение является сложной и динамичной

структурой, которая включает в себя клетки организма хозяина и микробиоты, такие как бактерии, вирусы, грибки и простейшие. Прокариотические и эукариотические элементы системы взаимодействуют между собой, динамично развиваются и воздействуют друг на друга. С пониманием этого аспекта в исследованиях ЗНО логично возникают вопросы: взаимодействуют ли ассоциированные с опухолями МО со злокачественными клетками? Привносят ли они свой вклад в развитие заболевания, либо же наоборот, способствуют угнетению жизнедеятельности и роста опухолевых клеток? Активен ли микробиом в отношении формирования иммуносупрессивного микроокружения или иммунного ответа в целом? И, если да, то может ли он послужить инструментом воздействия на опухоль? Стоит ли рассматривать микробиом опухоли в качестве новой стратегии терапевтических подходов в онкологии? Пристальное изучение этого аспекта позволит понять роль микробиоты, ассоциированной с опухолью и, вероятно, сместит акцент на исследование проблемы терапии онкологических заболеваний в сторону общей системы взаимодействия организма как единое целое.

Современные исследования подчеркивают ключевую роль микробиома в регуляции иммунного ответа и прогрессировании ЗНО [211]. Как предметно обсуждалось в предыдущих главах, злокачественные клетки образуют сложное опухолевое микроокружение, включающее помимо них самих иммунные клетки и ВКМ. 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 [211].

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 [212]. Так, некоторые бактерии, вирусы и грибы способны инициировать иммуногенные формы гибели опухолевых клеток, способствуя активации специфического противоопухолевого иммунитета. В то же время нарушение состава микробиоты (дисбиоз) часто формирует провоспалительную среду, усиливающую подавление иммунитета, хроническое воспаление и метаболические нарушения, которые способствуют росту и инвазии ЗНО [211]. Возможности терапевтического воздействия через микробиом направлены на коррекцию дисбиоза и модуляцию иммунного ответа [211]. Различные стратегии включают применение пробиотиков, пребиотиков, фекальную трансплантацию микробиоты, а также разработку бактерий-носителей, способных доставлять противоопухолевые агенты или разрушать структурные компоненты ВКМ, улучшая проникновение лекарств и активируя иммунные механизмы [213]. Стоит отметить, что индивидуальная вариативность микробиома требует точного подбора и персонализации таких

подходов. Кроме того, комплексные стратегии по увеличению бактериального разнообразия могут усилить общую иммунную реактивность и повысить эффективность иммунотерапии [214].

Микробиом регулирует иммунный ответ в микроокружении опухоли с помощью нескольких выявленных механизмов. Прямое взаимодействие бактерий с опухолевыми клетками через активацию рецепторов (GPCR, RTK), а также стимуляция иммунной системы через связывание с Toll-подобными рецепторами (TLR4) грамотрицательных бактерий способствуют локальной активации иммунитета. Микробные метаболиты и молекулы могут влиять на метаболизм и поведение опухолевых клеток, изменяя локальный уровень pH и образуя активные формы кислорода [215]. Дисбиоз связан со снижением эффективности таких методов лечения, как ИИКТ, иммунорегуляторные ингибиторы и с формированием иммунного подавления [216].

Влияние микробиома опухолевого микроокружения на формирование иммунного ответа и взаимодействие с ВКМ является перспективным направлением современных онкологических исследований, результаты которых могут иметь важное значение для разработки новых терапевтических стратегий. Несмотря на то, что опухолевый микробиом определяет эффективность иммунотерапии, взаимодействие микробиома с ВКМ усложняет эти процессы, влияя на структуру и функциональные свойства опухолевой ткани.

ВКМ выполняет структурную функцию и влияет на миграцию, пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток [217]. Интересно, что между микробиомом и ВКМ были обнаружены прямые взаимодействия. Например, некоторые микроорганизмы вырабатывают ферменты (коллагеназы, гиалуронидазы, эластазы), способные разрушать компоненты ВКМ, и за счет изменения биофизических и биохимических свойств тканей, способствовать инвазии и метастазированию опухоли [218]. Одним из ключевых компонентов ВКМ является гиалуроновая кислота, уровень которой значительно повышен в микроокружении опухоли. Высокая концентрация гиалуроновой кислоты препятствует проникновению лекарственных препаратов в опухоль, и, одновременно с этим, стимулирует рост и поддерживает миграцию опухолевых клеток с помощью рецептора гиалуроновой кислоты CD44. CD44 является поверхностной молекулой клеточной адгезии, основным лигандом которой является гиалуронат (соль гиалуроновой кислоты) [218]. Таким образом, способность микробных ферментов, например, гиалуронидазы из *Staphylococcus aureus*, разрушать гиалуроновую кислоту позволяет снижать межклеточное давление и улучшать проникновение химиопрепаратов.

Совместное влияние микробиома и ВКМ осуществляется через активацию фибробластов и выработку провоспалительных факторов, способствующих ремоделированию ВКМ и созданию иммунорегуляторной среды, поддерживающей рост опухоли и ее распространение в отдаленные органы [219].

Клинические исследования подтверждают перспективность воздействия на микробиом для усиления противоопухолевого ответа. Например, был выделен штамм кишечной бактерии *Hominenteromicrobium* YB328, который усиливает действие иммунопрепаратов, усиливая проникновение Т-лимфоцитов в опухоль и замедляя прогрессирование рака [220]. Направленная модификация микробиоты (включая применение пробиотиков, пребиотиков, фекальной трансплантации и лекарств на основе микроорганизмов) рассматривается как способ повышения эффективности иммунотерапии и восстановления баланса иммунных реакций. Однако стандартизация и индивидуализация таких подходов остаются сложной задачей из-за высокой вариативности микробиомных сообществ у разных пациентов [221]. Также была показана связь кишечного микробиома с активацией тучных клеток и фенотипическими изменениями фибробластов в тканях молочной железы, что подчеркивает значимость «кишечно-мастоцитарной оси» в ранней диссеминации опухолевых клеток [214].

Преимущества микробиомной терапии заключаются в естественной модуляции иммунитета, потенциальном снижении побочных эффектов по сравнению с классическими методами и возможности сочетания с иммунотерапией. К недостаткам можно отнести сложность стандартизации, высокую вариативность индивидуальных микробных сообществ, риск переноса патогенных штаммов и недостаточное понимание фундаментальных механизмов взаимодействия микробиома с внутритканевыми структурами и иммунитетом.

В целом современные данные подтверждают, что микробиом в области онкологии является ключевым фактором, влияющим на развитие иммунного ответа, ремоделирование внеклеточного матрикса и прогрессирование опухолей. Это открывает перспективы для интегративных подходов к терапии, сочетающих коррекцию микробиоты, целенаправленное воздействие на ВКМ и усиление противоопухолевого иммунитета. Дальнейшие исследования, направленные на выявление специфических микробиомных сигнатур и их взаимодействия с компонентами опухоли, необходимы для разработки безопасных и эффективных методов микробиом-ориентированной онкотерапии.

Таким образом, микробиом опухолевого микроокружения выступает важным регулятором противоопухолевого иммунного ответа и изменения ВКМ, что в совокупности влияет на развитие и прогрессию опухолей. Современные исследования указывают на большой потенциал модуляции микробиоты как инновационного направления в терапии онкологических заболеваний, требующего дальнейшего глубокого изучения молекулярных механизмов взаимодействия микробиома, иммунных клеток и ВКМ.

1.5. ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО НАЦЕЛИВАНИЯ НА ОПУХОЛЕВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ПРОГНОЗА ПАЦИЕНТОВ С ЗНО

В целом на основании анализа опубликованной литературы можно сделать несколько выводов: 1) Традиционные методы лечения ЗНО (как первичных так и метастатических), направленные исключительно на уничтожение опухолевых клеток, приближаются к своему технологическому пределу, либо уже достигли его, однако многие типы ЗНО остаются неизлечимыми или трудно поддающимися лечению (например, запущенные ЗНО с метастазами в печень или головной мозг); 2) Опухолевое микроокружение оказывает значимое влияние на рост и развитие ЗНО, при этом некоторые элементы этого микроокружения (особенно касающиеся ВКМ или иммунного ответа) могут быть успешно использованы в качестве мишени для противоопухолевой терапии; 3) Злокачественные клетки способны избегать иммунного ответа с помощью различных механизмов, при этом весь репертуар взаимодействий между иммунными и опухолевыми клетками остается недостаточно изученным; 4) Терапевтическое нацеливание на отдельные компоненты опухолевого микроокружения является подающим надежды направлением разработки новых подходов к лечению ЗНО.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты, материалы, дизайн и общая методология исследования

Данное междисциплинарное исследование объединяет молекулярные и иммунологические подходы. Объектами исследования служили клеточный (злокачественные, иммунные и неиммунные клетки), внеклеточный (ВКМ) и микробный (микробиом) компоненты опухолевого микроокружения первичных и метастатических ЗНО. Диссертационное исследование включало как фундаментальные, так и клинические аспекты.

Фундаментальные аспекты исследования:

- 1) Проведение исследований на опухолевых клеточных линиях, включая исследования пролиферации, миграции, устойчивости к лекарственным препаратам и взаимодействие с здоровыми клетками микроокружения (астроциты, Т-лимфоциты, дендритные клетки, нейтрофилы, макрофаги, фибробласты);
- 2) Применение методов генной инженерии для избирательного выключения (нокдаун, нокаут) тех или иных исследуемых генов в клеточных линиях, с последующим применением *in vivo*-моделей;
- 3) Использование высокопроизводительных методов исследования, таких как полногеномное транскриптомное секвенирование, жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией, секвенирование РНК единичных клеток, для изучения механизмов патогенеза ЗНО;
- 4) Изучение эффективности экспериментальных таргетных препаратов и их комбинаций для лечения ЗНО в мышинных моделях;
- 5) Проведение исследований влияния гамма-излучения (как стандарта лечения многих солидных ЗНО) на клеточные и внеклеточные компоненты иммунного микроокружения.

Клинические аспекты исследования:

- 1) Клиническое исследование влияния приема пищевых добавок на выживаемость пациентов с меланомой, получавших лечение ИИКТ;
- 2) Биоинформатический анализ данных пациентов с онкологическими заболеваниями для поиска ключевых генов ВКМ, влияющих на прогноз;
- 3) Популяционное исследование качественного и количественного состава микробиоты мокроты у пациентов с РЛ в сравнении с таковым у здоровых субъектов;

- 4) Изучение связей между наличием определенных таксономических единиц в мокроте больных РЛ;
- 5) Изучение влияния курения табака на состав микробиома мокроты у больных РЛ.

В исследовании изучались ключевые компоненты опухолевого микроокружения: иммунные клетки (и другие неопухолевые клетки), ВКМ, и микробиом (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Ключевые компоненты опухолевого микроокружения, изучаемые в диссертационном исследовании

2.2. Клеточные линии

В исследовании использовали первичные и иммортализованные человеческие и мышинные клеточные линии (таблица 1). Клетки ранних пассажей культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI, R8758; Sigma) или Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, D2429; Sigma), дополненных 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС; 16000-044; Thermo Fisher Scientific) и 100 МЕ/мл пенициллина-стрептомицина (15140-122; Thermo Fisher Scientific).

Таблица 1 – Первичные и immortalized клеточные линии, использованные в диссертационном исследовании

Клеточная линия	Вид	Тип	Источник	Использование в моделях <i>in vivo</i>
Panc02	м	ПАПЖ	ATCC	Интрапанкреатическая инъекция (ПАПЖ)
KPC	м	ПАПЖ	Pdx1-Cre;LSL-Kras ^{G12D} ;LSL-Trp53 ^{R172H} <i>Ex vivo</i>	Интрапанкреатическая инъекция (ПАПЖ)
MC38	м	KPP	Kerafast	Интраселезеночная инъекция (печеночные метастазы), подкожная инъекция
HT-29	ч	KPP	ATCC	Интраселезеночная инъекция (печеночные метастазы)
HCT116	ч	KPP	ATCC	Интраселезеночная инъекция (печеночные метастазы)
LoVo	ч	KPP	ATCC	Интраселезеночная инъекция (печеночные метастазы)
MDA-MB-231	ч	PMЖ	ATCC	Интракаротидная инъекция (метастазы головного мозга)
EMT6	м	PMЖ	ATCC	Инъекция в молочную жировую прослойку
EO771	м	PMЖ	Charles River	Интракаротидная инъекция (метастазы головного мозга)
4T1	м	PMЖ	ATCC	Интракаротидная инъекция (метастазы головного мозга), инъекция в молочную жировую прослойку
T11	м	PMЖ	Сян Чжан (Baylor College of Medicine)	Интракаротидная инъекция (метастазы головного мозга)
B16-GMCSF	м	Меланома	RIKEN BioResource Center	Подкожная инъекция
HCC1954	ч	PMЖ	ATCC	-
WHIM3	ч	PMЖ	Хелен Певиница-Вормс (MD Anderson Cancer Center)	-
NIH 3T3	м	Фибробласт	ATCC	-
Первичные астроциты	м	-	<i>Ex vivo</i>	-
Моноцитарные дендритные клетки	ч	-	<i>Ex vivo</i>	-

Продолжение таблицы 1

Первичные миелоидные клетки	м	CD45+ CD11b+	<i>Ex vivo</i>	-
Первичные гранулоциты	м	CD45+ CD11b+ Gr1 ^{high}	<i>Ex vivo</i>	-
Первичные моноциты/макрофаги	м	CD45+ CD11b+ Gr1 ^{low}	<i>Ex vivo</i>	-
Первичные нейтрофилы	м	CD45+ CXCR21+	<i>Ex vivo</i>	-
Первичные Т-клетки	м	CD8+	<i>Ex vivo</i>	-

РМЖ – рак молочной железы, КРР – колоректальный рак, ПАПЖ – протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, АТСС – Американская коллекция типовых культур, м – мышь, ч – человек.

2.3 Характеристика лабораторных животных

Для экспериментов с лабораторными животными использовали самок мышей линий C57BL/6, BALB/c, либо SCID (вес 18-25 г, возраст 10-20 недель, получены от компаний Jackson Laboratories и Charles River Laboratories. Животные содержались в SPF-виварии (англ. Specific Pathogen Free). В качестве подстилки использовалась древесная стружка. Животные содержались с неограниченным доступом к воде и корму. В течение всего времени эксперимента поддерживались стандартные условия температурного режима ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), относительной влажности ($55 \pm 10\%$) и 12-часовые циклы смены света и темноты. Контроль состояния здоровья животных проводили ежедневно. Распределение мышей по экспериментальным группам или клеткам осуществляли методом простой рандомизации. Все процедуры были одобрены локальным этическим комитетом и были выполнены в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986).

2.4 Мышиные модели ЗНО

Для экспериментов, описанных в разделе 3.3, были использованы модели ортотопических сингенных опухолей ПАПЖ. Опухоли формировали путем инъекции злокачественных клеток в хвост поджелудочной железы. Объем инъекции составлял 50 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 5 млн клеток линии Panc02 или 0,5 млн клеток линии КРС.

В эксперименте с инъекцией клеток линии Panc02 (№1), мышей подвергали следующим режимам лечения: гемцитабин вводили внутривенно в дозе 333 мг/кг один раз в неделю; протопорфирин IX (ПРІХ) вводили перорально через зонд в дозе 8,26 мг/кг три раза в день; целекоксиб (Цел): вводили перорально через зонд в дозе 82 мг/кг два раза в день. Лечение

начинали через 18 дней после инъекции опухолевых клеток. Для оценки выживаемости на протяжении всего периода лечения проводили мониторинг продолжительности жизни животных.

В эксперименте с инъекцией клеток линии КРС (№2), была использована аналогичная схема лечения, однако терапию начинали через 8 дней после инъекции опухолевых клеток. По истечении 7 дней терапии мышей подвергали эвтаназии с последующей эксплантацией опухолей. Образцы опухолей линии КРС использовали для проведения анализа транскриптома единичных клеток.

Для экспериментов, описанных в разделах 3.2 и 4.1, была использована подкожная инъекция клеточной линии МС38. Для подкожной инъекции опухолевых клеток мышам в анестезированном состоянии вводили в латеральную область $0,5 \times 10^6$ клеток линии МС38. Объем опухоли измеряли штангенциркулем и оценивали по эллипсоидальной формуле: $V = \frac{1}{2}$ (длина $\times$ ширина²). После достижения опухолью объема 80 мм³ мышей рандомизировали по экспериментальным группам. Препараты вводили внутрибрюшинно по следующим схемам: антитело α М-CSF (Bioxcell, клон 5A1) в дозе 10 мг/кг три раза в неделю. В качестве контроля использовали нормальный имунноглобулин G (IgG). Лучевую терапию (10 гр однократно) проводили локально при достижении опухолью объема 100 мм³ с использованием аппарата Gulmay 320.

Для экспериментов, описанных в разделах 3.1, 3.4, 4.5 была использована интраселезеночная инъекция клеток КРР линий МС38, НСТ116 НТ-29, LoVo. Под наркозом (кетамин/ксилезин, 100/10 мг/кг внутрибрюшинно) у мышей выполнялась срединная лапаротомия длиной 1,5 см. Суспензия опухолевых клеток ($0,5 \times 10^6$ – 1×10^6 клеток/50 мкл ФСБ, предварительно меченых люциферазой для биолюминесцентного мониторинга) вводилась в паренхиму селезенки иглой 30G под визуальным контролем, обеспечивая равномерное распределение без сосудистого повреждения. Через 1 мин выполнялась тотальная спленэктомия с двусторонней лигатурой сосудов (шовный материал 5-0) и удалением органа, что предотвращало системный кровоток клеток и направляло их преимущественно в портальную систему печени (эффективность колонизации ~80–90% через 7–14 дней). Рану ушивали послойно. Контроль роста метастазов проводили *in vivo* биолюминесцентной томографией на 7, 14 и 21-й день после инъекции.

Для экспериментов, описанных в разделе 4.3, была использована ортотопическая мышьяная модель РМЖ с использованием клеточных линий ЕМТ6 и 4Т1: 2×10^5 клеток ортотопически вводили в молочные жировые подушки самок мышей линии BALB/c.

Церебральные метастазы, изучаемые в разделе 4.5, индуцировали путем инъекции в внутреннюю сонную артерию по ранее описанной методике [222]. Использовали самок мышей в возрасте 6–8 недель. Мышей анестезировали (кетамин/ксилезин, 100/10 мг/кг внутривенно). Шерсть на шее сбривали и обрабатывали трижды повидон-йодом и 70% этанолом. Под контролем стереомикроскопа скальпелем делали разрез 1 см по правой стороне шеи. Зубчатыми пинцетами рассекали мышцы для обнажения правой общей сонной артерии. Сонную артерию отделяли от прилежащего блуждающего нерва хирургическими пинцетами. Затыльную артерию и наружную сонную артерию перевязывали узлом для предотвращения формирования внечерепных метастазов. Под общую сонную артерию подкладывали небольшой ватный тампон, затем устанавливали лигатуры дистальнее и проксимальнее тампона, завязывая их свободными узлами. Опухолевые клетки (30×10^3) в 0,1 мл сбалансированного раствора Хэнкса (55037C, Sigma) медленно вводили в сонную артерию. Дистальную часть сонной артерии слегка приподнимали для предотвращения регургитации, после чего затягивали дистальный узел, завершая инъекцию. Избыточные швы обрезали, рану закрывали двумя скобами. Для анализа общей выживаемости мышей с мозговыми метастазами конечной точкой служили клинические признаки мозгового метастазирования.

2.5. Обогащение внеклеточного матрикса и масс-спектрометрия

В разделах 3.1 и 3.2 проводили масс-спектрометрию белков ВКМ. Для обогащения и анализа белков ВКМ методом масс-спектрометрии использовали оригинальную методику. Печени мышей (интактные или с метастазами) однократно промывали ФСБ и помещали в чашку с 1% додецилсульфатом натрия (SDS) и 0,01% гидроксидом аммония (NH_4OH) в дважды дистиллированной воде (ddH_2O). Чашки помещали на шейкер на 72 часа. В течение дня буфер для децеллюляризации меняли каждые 6 часов, на ночь чашки оставляли при температуре 4°C.

Децеллюляризованные образцы печени разрезали на небольшие фрагменты приблизительно по 100 мг, помещали в 200 мкл охлажденного буфера С набора для компартментного выделения белков CNMCs (K3013010; BioChain Institute) и гомогенизировали с помощью режущего гомогенизатора. После этого образцы обрабатывали ультразвуком, после чего в образцы добавляли 3000–4000 единиц пептид-N-гликозидазы F (PNGase F; P0704; New England BioLabs) и 1 мкл Бензоназы (E1014; Sigma) и инкубировали в течение 1 часа при 4°C. Образцы центрифугировали при 18 000 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок промывали в 400 мкл охлажденного буфера W набора CNMCs при 4°C в течение 5 мин. Затем экстракт белка центрифугировали при 18 000 g в течение 20 мин. Надосадок удаляли, а осадок ресуспендировали в 150 мкл охлажденного буфера N и инкубировали при 4°C в течение 20 мин для растворения ядерных белков. Экстракт белка центрифугировали при 18 000 g в

течение 20 мин. Надосадок удаляли, а осадок ресуспендировали в 150 мкл охлажденного буфера М для растворения мембраносвязанных белков. Образцы снова центрифугировали при 18 000 g в течение 20 мин, надосадок удаляли. Оставшийся осадок ресуспендировали в 150 мкл предварительно подогретого буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин для растворения цитоскелетных белков. Далее образцы центрифугировали при 18 000 g в течение 20 мин. Надосадок удаляли, а осадок ресуспендировали в 150 мкл буфера С, инкубировали при 4°C в течение 5 мин, а затем снова центрифугировали в течение 20 мин при 15 000 g и 4°C. Полученный нерастворимый осадок, состоящий из белков ВКМ, был использован для масс-спектрометрии.

Образцы ВКМ растворяли в смеси 8 М мочевины (9U5378; Sigma), 100 мМ бикарбоната аммония (09830; Sigma) и 10 мМ дитиотреитола (ДТТ; 43817; Sigma), pH 7,8, и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После этого в образцы добавляли йодацетамид (I1149; Sigma) до конечной концентрации 25 мМ, после чего инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Концентрацию белка измеряли с помощью детергент-совместимого набора для определения концентрации (5000111; Bio-Rad). Белок преципитировали метанол-хлороформным методом с последующим растворением в 50 мкл 8 М мочевины. Затем концентрацию мочевины снижали до концентрации 1М путем добавления ddH₂O.

Обогащенный ВКМ инкубировали с трипсином (V5111; Promega) и лизил-эндопептидазой С в соотношении фермент/субстрат 1:50 в течение ночи. Образцы постоянно перемешивали на шейкере при 37°C. После этого добавляли вторую порцию трипсина в соотношении 1:100 и снова инкубировали образцы в течение 4-6 часов при 37°C на шейкере.

Затем образцы подвергались нано-жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией на системе Acquity LC (колонка C18, 75 мкм × 250 мм, размер частиц 1,7 мкм; Nanoacquity Waters), сопряженной с масс-спектрометром Thermo LTQ Orbitrap Elite (разрешение 120 000 при 400 m/z, режим Top 20, диссоциация, индуцированная столкновением), с использованием градиента ацетонитрила от 1% до 35% в течение 60 мин при скорости потока 250 нл/мин. Пиковые списки спектров генерировали с помощью MSConvert (Proteome Wizard) и далее анализировали с использованием Mascot версии 2.3 (<http://www.matrixscience.com>) используя базу данных белков Swiss-Prot, содержащей последовательности мыши (16642 записей) или человека (20306 записей), с учетом расщепления трипсином и допустимых отклонений массы 10 млн⁻¹ / 0,5 Да. В качестве переменных модификаций использовали окисление метионина, деамидирование аспарагина и глутамина, а также другие распространенные модификации коллагенов и протеогликанов. Частоту ложных обнаружений пептидов (англ. False discovery rate, FDR) корректировали до <1%. Для количественного анализа

дифференциально экспрессируемых белков нормализованное количество каждого белка определяли путем измерения интенсивности пиковой площади с помощью программного обеспечения Progenesis QI (Nonlinear Dynamics). Содержание белка рассчитывали как сумму количества всех уникальных пептидных ионов для конкретного белка в каждом запуске. Нормализацию количества проводили для обеспечения сопоставимости между разными запусками образцов с помощью программного обеспечения. Белки, идентифицированные более чем по одному пептиду, включались в дальнейший анализ. Нормализованные интенсивности пептидов для каждого образца использовали для расчета кратности изменения белков между группами.

В разделе 4.5 проводили фосфопротеомный анализ опухолевых клеток с нокдауном CDK5 и без такового. Клетки линии 4T1.Br3 (с нокдауном CDK5, shCDK5, или контрольные, shCtl) культивировали в течение 6 дней в среде, содержащей меченые аргинин и лизин из набора для количественного протеомного анализа SILAC (SILAC Protein Quantitation Kit, A33972, Thermo). Лизаты клеток готовили и передавали для анализа фосфопротеома в центр коллективного пользования The UTHealth Proteomics Core Laboratory. Аликвоту лизата массой 2,5 мг восстанавливали 20 мМ ДТТ при 37°C в течение 1 ч, алкилировали 40 мМ иодацетамидом в темноте в течение 30 мин, после чего образцы подвергали осаждению ацетоном при -20°C в течение 3 часов. После центрифугирования (12 000 g, 5 мин) осадок дважды отмывали холодным ацетоном, высушивали на воздухе и ресуспендировали в 1 М мочеvine на 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0. Переваривание трипсином проводили в два этапа при соотношении фермент:субстрат 1:25. Сначала добавляли половину расчетного количества фермента и инкубировали образцы при 37°C в течение 2 часов при встряхивании (600 об/мин), затем добавляли оставшуюся половину фермента и инкубировали при 37°C в течение 18 часов. Реакцию останавливали добавлением равного объема 1% муравьиной кислоты. Очистку проводили на картриджах с обращенно-фазовым сорбентом Waters Oasis HLB 3 cc (60 мг) в соответствии с инструкцией производителя. Элюаты высушивали на вакуумном центрифужном испарителе.

Обогащение фосфопептидов выполняли с использованием набора High-Select™ TiO₂ Phosphopeptide Enrichment Kit (A32993, Thermo) по протоколу производителя. Обогащенные фосфопептиды ресуспендировали в 35 мкл 2% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты и анализировали методом ЖХ-МС (жидкостная хроматография-масс-спектрометрия)/МС на гибридном масс-спектрометре Orbitrap Fusion™ Tribrid™ (Thermo Scientific™), сопряженном с нано-ВЭЖХ-системой Dionex UltiMate 3000 Binary RSLCnano. Для улавливания проб система ВЭЖХ была оборудована предколонкой Acclaim PepMap 100 (100 мкм x 2 см, C18, 3 мкм), промывку которой проводили растворителем А со скоростью потока 6 мкл/мин в течение 7 мин.

Последующее разделение пептидов проводили на аналитической колонке C18 (внутренний диаметр 100 мкм, длина 25 см, размер частиц 5 мкм, размер пор 18 Å) со скоростью потока 350 нл/мин. Градиент элюирования был следующим: 2%-22% В за 90 мин; 22%-35% В за 10 мин; 35%-90% В за 10 мин; выдерживание 90% В в течение 10 мин (растворитель А: 0,1% муравьиной кислоты в воде; растворитель В: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле).

Анализ пептидов проводили методом зависимо от данных приобретения (англ. data-dependent acquisition). В масс-спектрометре Orbitrap Fusion регистрировали спектры полного сканирования (FTMS1) с разрешением 240 000 (на полувысоте пика) в диапазоне 375-1500 m/z, с целевым значением автоматической регулировки усиления (AGC target) 2E5 и максимальным временем инъекции 50 мс. В течение цикла, не превышающего 3 с, регистрировали спектры фрагментации (ITMS2) в режиме быстрого сканирования с энергией столкновения (HCD NCE) 32 или (CID NCE) 35, шириной изоляции предшественников 1,6 m/z, целевым значением AGC 1E4, максимальным временем инъекции 35 мс. Использовали динамическое исключение предшественников на 35 секунд.

Полученные сырые данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Thermo Scientific™ Proteome Discoverer™ версии 1.4. Идентификацию пептидов проводили, сопоставляя спектры с базой данных Uniprot для *Mus musculus* с использованием поисковой системы SEQUEST HT. Параллельно проводили поиск по реверсивной (англ. decoy) базе данных с установленным уровнем FDR 1% для строгого и 5% для мягкого критерия отбора. Для трипсина допускалось до двух пропущенных точек расщепления. Допуск по массе для предшественников (MS tolerance) устанавливали 10 ppm, для фрагментов (MS/MS tolerance) — 0,6 Da. В качестве фиксированной модификации указывали карбамидометилирование остатков цистеина; в качестве переменных модификаций — окисление метионина, тяжелые изотопные формы аргинина ([13]C6_[15]N4) и лизина ([13]C6_[15]N2) для SILAC, а также фосфорилирование серина, треонина и тирозина.

Количественный анализ SILAC-пар выполняли программным обеспечением Proteome Discoverer™. Профили элюирования легких и тяжелых предшественников определяли с допуском по массе 3 ppm. Для каждого пептида соотношение интенсивностей сигналов в паре SILAC (SILAC ratio) определяли по площади под кривой (AUC) его элюции.

В разделе 4.5 также проводили протеомный анализ кондиционированной среды первичных астроцитов мышцы (обученных опухолевыми клетками или наивных). Образцы кондиционированной среды подвергали концентрации на центрифужных концентраторах, после чего подвергали осаждению ацетоном; осаждение белков проводили при -20°C в течение 3 часов. После центрифугирования (12 000 g, 5 мин) осадок денатурировали и восстанавливали, добавляя

30 мкл раствора, содержащего 6 М мочевины и 20 мМ ДТТ в 150 мМ Трис-НСl (рН 8,0), и инкубировали при 37°C в течение 40 мин, после чего проводили алкилирование 40 мМ иодацетамидом в темноте в течение 30 мин. Перед проведением триптического расщепления реакционную смесь разбавляли в 10 раз 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0) и инкубировали с трипсином (при соотношении фермент:субстрат 1:30) при 37°C в течение 18 часов. Протеолиз останавливали добавлением равного объема 2% муравьиной кислоты, после чего проводили очистку на картриджах с обращенно-фазовым сорбентом Waters Oasis HLB объемом 1 мл в соответствии с инструкцией производителя. Элюаты высушивали на вакуумном центрифужном испарителе.

Приблизительно 1 мкг полученного триптического гидролизата (в 2% ацетонитриле/0,1% муравьиной кислоты) анализировали методом ЖХ-МС/МС на гибридном масс-спектрометре Orbitrap Fusion™ Tribrid™ (Thermo Scientific™), сопряженном с нано-ВЭЖХ-системой Dionex UltiMate 3000 Binary RSLCnano. Разделение пептидов проводили на аналитической колонке C18 (внутренний диаметр 100 мкм, длина 25 см, размер частиц 5 мкм, размер пор 18 Å) со скоростью потока 350 нл/мин. Градиент элюирования был следующим: 3%-22% В за 90 мин; 22%-35% В за 10 мин; 35%-90% В за 10 мин; выдерживание 90% В в течение 10 мин (растворитель А: 0,1% муравьиной кислоты в воде; растворитель В: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле).

Анализ пептидов проводили методом зависимо от данных приобретения. В масс-спектрометре регистрировали FTMS1 с разрешением 120 000 (на полувысоте пика) в диапазоне 350-1500 m/z, с целевым значением автоматической регулировки усиления (AGC target) 2E5 и максимальным временем инъекции 50 мс. В течение цикла, не превышающего 3 с, регистрировали ITMS2 в режиме быстрого сканирования с энергией столкновения (HCD NCE) 34, шириной изоляции предшественников 1,6 m/z, целевым значением AGC 1E4, максимальным временем инъекции 35 мс. Использовали динамическое исключение предшественников на 35 секунд.

Полученные сырые файлы обрабатывали с помощью программного обеспечения Thermo Scientific™ Proteome Discoverer™ версии 1.4. Идентификацию пептидов проводили, сопоставляя спектры с базой данных Uniprot для *Mus musculus* с использованием поисковой системы Sequest HT. Параллельно проводили поиск по реверсивной (decoy) базе данных с установленным уровнем FDR 1% для строгого и 5% для мягкого критерия отбора. Для трипсина допускалось до двух пропущенных точек расщепления. Допуск по массе для предшественников (MS tolerance) устанавливали 10 ppm, для фрагментов (MS/MS tolerance) — 0,6 Da. В качестве фиксированной модификации указывали карбамидометилирование остатков цистеина; в качестве переменных модификаций — окисление метионина, а также фосфорилирование серина, треонина и тирозина.

В дальнейшем ограничили итоговый список белков только теми, которые ассоциированы с ВКМ [98], чтобы исключить контаминирующие ядерные и цитоплазматические белки.

2.6 Окрашивание белков нитратом серебра

Белковые лизаты смешивали с буфером NuPAGE LDS (NP0008; Thermo Fisher Scientific), после чего белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле при 100 В в течение 2 часов. Окрашивание серебром проводили с использованием набора SilverQuest (LC6070; Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя.

2.7 Иммунофлуоресценция и иммуногистохимия

Человеческие или мышинные опухолевые ткани заключали в среду для заливки Optimal Cutting Temperature (OCT, Tissue-Tek; VWR), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до использования. Срезы тканей получали с помощью криостата OTF 5000 (Bright Instruments). Для иммуноокрашивания срезы кратковременно фиксировали в ацетоне, промывали ФСБ, блокировали 20% козлиной/ослиной сывороткой и инкубировали в течение 18 часов с первичными антителами. Срезы троекратно промывали в ФСБ с последующей инкубацией со вторичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре. Срезы снова промывали и заключали в среду ProLong Diamond Antifade Mountant с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI; P36962; Thermo Fisher Scientific), после чего визуализировали с помощью эпифлуоресцентного (DM IRB/E; Leica) или конфокального (LSM880; Zeiss) микроскопов. Окрашивание ГЭ проводили по стандартному протоколу. Анализ изображений проводили в программе ImageJ (National Institutes of Health).

2.8 Иммуноблоттинг

Белковые лизаты смешивали с буфером NuPAGE LDS, после чего белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле при 100 В в течение 2 часов. Белки переносили при 30 В в течение 1 часа при 4°C на поливинилиденфторидную мембрану (IPVH00010; Millipore) с последующей блокировкой в 5% обезжиренном молоке, разведенном в Tris-буферном солевом растворе с 0,05% твина-20 (ТБСТ; P7949; Sigma). Мембраны инкубировали в течение 18 часов при 4°C с первичными антителами. Использовались следующие первичные антитела: Actin (A5441, Sigma), Tubulin (T9026, Sigma), CDK5 (#2506, Cell Signaling Technology), STAT1 (#9172, Cell Signaling Technology), P-STAT1 (Y701) (#9171, Cell Signaling Technology), P-STAT1 (S727) (#9177, Cell Signaling Technology), YAP1 (#12395, Cell Signaling Technology), YY1 (ab109228, Abcam), FGF2 (05-118, Millipore), Irf2bp1 (13698-1-AP, Proteintech), pCDK5 (S159) (sc-12919, Santa Cruz Biotechnology), NLRC5 (DF13672, Affinity Biosciences), pSerine (NB600-405, Novus Biologicals), LAMA5 (CL3118, Novus Biologicals), H2-Kb (MABF3164, Millipore). Мембраны трижды промывали в ТБСТ, добавляли вторичные антитела (Cell Signaling

Technology), конъюгированные с пероксидазой хрена, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Мембраны трижды промывали в ТБСТ. Хемилюминесцентная детекция проводилась с использованием субстрата SuperSignal West Pico PLUS (34580, Thermo Fisher Scientific, USA) цифрового сканера блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences, USA) в высокочувствительном режиме. Денситометрия выполнялась с использованием программы ImageJ software.

2.9 Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени

Для выделения РНК из культур клеток, клетки растворяли в реагенте Тризол (Thermo Fisher Scientific). Для выделения РНК из опухолевых тканей, ткани гомогенизировали режущим гомогенизатором в реагенте Тризол при 4°C.

РНК экстрагировали в соответствии с инструкцией производителя. Качество и количество РНК определяли с помощью спектрофотометра (NanoDrop 3300, Thermo Scientific). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали из 200 нг РНК с использованием набора для обратной транскрипции High-capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystems) по протоколу производителя.

кДНК смешивали с готовыми прямыми и обратными праймерами KiCq Start (Sigma-Aldrich) в присутствии готовой реакционной смеси для ПЦР Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Амплификацию проводили на амплификаторе Stratagene MX3005p в следующем режиме: начальная денатурация при 95°C в течение 10 мин, затем 40 циклов, включающих денатурацию при 95°C в течение 15 с и отжиг/элонгацию при 60°C в течение 1 мин. Специфичность праймеров подтверждали построением кривых плавления для каждой пары праймеров. Все праймеры для количественной ПЦР в реальном времени были приобретены у компании Sigma (KiCqStart®) и имели проприетарные (скрытые для пользователя) последовательности.

Профилирование экспрессии генов цепей ламинина и коллагена выполняли с использованием специализированных планшетов для ПЦР с заранее нанесенными праймерами, специфичными к транскриптам человека (SA Biosciences, QIAGEN).

2.10 Молекулярное клонирование

Для нокдауна гена *LAMA5* в клеточных линиях колоректального рака HT-29 и HCT116 клетки трансдуцировали лентивирусными частицами, экспрессирующими GFP и shРНК, нацеленные на транскрипты *LAMA5* (Mission shRNA, Sigma Aldrich, Сент-Луис, МО). В клетки трансдуцировали пять различных векторных конструкторов, после чего GFP+ клетки сортировали методом проточной цитометрии на клеточном сортере (Beckman Coulter). Эффективность

нокдауна *LAMA5* подтверждали методом иммуноблоттинга. Наиболее эффективное подавление экспрессии *LAMA5* было достигнуто с использованием следующих последовательностей shPHK:
 Sh1:CCGGACTGGATCAGGCTGACTATTTCTCGAGAAATAGTCAGCCTGATCCAGTTTTTTG
 Sh2:CCGGCTCGCCTCATAGGTGTCTATTCTCGAGAATAGACACCTATGAGGCGAGTTTTTTG

Для нокдауна гена *Cdk5* мыши использовали плазмидные клоны MISSION® shRNA TRCN0000278084 (#1) и TRCN0000278085 (#2) от компании Sigma. В качестве соответствующих лентивирусных контролей использовали контрольные короткие шпильки, поставляемые вместе с этими плазмидами. Для экспрессии человеческого гена *CDK5* использовали плазмиду human *CDK5* (#1872, Addgene), вставленную в вектор pCMV-Neo-Bam (#16440, Addgene). Для получения клеток с оверэкспрессией неактивной формы *CDK5* применяли плазмиду human *CDK5* с доминант-негативной мутацией D145N (#1873, Addgene), вставленную в вектор pCMV-Neo-Bam. В качестве контроля использовали пустой вектор.

Для CRISPR-нокаута генов мыши *Irf2bp1* и *Cdk5* применяли протокол General Cloning Protocol лаборатории Zhang. Для *Irf2bp1* использовали две пары crDNA-олигонуклеотидов:

Пара 1 — forward: CACCGGGACGCTTGCACGGACGCCA, reverse: AAAGTGGCGTCCGTGCAAGCGTCCC;

Пара 2 — forward: CACCGCAGGTAGCACCCTGGCGGC, reverse: AAACGCCGCCAGTGGTGCTACCTGC. Для *Cdk5* применяли следующие crDNA-олигонуклеотиды:

Пара 1 — forward: CACCGGGACACCGACTGAGGAACAA, reverse: AAAGTTGTTCTCAGTCGGTGTCCC.

2.11 Анализ киназной активности *in vitro*

Рекомбинантный человеческий белок IRF2BP1 с меткой GST был приобретен у компании Creative Biomart (IRF2BP1-5042H). Рекомбинантный мышинный белок *Irf2bp1* был синтезирован под заказ компанией SinoBiological. Рекомбинантный человеческий комплекс белков *CDK5/p25* был приобретен у компании Abcam (ab60761).

Буфер для реакции (5x) содержал 20 мкл 1М MOPS-буфера (M1254, Sigma), 1 мкл 0,5М ЭДТА (pH 8,0) и 479 мкл дистиллированной воды. Смесь γ -³²P содержала 1,5 мкк γ -³²P-АТФ (BLU002Z250UC, PerkinElmer), 3,75 мкл 10 мМ АТФ (PV3227, Thermo) и 144 мкл водного раствора 25 мМ ацетата магния (M5661, Sigma). Буфер для разведения содержал 1 мкл 1М MOPS-буфера, 100 мкл 0,5М ЭДТА, 50 мкл детергента Brij® 35 (203724, Sigma), 2,5 мл 100% глицерина, 50 мкл 2-меркаптоэтанола и 50 мг бычьего сывороточного альбумина (BSA); объем доводили до 50 мл дистиллированной водой.

Для проведения анализа киназной активности *in vitro* сначала смешивали 2 мкл рекомбинантного человеческого белка *CDK5/p25* с 14,6 мкл буфера для разведения. В чистую

пробирку добавляли 2,5 мкл разведенного белка CDK5/p25, 5 мкл 5х буфера для реакции, рекомбинантный IRF2BP1 (125, 250, 500 или 1000 нг), 10 мкл смеси γ - ^{32} P и доводили объем до 25 мкл дистиллированной воды. В контрольных образцах без фермента рекомбинантный белок CDK5/p25 заменяли на 2,5 мкл ФСБ. В контрольных образцах с RSV в реакционную смесь дополнительно добавляли RSV до конечной концентрации 1000 нМ. Образцы кратковременно встряхивали, центрифугировали и инкубировали 30 мин при 30°C.

Затем образцы смешивали с загрузочным буфером, делили на 2 части и анализировали отдельно с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (англ. SDS-PAGE) по описанному выше протоколу. Первый гель с белками подвергали иммуноблоттингу с использованием антител к CDK5. Второй гель высушивали с помощью гель-сушилki Model 583, соединенной с вакуумным насосом HydroTech™ (Bio-rad), при 80°C в течение 40 мин. Высушенные гели экспонировали с рентгеновской пленкой (30-810L, Genesee Scientific) при –80°C в течение 72 ч, после чего проявляли с использованием автомата для проявления рентгеновских пленок (Konica Minolta).

2.12 Секвенирование РНК единичных клеток

В эксперименте №1 (раздел 3.3) были исследованы мышинные опухоли ПАПЖ после экспериментального лечения гемцитабином в качестве монотерапии и в комбинации с ингибиторами ПРiX и целикоксибом. Мышей подвергали гуманной эвтаназии через 15 дней после ортотопической инъекции клеток КРС и пройденного курса лечения, после чего опухоли ПАПЖ были эксплантированы. Для пробоподготовки отбирали по пять репрезентативных опухолей сопоставимого размера из каждой группы. Из каждой опухоли выделяли по 0,1–0,2 г ткани и объединяли в один общий образец. Образцы механически гомогенизировали и инкубировали в растворе ферментов при 37°C в течение 45 мин. Состав ферментной смеси: коллагеназа D, 2,5 мг/мл (Sigma-Aldrich); диспаза II, 2 мг/мл (Sigma-Aldrich); ДНКазa I, 0,2 мг/мл (Stem Cell Technology).

В эксперименте №2 (раздел 4.5) были исследованы церебральные метастазы клеток линии EO771.Br3.GFP с нокдауном гена *Cdk5* и без такового. Мышей подвергали гуманной эвтаназии по достижению конечной точки. Для пробоподготовки отбирали по три репрезентативные опухоли сопоставимого размера из каждой группы. Из каждой опухоли выделяли по 0,1–0,2 г ткани и объединяли в один общий образец. Образцы гомогенизировали аналогично эксперименту №1, однако вместо коллагеназы и диспазы использовали более щадящий фермент папаин. В дальнейшем образцы из эксперимента №1 и №2 подвергались одним и тем же процедурам описанным ниже.

Полученную клеточную суспензию пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм и промывали 5 мл DMEM. Для лизиса эритроцитов к образцу добавляли 5 мл лизирующего буфера, инкубировали в течение 5 мин, после чего реакцию останавливали добавлением 5 мл DMEM. После центрифугирования проводили подсчет клеток и готовили суспензию с концентрацией 1 млн клеток/100 мкл в стерильном ФБС, содержащем 0,5% БСА и 2 мМ ЭДТА.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 450, 1 мкл на 1 мл ФБС, в течение 30 мин при 4°C, промывали ФБС с 0,5% БСА и подвергали сортировке. Для каждого образца отбирали по 100 тыс. жизнеспособных клеток, ресуспендировали в 100 мкл ФБС с 0,04% БСА (концентрация 1000 клеток/мкл) и немедленно проводили подготовку библиотек для секвенирования.

Данные секвенирования демультиплексировали и выравнивали на референсный геном mm10 с использованием пакета Cell Ranger (v7.0.0). Полученные матрицы счетов UMI анализировали в среде Seurat (v4.3.0). На этапе контроля качества исключали клетки, экспрессирующие менее 200 генов или имеющие долю митохондриальных транскриптов более 20%. После фильтрации данные нормализовали на размер библиотеки и проводили log2-преобразование. Для снижения размерности и кластеризации использовали 2000 генов с наибольшей дисперсией, которые масштабировали. Проводили анализ главных компонент (англ. Principal component analysis, PCA) на основе этих генов, и первые 20 главных компонент использовали для визуализации методом UMAP, а также для построения графа ближайших соседей с последующей кластеризацией алгоритмом Лувена.

Для идентификации маркерных генов каждого кластера применяли анализ дифференциальной экспрессии. Аннотацию кластеров проводили вручную путем сопоставления актуальных маркеров с каноническими маркерами типов клеток или с маркерами из референсных наборов данных scRNA-seq, представленных на ресурсе Azimuth. Принадлежность к опухолевым клеткам дополнительно подтверждали путем анализа вариаций числа копий генов (CNV) с использованием пакета InferCNV (v1.10.1).

Для выявления субпопуляций внутри основных типов клеток (макрофаги, Т-клетки, нейтрофилы, опухолевые клетки, фибробласты) проводили независимый анализ для каждого типа. На первом этапе исключали потенциальные дубликаты, экспрессирующие маркеры других клеточных типов. Затем для каждого типа клеток отбирали 2000 генов с высокой дисперсией, которые использовали для снижения размерности и кластеризации по методике, аналогичной описанной выше. Для характеристики функционального профиля субпопуляций по их маркерным генам проводили анализ обогащения генных онтологий с использованием пакета clusterProfiler (v4.2.2). Аннотацию некоторых субпопуляций (например, Т-клеток) выполняли с

привлечением данных литературы. Для субпопуляций с известными сигнатурами вычисляли сигнатурный score как среднее значение экспрессии генов сигнатуры.

Для оценки значимых различий в пропорциях клеточных типов и субпопуляций между экспериментальными группами использовали точный тест Фишера с последующей поправкой Бенджамини-Хохберга на множественное тестирование.

2.13 Эксперименты с первичными астроцитами

Эксперименты с кондиционированной средой «обученных» астроцитов проводили следующим образом. Астроциты и опухолевые клетки культивировали до 70% конfluence в отдельных чашках диаметром 150 мм. Кондиционированную среду от опухолевых клеток собирали через 48 часов и центрифугировали при 1000 об/мин. Астроциты промывали ФСБ, подвергали голоданию по сыворотке (15–20 мин), затем добавляли кондиционированную среду от опухолевых клеток и инкубировали 72 часов для получения астроцитов, «обученных» в условиях метастазов мозга. После этого среду заменяли свежей средой и продолжали культивирование астроцитов в течение 48–72 часов. Итоговую среду от «обученных» астроцитов собирали, центрифугировали (1000 об/мин) и добавляли (5 мл) к опухолевым клеткам в планшетах на 6 лунок для анализа динамики экспрессии Cdk5.

2.14 Популяционное исследование состава микробиома у пациентов с РЛ

Исследование микробного состава мокроты провели у 190 пациентов с патоморфологически подтвержденным РЛ (147 мужчин, 43 женщины, средний возраст $61,6 \pm 0,59$ года). Все пациенты получали лечение в Кемеровском областном онкологическом диспансере. Контрольную группу составили 107 условно-здоровых добровольцев без заболеваний бронхолегочной системы в анамнезе (88 мужчин, 19 женщин, средний возраст $54,7 \pm 1,01$ года).

Все участники заполнили анкету, содержащую демографические данные, информацию о месте проживания (город/село), профессиональных вредностях, хронических заболеваниях, приеме лекарств, курении и употреблении алкоголя. Курение классифицировали как: «курящие» (активные курильщики), «некурящие» (никогда не курившие) и «бывшие курильщики» (бросили ≥ 1 года назад). Интенсивность курения оценивали с помощью показателя «пачка/лет». Для пациентов с РЛ дополнительно регистрировали данные клинико-гистологического анализа и стадию заболевания по классификации TNM. Демографические и клинические характеристики представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Клиникопатологические характеристики исследуемых групп

Показатели	РЛ, N=190	Контроль, N=107
Возраст, лет	61,6*	54,7
Пол (n/%): Мужчины Женщины	147/77 43/23	88/82,2 19/17,8
Статус курения (n/%): Курящие Некурящие Бывшие	113/59,5 65/34,2 12/6,3	48/44,8 39/36,5 20/18,7
Среднее значение «пачка/лет»	35,3*	27,2
Хронические заболевания (%): Сердечно-сосудистые Бронхиты ХОБЛ Желудочно-кишечные Диабет Астма Ожирение	56,0 31,0 45,0 15,0 2,0 6,0 8,0	39,0 0 0 21,0 8,0 2,0 2,0
Гистологический тип РЛ (n/%): Плоскоклеточный Аденокарцинома Мелкоклеточный Прочие	65/34,2 74/38,9 10/5,3 41/21,6	- - - -
TNM [#] (n / %): I, II III, IV	102/54,0 88/46,0	- -

*Достоверно различается от значения для контроля. РЛ – рак легкого, ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких.

Критериями включения в исследования были возраст ≥ 40 лет, предоставление достаточного объема мокроты и подписанное информированное согласие. Критериями исключения были острые или хронические состояния, ограничивающие участие в исследовании; прием антибиотиков за 4 недели до сбора материала; невозможность получения образца мокроты или отказ от согласия. Исследование было одобрено комиссией по биомедицинской этике Кемеровского государственного университета (протокол № 17/2021 от 05.04.2021) и проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.

2.15 Сбор образцов мокроты

Образцы мокроты (2-3 мл) получали от участников спонтанным продуктивным кашлем. Для минимизации контаминации микрофлорой ротовой полости и носоглотки участники

предварительно высмаркивались и полоскали рот. Индуцирование мокроты не применяли. Образцы помещали в стерильные контейнеры, замораживали при -20°C , транспортировали в лабораторию и хранили при -80°C до выделения ДНК.

2.16 Выделение ДНК, подготовка библиотек и секвенирование

Бактериальную ДНК экстрагировали из образцов мокроты с использованием набора FastDNA Spin Kit For Soil. Концентрацию и чистоту ДНК измеряли на флуориметре Qubit[®]. Для последующих этапов использовали образцы ДНК с концентрацией >15 нг/мкл, объемом >20 мкл и соотношением A260/A280 в диапазоне 1,8–2,0.

Библиотеки для секвенирования готовили путем амплификации гипервариабельного региона V3–V4 гена 16S рРНК в соответствии с протоколом Illumina. После двухэтапной ПЦР с праймерами широкого спектра и индекс-содержащими праймерами получали ампликоны длиной ~630 п.н. Библиотеки очищали с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP. В каждом эксперименте использовали отрицательный и положительный (D6305; ZYMO Microbial Community Standards) контроли.

Объединенные в эквимольном пул библиотеки денатурировали и секвенировали на системе Illumina MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit V3 (600 циклов) с добавлением 10% PhiX-ДНК. Качество библиотек оценивали на биоанализаторе Bioanalyzer 2100. Образцы, не прошедшие контроль качества на этапах выделения ДНК или подготовки библиотек, исключали из анализа.

2.17 Таксономический анализ по результатам секвенирования

Анализ данных секвенирования проводили в программной среде QIIME2. После контроля качества и создания библиотеки последовательности кластеризовали в операционные таксономические единицы (OTE) с 99% порогом сходства с использованием референсных баз данных Greengenes (v13-8) и SILVA (v138). Синглтоны, т.е. OTE, представленные одним прочтением, удаляли.

Альфа-разнообразие оценивали по количеству OTE и индексу Шеннона. Бета-разнообразие анализировали с помощью филогенетического метода UniFrac. Для проверки статистической значимости различий между образцами использовали тест PERMANOVA (Adonis). Все выборки для расчета индексов нормализовали до 1070 прочтений на образец.

Для выявления таксонов-биомаркеров, ассоциированных с группами, применяли линейный дискриминантный анализ (LefSe). Статистическую обработку проводили в пакете STATISTICA.10. Сравнение количественных показателей между группами выполняли с помощью U-критерия Манна–Уитни. Корреляцию между обилием таксонов и интенсивностью курения оценивали с помощью коэффициента Спирмена. Во всех случаях множественных

сравнений применяли поправку FDR. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$ (после поправки FDR, где применимо).

2.18 Клиническое исследование влияния витамина Е на выживаемость больных с меланомой

Все процедуры в исследованиях пациентов проводились в соответствии с Хельсинкской декларации следуя рекомендациям, одобренным локальным этическим комитетом Онкологического центра им. М.Д. Андерсона. Проводился ретроспективный анализ баз данных, сформированных из электронной медицинской карты. Для защиты конфиденциальности пациентов использовались деидентифицированные данные. Сбор защищенной информации о здоровье не производили. Лечение не проводилось, риск для субъектов не превышал минимальный. Информированное согласие пациентов не требовалось. Информация, связанная с пациентами, была анонимизирована перед дальнейшей обработкой.

Клиническое исследование по анализу данных проводилось на пациентах с онкологическими заболеваниями, наблюдавшихся в Онкологическом центре им. М.Д. Андерсона с 2016 по 2021 год. Исследуемая группа включала пациентов с гистопатологически подтвержденной меланомой. Анонимизированные агрегированные данные были собраны с использованием функции SlicerDicer в электронной медицинской карте Epic системы Онкологического центра им. М.Д. Андерсона. С помощью Epic SlicerDicer были идентифицированы все пациенты с онкологическими заболеваниями, у которых в диагнозе визита, диагнозе по счету или активном списке проблем указывались злокачественные опухоли (меланома). Далее с помощью Epic SlicerDicer были выделены пациенты, получавшие лечение антителами к PD-1 (пембролизумаб, ниволумаб или цемиплимаб) или антителами к PD-L1 (дурвалумаб, атезолизумаб или авелумаб) в период исследования. Для анализа влияния распространенных пищевых компонентов и пищевых добавок на исходы у пациентов 2715 пациентов с меланомой, получавших лечение анти-PD-1/PD-L1 в период с 2016 по 2019 год, были разделены на 15 подгрупп в зависимости от принимаемых ими добавок во время иммунотерапии ИИКТ. Процент летальности в каждой подгруппе рассчитывался на основе числа пациентов в подгруппе и средней летальности. Были извлечены данные о пациентах, включая возраст, пол, стадию заболевания и выживаемость (жив/мертв). Значимой систематической ошибки в сборе и анализе клинических данных не ожидалось.

Для анализа общей выживаемости и ответа на терапию анти-PD-1/PD-L1 пациенты, наблюдавшиеся в Онкологическом центре им. М.Д. Андерсона в период 2016–2021 годов, были разделены на две подгруппы: пациенты, принимавшие витамин Е, и пациенты, не принимавшие ни витамин Е, ни поливитамины. Данные о выживаемости были обновлены по состоянию на 31

августа 2021 года. Среди больных меланомой пациенты, принимавшие только поливитамины, были выделены в отдельную подгруппу для анализа выживаемости. Из анализа были исключены пациенты, получавшие более одного курса ИИКТ, а также пациенты без данных о дате начала ИИКТ. Для анализа общей выживаемости из системы Eris были извлечены дата смерти пациента и дата начала ИИКТ. Время выживаемости рассчитывалось как количество дней между этими датами. Унивариантный анализ выживаемости и мультивариантный анализ выживаемости (регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса) проводились с использованием IBM SPSS Statistics версии 23.

2.19 Манипуляции с миелоидными клетками

В разделе 4.2 выделяли первичные мышинные моноциты, гранулоциты, и макрофаги. Моноциты/макрофаги ($CD11b+/Gr1^{mid/low}$) и гранулоциты ($CD11b+/Gr1^{high}$) выделяли из суспензий одиночных клеток, полученных из мышинных метастазов печени, методом проточной цитометрии на основе экспрессии маркеров CD11b и Gr1. Выделенные миелоидные клетки культивировали в среде RPMI, содержащей 2% эмбриональной бычьей сыворотки, в течение 72 часов, после чего собирали кондиционированную среду.

В разделе 4.3. изучали дендритные клетки человека, полученные из фракции моноцитов. Лейкофракции доноров-добровольцев были предоставлены Центром донорства крови Онкологического центра им. М.Д. Андерсона. От всех участников было получено письменное информированное согласие. Для получения дендритных клеток, периферическую кровь здоровых доноров разделяли на градиенте плотности Ficoll и выделяли мононуклеарные клетки. Клетки высевали в культуральную посуду и инкубировали во инкубаторе в течение 1 часа для адгезии моноцитов. После удаления среды с неприлипшими клетками, адгезированные моноциты собирали путем интенсивного отмывания пипетированием. Для дифференцировки моноцитов в дендритные клетки очищенные моноциты в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл культивировали в среде для дендритных клеток, дополненной 800 Ед/мл человеческого GM-CSF (PeproTech, 300-03) и 500 ед/мл человеческого интерлейкина-4 (PeproTech, 200-04). Среду с цитокинами меняли каждые 3 дня. После 7-дневной инкубации, когда большинство моноцитов дифференцировалось в незрелые дендритные клетки, клетки пересевали в свежую среду для дендритных клеток, содержащую 50 нг/мл TNF (PeproTech, 300-01A) или 100 нг/мл липополисахарида (InvivoGen, tlrl-eblps), и инкубировали в течение еще одного дня для получения зрелых дендритных клеток.

В разделе 4.4 исследовали нейтрофилы, выделенные из крови мышей или опухолевых тканей метастазов KPP. Для сортировки нейтрофилов ($CD45^+/CXCR2^+$) из интактной печени и метастазов печени сперва получали суспензию одиночных клеток печени. Клетки окрашивали

антителами CD45-PE и CXCR2-APC, после чего сортировали на высокоскоростном клеточном сортере (Beckman Coulter). Для выделения нейтрофилов высокой и низкой плотности из крови мышей использовали описанный ранее протокол [223]. Цельную кровь собирали в гепаринизированные шприцы путем пункции сердца. Кровь разбавляли в ФСБ, содержащем 0,5% БСА, и центрифугировали при 22°C и 700G в течение 30 мин на дисконтинуальном градиенте Histopaque (Sigma) (плотности 1,119 и 1,077). Фракции высокой и низкой плотности ресуспендировали в гипотоническом лизирующем буфере, после чего окрашивали соответствующими антителами для проточной цитометрии.

2.20 Экспериментальные терапевтические агенты

Росковитин чистотой 99,94% (HY-30237, MedChemExpress) разводили в ДМСО до концентрации 100 мг/мл. Раствор аликвотировали и хранили при –80°C. Перед каждым введением аликвоту росковитина или ДМСО размораживали и смешивали в следующих пропорциях: 5% росковитина или ДМСО (472301, Sigma), 40% PEG300 (202371, Sigma), 5% Твин-80 (P1754, Sigma) и 50% стерильного физиологического раствора. Готовый раствор (100 мг/кг росковитина в ~170 мкл) вводили мышам дважды в сутки перорально (с интервалом 12 ч), начиная с 4-го дня после интракаротидной инъекции и до конечной точки эксперимента.

Ингибитор GalF2 (Galaxy Biotech LLC) вводили внутрибрюшинно в дозе 0,1 мг каждые 48 часов со 2–3-й недели после инъекции опухолевых клеток.

Доксорубин (G-4000, LC laboratories) вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг один раз в неделю начиная с 10-го дня после инъекции опухолевых клеток.

Гемцитабин вводили внутрибрюшинно в дозе 333 мг/кг один раз в неделю. ПРІХ вводили методом принудительного кормления в дозе 8,26 мг/кг трижды в сутки. Целекоксиб вводили методом принудительного кормления в дозе 82 мг/кг, дважды в сутки.

Антитело α PD-1 мышам вводили 200 мкг внутрибрюшинно в дни 6, 9 и 12 после интракаротидной инъекции (клон RMP1–14, полученный из гибридомы RMP1–14).

α M-CSF (клон 5A1, BioXcell) вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг трижды в неделю.

Деплецию нейтрофилов мыши проводили путем введения 12,5 мкг/кг антитела α Ly6G (клон 1A8, BD Biosciences) внутрибрюшинно каждые 24 часа.

Деплецию CD8⁺ Т-клеток мыши проводили путем введения 100 мкг антитела α CD8b (клон 53–5.8; BE0223, BioXcell) внутрибрюшинно в дни 0 и 3 после интракаротидной инъекции.

Вакцинацию ГВАКЦ проводили путем подкожного введения вакцины мышам на 1, 4, и 7 сутки после инъекции опухолевых клеток.

Витамин Е ((+)- α -Токоферол, тип VI, T1539, Sigma) разводили в растворителе (10% этанола в стерильной воде) и вводили перорально один раз в сутки в дозе 50 мг/кг массы тела

(100 мкл при 10 мг/мл в сутки), что соответствует 400–600 мг/сутки для человека массой 60 кг. Терапию витамином Е начинали на 4-й день после инъекции опухолевых клеток и продолжали до конечной точки эксперимента.

В качестве контроля использовали иммуноглобулин класса G или растворитель ДМСО в эквивалентной дозе.

2.21 Биоинформатический анализ

Для работ, описанных в разделе 3.5, были выбраны все гены, кодирующие белки, входящие в состав ВКМ (<http://matrisomeproject.mit.org/>). Уровни экспрессии этих генов анализировали в исследованиях, в которых сравнивали аденокарциному легкого, молочной железы, яичника, желудка, пищевода или колоректального тракта с образцами нормальной ткани. Данные были получены из базы данных Oncomine (www.oncomine.org/resource/login.html), где результаты различных исследований приведены к общей нормализации, что позволяет проводить сравнительный мета-анализ. Для каждого типа ЗНО медианный ранг генов (при сравнении «опухоль vs нормальная ткань») был подвергнут мета-анализу с использованием статистических алгоритмов Oncomine. Поправку на множественное сравнение p-значений проводили путем расчета FDR по методу Стори и Тибширани [224]. Диаграммы Венна строили и анализировали с помощью онлайн-инструмента InteractiVenn [225].

В разделе 3.5 анализ выживаемости выполняли с использованием следующих инструментов и баз данных: KM-Plotter для рака яичника, желудка и легкого; GraphPad Prism — для анализа данных по колоректальному раку, раку почки, мочевого пузыря и предстательной железы, полученных из cBioPortal или набора данных GSE17538. KM-Plotter представляет собой верифицированную ручную базу данных, которая обновляется дважды в год и позволяет проводить анализ выживаемости одновременно по нескольким наборам данных GEO (использованные наборы указаны в таблице 6). Во всех анализах применяли зонды JetSet [226] для оптимального выбора проб. Пациентов делили на две группы на основе медианного значения экспрессии 9-генной сигнатуры. Для наборов данных по КРР группу с высокой экспрессией определяли по пороговому значению z-скора $> +1$. Кривые безрецидивной выживаемости строили по методу Каплана-Мейера и сравнивали с помощью лог-рангового критерия, рассчитывая отношение рисков и соответствующее значение p. Построение кривых выполняли в программе GraphPad Prism v.7. Многофакторный регрессионный анализ Кокса проводили для наборов данных по раку легкого, желудка и колоректального рака с использованием пакета SPSS.

В разделе 4.4 расстояние между нейтрофилами и сосудами было определено с использованием программы Imaris V8.1.

В разделе 4.5 исследовали уровни экспрессии генов семейства CDK5 в церебральных метастазах человека и мыши. Для анализа специфичной для метастазов в головной мозг активации CDK у человека использовали данные РНК-секвенирования [227], полученные из первичных РМЖ и соответствующих им спаренным метастазам. Экспрессию 26 членов семейства CDK в метастазах мозга нормализовали относительно их экспрессии в парных первичных опухолях. Затем для каждого CDK рассчитали медианное значение повышенной экспрессии в метастазах в сравнении с РМЖ, а полученные величины ранжировали в соответствии с кратностью изменения.

Для анализа специфичной для церебральных метастазов активации CDK в мышинной модели использовали данные, полученные от ортотопических опухолей РМЖ и спаренных церебральных метастазов из линии MDA-MB-231.Br3 (набор данных GSE19184). Экспрессию 14 членов семейства CDK в метастазах нормализовали относительно их экспрессии в соответствующих первичных опухолях. Для исключения влияния экспрессии CDK со стороны клеток мыши в анализ включали только зонды, специфичные к человеческим последовательностям.

2.22 Статистический анализ

Статистический анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 8.0. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (если не указано иное). Статистически значимыми считали различия при $P < 0,05$. Для анализа выживаемости применяли лог-ранговый критерий (англ. log-rank test). Для сравнения нескольких групп использовали однофакторный (англ. one-way) или двухфакторный (англ. two-way) дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим множественным сравнением по Даннетту (англ. Dunnett's test) или Тьюки (англ. Tukey's test). Для сравнения двух групп с использованием независимых выборок применяли U-критерий Манна–Уитни (англ. Mann–Whitney U-test). Для сравнения двух групп с использованием парных выборок применяли парный t-критерий Стьюдента (англ. paired Student's t-test). Корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена (англ. Spearman's rank correlation coefficient).

ГЛАВА 3 КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПРИ ЗНО: РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ, ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

3.1 Разработка методики обогащения внеклеточного матрикса опухоли для сравнительного протеомного анализа

Для комплексного исследования роли ВКМ в патогенезе ЗНО была выбрана модель печеночных метастазов КРР, поскольку они формируют ярко выраженную фиброзную капсулу по периферии опухолевых узлов. Эта капсула состоит из плотного ВКМ, продуцируемого главным образом активированными опухоль-ассоциированными фибробластами и ЗКП.

На первом этапе исследования была поставлена задача отработать и оптимизировать методику выделения белка ВКМ высокой степени очистки, с целью проведения исследований ВКМ опухолевых тканей. За основу была взята оригинальная методика Naba et al. [98], которую было решено улучшить децеллюляризацией ткани в растворе мягких детергентов непосредственно перед биохимическим обогащением, а также обработкой ультразвуковым дезинтегратором в сочетании с нуклеазами (Бензоназа) для разрушения нуклеиновых кислот в образцах ВКМ. Последовательность этапов обогащения ВКМ в новой оптимизированной методике представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Оригинальная схема пробоподготовки мышинной печени (контрольной или с метастазами KPP) для обогащения ВКМ с последующим протеомным анализом

Название этапа	Воздействие на этапе	Конечная цель этапа
Децеллюляризация	1% додецилсульфат натрия и 0,01% гидроксида аммония в дважды дистиллированной воде	Удаление клеточного компонента из тканей печени
Гомогенизация	Разрушение структуры ВКМ с помощью режущего ручного гомогенизатора	Физическая дезинтеграция крупных волокон ВКМ
Обработка ультразвуком	УЗ-дезинтеграция ВКМ	Разрушение мелких фрагментов ВКМ и предварительное разрушение нитей ДНК
Удаление нуклеиновых кислот	Бензоназа	Окончательное разрушение нитей ДНК
Обогащение ВКМ	Фракционирование образцов набором CNMCS Compartmental Protein Kit	Обогащение белков внеклеточного матрикса путем отделения белковых фракций клеточной мембраны, цитоплазмы, ядра, и цитоскелета
Дегликозилирование	Пептид-N-гликозидаза F	Удаление гликозидных остатков от белков
Восстановление	Мочевина 8 М, бикарбонат аммония 100 мМ, дитиотреитол 10 мМ	Денатурация белка, восстановление дисульфидных мостиков
Алкилирование	Йодацетамид 25 мМ	Модификация цистеиновых остатков для предотвращения образования дисульфидных связей и стабилизации структуры белка
Преципитация белка	Метанол, хлороформ	Отделение белковой фракции от других небелковых компонентов
Протеолиз	Трипсин, лизил-эндопептидаза С	Расщепление белков на пептиды, минимизация пропущенных разрезов
ЖХ-МС	Acquity LC сопряженная с масс-спектрометром Thermo LTQ Orbitrap Elite	Протеомный анализ

Децеллюляризация тканей печени мыши позволила эффективно удалить клеточные компоненты ткани, как видно из окрашивания по ГЭ (Рисунок 6). Более того, децеллюляризация мышинной печени без последующего биохимического обогащения показала заметное увеличение фракции белков высокой молекулярной массы (>100 кДа) в сравнении с образцом гомогенизированной печени без децеллюляризации (Рисунок 7). Последовательное применение децеллюляризации и биохимического обогащения позволило значительно очистить образец, удалив из него практически все белки низкой молекулярной массы (<100 кДа).

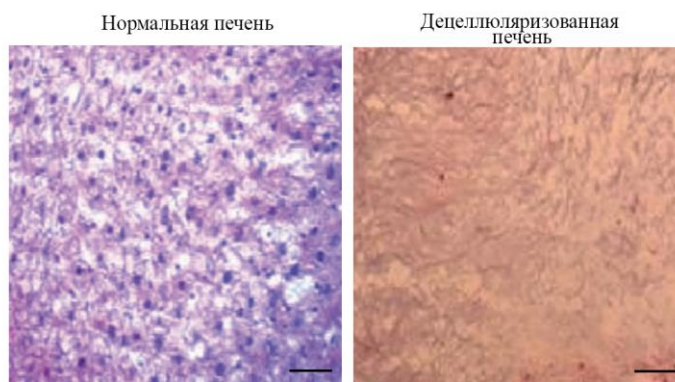


Рисунок 6 – Окраска ГЭ образцов интактной (слева) и децеллюляризированной (справа) мышинной печени. Шкала: 100 мкм.

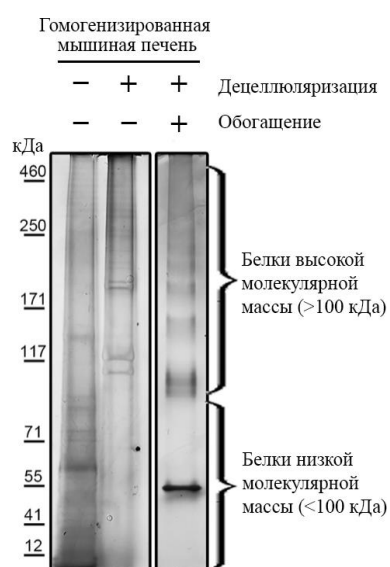


Рисунок 7 – Общий белок был выделен из мышинной интактной печени (слева), децеллюляризированной печени (в центре) и децеллюляризированной печени с последующим биохимическим обогащением (справа). Образцы разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием нитратом серебра. Области с высокой и низкой молекулярной массой учитывались как >100 кДа и <100 кДа, соответственно.

После оптимизации и отработки методики обогащения ВКМ, методом масс-спектрометрии был проанализирован качественный и количественный состав ВКМ мышинных метастазов печени, индуцированных мышинной линией KPP MC38 (N=4). Контролем послужили образцы ВКМ, полученные из нормальной мышинной печени. Метод главных компонент показал статистически достоверные различия между качественным составом белков ВКМ в исследуемых группах (Рисунок 8).

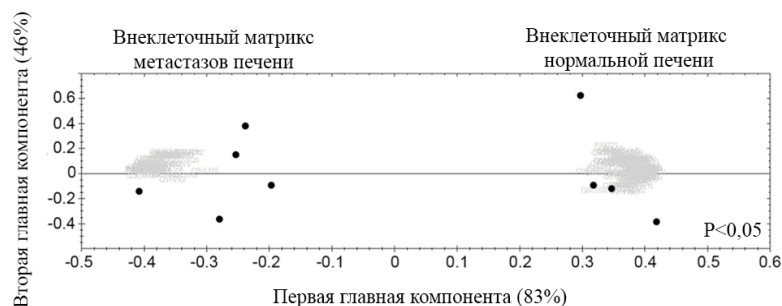


Рисунок 8 – Нормальную мышиную печень или метастазы линии МС38, извлеченные из печени мыши, подвергали децеллюляризации и обогащению ВКМ. После анализа методом тандемной масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии с безметковой количественной оценкой (N=3 биологических повтора) был проведен анализ главных компонент относительной количества белка между группами ($P < 0,05$). Процент дисперсии указан в скобках. Серые «облака» обозначают отдельные белки, тогда как черные точки означают биологические повторы.

Качественный анализ образцов здоровой и пораженной метастазами печени выявил 140 белков ВКМ. Белков, не принадлежащих к ВКМ было обнаружено гораздо больше – 2188. Это может свидетельствовать о возможной необходимости проводить еще более глубокую пробоподготовку образцов с целью дополнительной очистки от контаминированных компонентов других клеточных фракций (таблица 4).

Таблица 4 – Количество белков ВКМ, обнаруженных (минимум 2 уникальных пептида) в нормальной мышинной печени и метастазах линии МС38, извлеченных из печени мыши (в совокупности)

Раздел	Категория	Количество белков
Белки ВКМ	Гликопротеины	50
	Протеогликаны	9
	Коллагены	24
	Регуляторы ВКМ	31
	Белки, связанные с ВКМ	18
	Факторы секретома	8
Прочие белки	Не ВКМ	2188

Для выявления ключевых различий между группами, был применен подход безметочной количественной оценки (англ. label-free quantification (LFQ)). Это количественный анализ, при котором измерение и сравнение уровней белков выполняется на основе их собственной интенсивности пиков в масс-спектрометрических данных. Используя LFQ были обнаружены белки ВКМ, дифференциально представленные в исследуемых образцах (Рисунок 9). Так, гликопротеины ВКМ Thbs3, Sparc, и Emilin2 были достоверно повышены в метастазах печени в 4,9, 5,6, и 7,4 раза, соответственно. Среди протеогликанов печеночные метастазы демонстрировали значимое увеличение количества версикана (Vcan) – в 8,2 раза по сравнению с контролем. Коллагены в целом были снижены в печеночных метастазах КРР, тогда как среди секретируемых факторов белок S100a6 в опухолевой ткани повышался в 46,3 раза по сравнению с нормальной печенью. Среди белков, ассоциированных с ВКМ, четыре молекулы были повышены в печеночных метастазах: Lgals3 ((в 19,8 раза), Lgals7 (в 15,1 раза), Anxa1 (в 6,9 раза) и Anxa2 (в 4,2 раза). Таким образом, на этом этапе исследования были установлены белки ВКМ, наиболее широко распространенные в метастазах печени в сравнении со здоровым органом.

Категория ВКМ	Белок	Кол-во пептидов	P	Нормализованное количество белка										Кратность изменения
				Печень					Метастазы					
				1	2	3	4	1	2	3	4	5		
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
	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										
S100a4		6	0.0004											14.2
S100a11		12	0.0000											6.6
Anqptl6		2	0.0031											-10.2

Рисунок 9 – Тепловая карта, отображающая 27 белков ВКМ, содержание которых достоверно различалось между интактной печенью мыши и печенью с метастазами МС38 (двухфакторный дисперсионный анализ, $P < 0,01$). Белки были отобраны на основе

идентификации как минимум 1 пептида и порога кратности изменения >3 , а затем ранжированы в соответствии с их соответствующей категорией ВКМ и величиной кратности изменения.

3.2 Оценка воздействия лучевой терапии на процессы ремоделирования внеклеточного матрикса методом протеомного анализа

На следующем этапе исследования была проведена оценка ремоделирования ВКМ опухоли под воздействием лечения. Известно, что лучевая терапия вызывает значительные изменения в опухолевом микроокружении, однако ее влияние на перестройку ВКМ опухоли остается недостаточно изученным. Для изучения этих процессов использовали мышиную модель КРР, вызванную подкожной инъекцией клеток линии MC38. Мыши были разделены на две группы: одна группа получила однократное облучение в дозе 10 Гр (локальное облучение опухолевого очага), вторая прошла процедуру псевдооблучения (Рисунок 10).

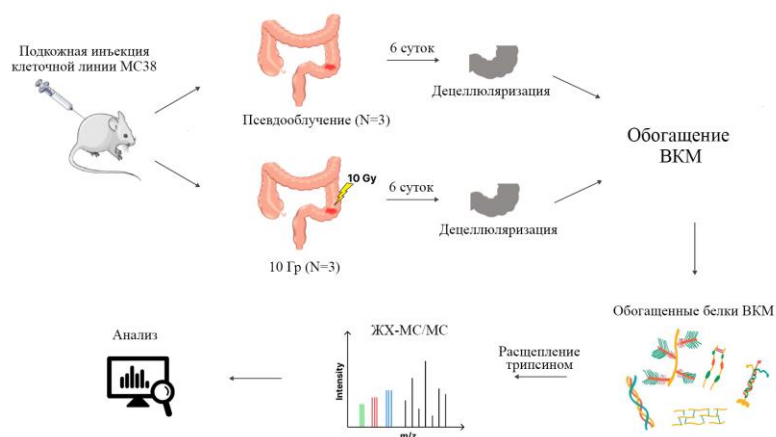


Рисунок 10 – Дизайн эксперимента.

Проведенный протеомный анализ выявил, что после однократного облучения происходят значительные изменения в белковом составе ВКМ. В группе, исследованной через 6 дней после облучения, было обнаружено 727 белков, что почти в два раза превышает общее количество белков в контрольной группе (376). Все белки из контрольной группы входили в состав протеома экспериментальной группы, которая была дополнена 351 белком (Рисунок 11).

Далее проводили классификацию белков ВКМ по системе, предложенной Naba et al. В контрольной группе присутствовало 42 белка ВКМ, в то время как в группе облучения их количество возросло до 87. Сравнительный анализ функционального распределения белков выявил существенные сдвиги. После облучения доля ключевых белков ВКМ увеличилась до 62%, в основном за счет роста доли гликопротеинов с 21% до 33% и увеличения абсолютного количества коллагенов с 12 до 16. Также значительно возросло количество протеогликанов с 4

до 10. Среди ВКМ-ассоциированных белков заметно увеличилась доля регуляторов с 7% до 14% и факторов секретома с 2% до 6% (Рисунок 11).

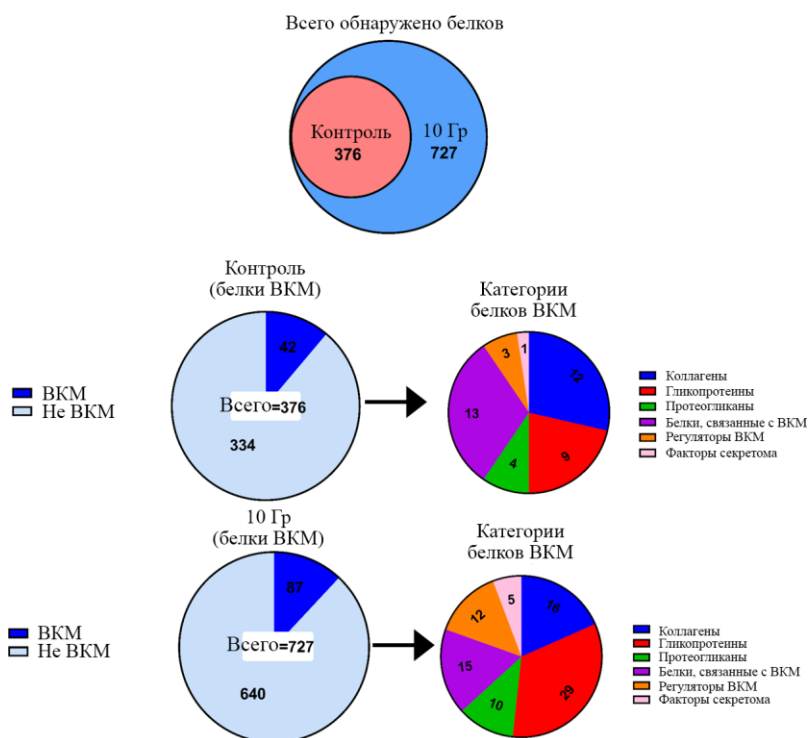


Рисунок 11 – Качественный анализ белков по результатам протеомного анализа обогащенной фракции ВКМ из опухолей контрольных (псевдооблученных) и облученных в дозе 10 Гр мышей.

Количественный анализ экспрессии выявил 12 белков с достоверно повышенным уровнем в группе облучения (Рисунок 12). Среди коллагенов значимое увеличение показали Col4a2 (кратность изменения 37), Col4a1 (кратность изменения 30) и Col12a1 (кратность изменения 27). Среди гликопротеинов повышение экспрессии наблюдалось у Fbn1 (кратность изменения 632), Tgfb1 (кратность изменения 33), Fgg (кратность изменения 32), Fga (кратность изменения 28), Postn (кратность изменения 21), Fgb (кратность изменения 19) и Tnc (кратность изменения 18). В категории протеогликанов увеличение выявлено для Bgn (кратность изменения 18), а среди ассоциированных белков — для Anхб (кратность изменения 14). Распределение этих изменений по категориям было избирательным: наибольшая доля повышенных белков в группе облучения наблюдалась среди гликопротеинов (78%), тогда как среди коллагенов и протеогликанов значимые изменения выявлены у 25% белков каждой категории, а среди ВКМ-ассоциированных белков - у 8%.

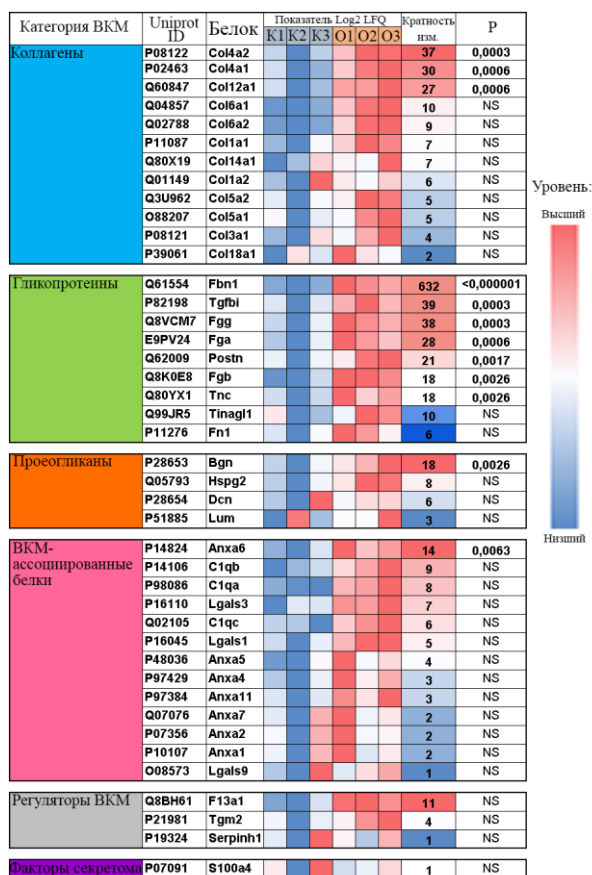


Рисунок 12 – Количественный анализ белков по результатам протеомного анализа обогащенной фракции ВКМ из опухолей контрольных (K1, K2, K3) и мышей, облученных в дозе 10 Гр (O1, O2, O3).

Таким образом, было показано значительное увеличение синтеза структурных компонентов ВКМ опухолевого микроокружения под воздействием облучения. Это может объясняться активацией опухоль-ассоциированных фибробластов и их трансформацию в миофибробласты, характеризующиеся синтетическим фенотипом и образованием десмопластической стромы.

3.3 Терапевтическое нацеливание на сигнальные пути активированных фибробластов при ЗНО

Поскольку активированные фибробласты играют ключевую роль в формировании стромального компонента опухолевой ниши, на следующем этапе исследования была поставлена задача определить ключевые молекулярные пути, вовлеченные в патологическую активацию этих мезенхимальных клеток. Для решения этой задачи в качестве рабочих моделей были выбраны спонтанный и ортотопический ПАПЖ. Это обоснованно тем, что активированные

фибробласты, происходящие из резидентных фибробластов поджелудочной железы, а также звездчатых клеток поджелудочной железы, могут составлять до 90% стромального компонента ПАПЖ. Кроме того, они создают гиповаскулярное микроокружение с высоким интерстициальным давлением, что защищает раковые клетки от воздействия лекарственных препаратов. Недавно было высказано предположение, что химиотерапевтические препараты первой линии способны изменять молекулярный профиль фибробластов, что усиливает химиорезистентность опухоли, что особенно актуально для ПАПЖ, при которой резистентность возникает у подавляющего большинства пациентов. При этом до конца не изучена роль стромального компонента в целом и фибробластов в частности в развитии химиорезистентности опухоли.

Чтобы определить молекулярные пути, активированные в раковых клетках ПАПЖ, была получена 3D культура опухолевых клеток, выделенных из спонтанных опухолей мышей линии КРС (Рисунок 13).

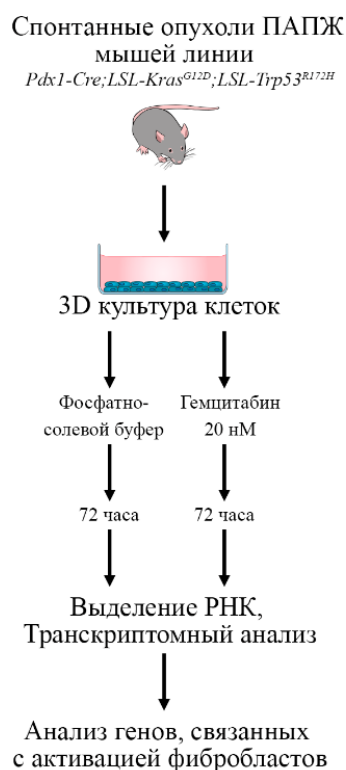


Рисунок 13 – Дизайн *in vitro* эксперимента

3D культуры раковых клеток обрабатывали ФСБ (контроль) гемцитабином (химиотерапевтический препарат первой линии для лечения ПАПЖ), после чего клетки подвергались полнотранскриптному секвенированию с последующим поиском дифференциально экспрессированных генов. Было показано, что молекулярный путь связанный

с yes-associated protein (YAP) был значимо повышен при экспонировании гемцитабином (Рисунок 14А, Б).

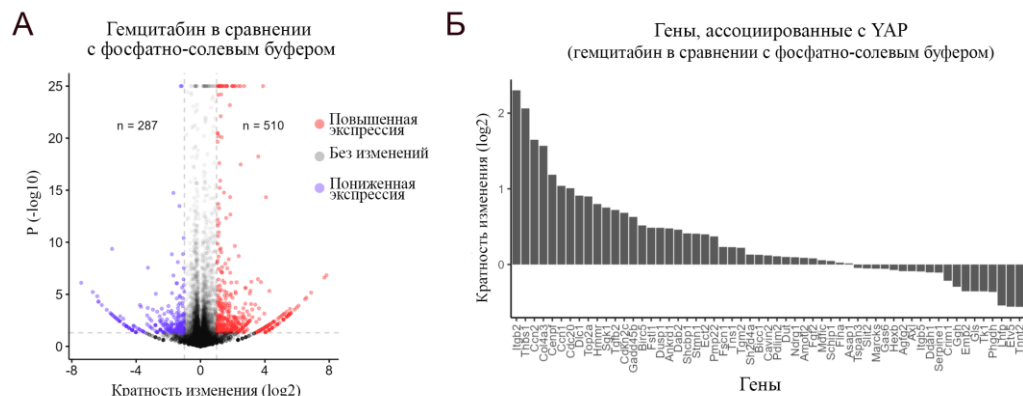


Рисунок 14 — Результаты транскриптомного исследования. А) Вулкан-плот, отображающий дифференциальную экспрессию генов между клетками линии КРС, обработанными ФСБ и гемцитабином (20 нМ, 72 ч), в трехмерной культуре. Б) Изменения уровня экспрессии (кратность изменения) генов-мишеней сигнального пути YAP1 (57 генов) в клетках линии КРС, обработанных гемцитабином (20 нМ, 72 ч), в трехмерной культуре по сравнению с контрольными клетками.

Молекулярный путь YAP является важным медиатором стрессового ответа и химиорезистентности. Ключевым событием, запускающим эти процессы, служит транслокация транскрипционного фактора YAP1 – ключевого компонента YAP-пути – из цитоплазмы в ядро. Экспериментальная проверка методом иммуноблоттинга подтвердила транслокацию YAP1 в ядро опухолевых клеток линии КРС после обработки гемцитабином в дозировке 20 нМ (Рисунок 15). Таким образом, была показана роль адаптации клеток ПАПЖ к стрессу, вызванному воздействием химиотерапии.

3D культура клеток линии КРС

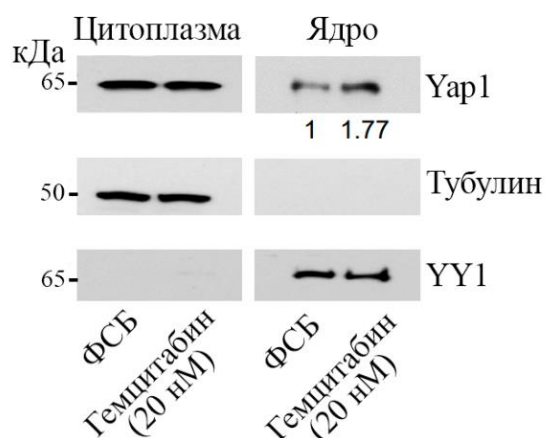


Рисунок 15 – Иммуноблот-анализ содержания белка Yarp1 в цитоплазматической и ядерной фракциях, а также тубулина (маркер цитоплазматических белков, контроль качества фракционирования) и YU1 (маркер ядерных белков, контроль качества фракционирования) в клетках КРС, культивируемых в 3D и обработанных гемцитабином (20 нМ) или ФСБ в течение 1 часа. Приведены репрезентативные данные двух независимых экспериментов.

Звездчатые клетки и фибробласты поджелудочной железы широко вовлечены в ответ ПАПЖ на стресс [228]. Автором была выдвинута гипотеза о том, что активированные раковыми клетками фибробласты могут секретировать фактор или группу факторов, вызывающих химиорезистентность клеток ПАПЖ. Для ее экспериментальной проверки фибробласты линии NIH 3T3 обрабатывали кондиционированной средой клеток ПАПЖ, которые культивировали в стрессовых (0% ФБС) и нормальных условиях (10% ФБС), после чего определяли дифференциально представленные белки фибробластов методом обратного фазового протеинового массива. Среди белков, достоверно повышенных в группе «стресса» (кратность изменения >1.5 в сравнении с контролем) были обнаружены Е-кадгерин, SF-2, Туго-3, и циклооксигеназа-2 (COX-2) (Рисунок 16). Среди этих молекул COX-2 является ключевым посредником в воспалительных реакциях, и может влиять на химиорезистентность опухоли [229].

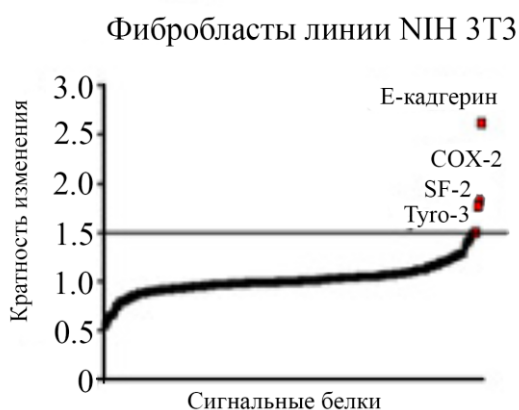


Рисунок 16 – Анализ методом обратного фазового протеинового массива (RPPA) фибробластов линии NIH 3T3, обработанных кондиционированной средой от клеток ПАПЖ Panc02, выращенных в среде с 10% или 0% фетальной бычьей сывороткой. По оси Y представлена кратность изменения белков группы 0% в сравнении с группой 10%. Выделены белки с кратностью изменения выше 1,5.

Для преодоления химиорезистентности в экспериментальной модели ПАПЖ была разработана стратегия двойного таргетинга — нацеливание на стромальный (ингибирование СОХ-2) и опухолевый компоненты (YAP1). Конечной целью такого двойного таргетирования была сенситизация раковых клеток ПАПЖ к воздействию гемцитабином. В качестве ингибитора СОХ-2 был выбран препарат целекоксиб (Цел), одобренный в США для лечения остеоартрита, ревматоидного артрита, анкилозирующего спондилита и других воспалительных состояний. В качестве ингибитора YAP1 был выбран Протопорфирин IX (ПРИХ) — органическое соединение из класса порфиринов, входящее в состав гемоглобина, миоглобина и большинства цитохромов, обеспечивая основу для связывания железа в гем. ПРИХ способен напрямую связываться с YAP1 и нейтрализовать его взаимодействие с ключевым ДНК-связывающим транскрипционным фактором TEAD [230]. Кроме того, в онкологии способность ПРИХ избирательно накапливаться в опухолевых клетках используют по двум основным направлениям: для визуализации опухоли и для ее целенаправленного уничтожения. ПРИХ является фотосенсибилизатором, 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 [230, 231]. Главный метод применения - фотодинамическая терапия, где ПРИХ выступает в роли фотосенсибилизатора. Принцип действия основан на том, что клетки опухоли поглощают ПРИХ, после чего при его облучении лазером определенной длины волны в них выделяются активные формы кислорода, разрушающие злокачественные ткани. В эксперименте было исследовано 70 мышей с ортотопически введенными клетками ПАПЖ линии Panc02. Животные были рандомизированы на группы, получавшие экспериментальную терапию в различных комбинациях (таблица 5), при этом эффективность лечения оценивали путем построения кривых выживаемости по методу Каплана-Мейера.

Таблица 5 – Препараты, использованные в эксперименте *in vivo* для комбинированной терапии ПАПЖ

Полное название препарата	Сокращенное название препарата	Механизм действия	Экспериментальные группы	Схема лечения
Гемцитабин	Гем	Химиотерапевтический препарат	Монотерапия, комбинированная терапия с ПРИХ и Цел	333 мг/кг, ИП, раз в неделю
Протопорфирин IX	ПРИХ	Промежуточный продукт в биосинтезе гема, ингибитор активности YAP	Комбинированная терапия с Гем и Цел	8,26 мг/кг, гаваж, трижды в день
Целекоксиб	Цел	Ингибитор COX-2, нестероидный противовоспалительный препарат	Комбинированная терапия с Гем и ПРИХ	82 мг/кг, гаваж, дважды в день

YAP – yes-associated protein, COX-2 – циклооксигеназа-2.

Было показано, что монотерапия гемцитабином, Цел, или ПРИХ не приводила к улучшению выживаемости мышей в сравнении с контрольной группой, которая не получала лечения (Рисунок 17). Комбинация гемцитабина и ПРИХ приводила к достоверному увеличению выживаемости мышей в сравнении с группой, получающей гемцитабин (Рисунок 17). При этом комбинация гемцитабина, Цел и ПРИХ приводила к 100% выживаемости мышей в течение 60 суток после начала лечения (Рисунок 17). Таким образом, была показана клиническая значимость двойного таргетирования сигнальных путей активированных фибробластов и клеток ПАПЖ.

Ортотопическая мышинная модель ПАПЖ
клеточной линии Panc02

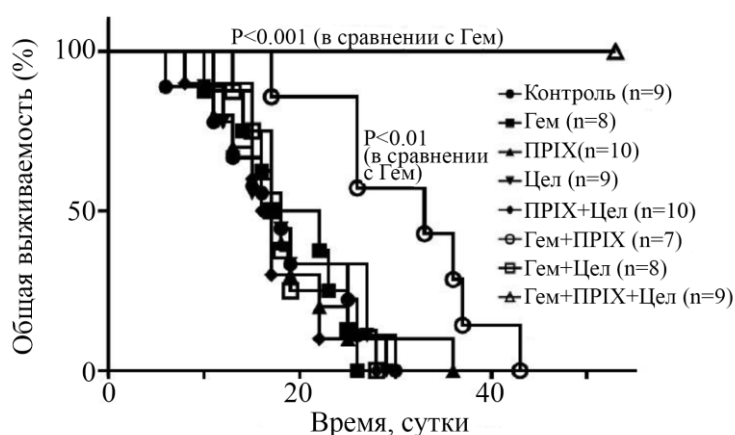


Рисунок 17 – Анализ выживаемости по Каплану-Майеру для мышей с ортотопической моделью ПАПЖ поздней стадии (клеточная линия Panc02), получавших указанное экспериментальное лечение. Для сравнения кривых использован Log-Rank test.

Для оценки фибробластного компонента в исследуемых группах, опухоли поджелудочной железы в экспериментальных группах подвергались иммуноокрашиванию на подоплагин — трансмембранный О-гликозилированный гликопротеин активно экспрессируемый опухоль-ассоциированными фибробластами [232]. В то время как монотерапия гемцитабином приводила к достоверному увеличению фибробластов опухолевого микроокружения, использование этого химиотерапевтического агента в комбинации с Цел и ПРИХ снижало количество опухоль-ассоциированных фибробластов до уровня, сопоставимого со значениями в контрольной группе (Рисунок 18А, Б).

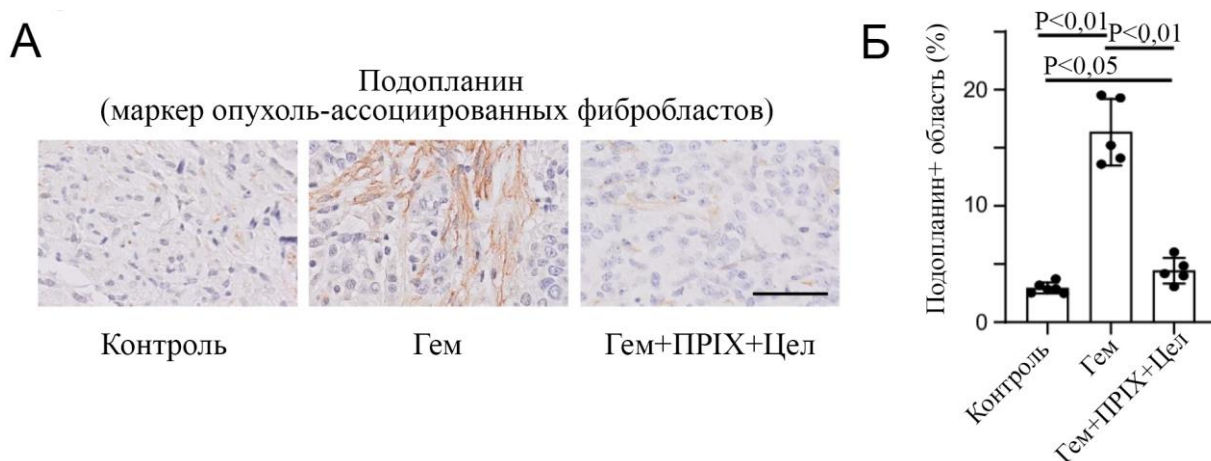


Рисунок 18 – Анализ подопланина. А) Иммуногистохимическое окрашивание на подоплагин (маркер опухоль-ассоциированных фибробластов) в опухолях ПАПЖ линии КРС при указанных вариантах лечения. Б) Полуколичественный анализ. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Т-критерий Стьюдента. N=5–6 биологических повторов. Шкала: 50 мкм.

Для комплексного анализа влияния экспериментальной терапии на опухолевое микроокружение было проведено секвенирование РНК единичных клеток на тканях ПАПЖ по результатам лечения (Рисунок 19).

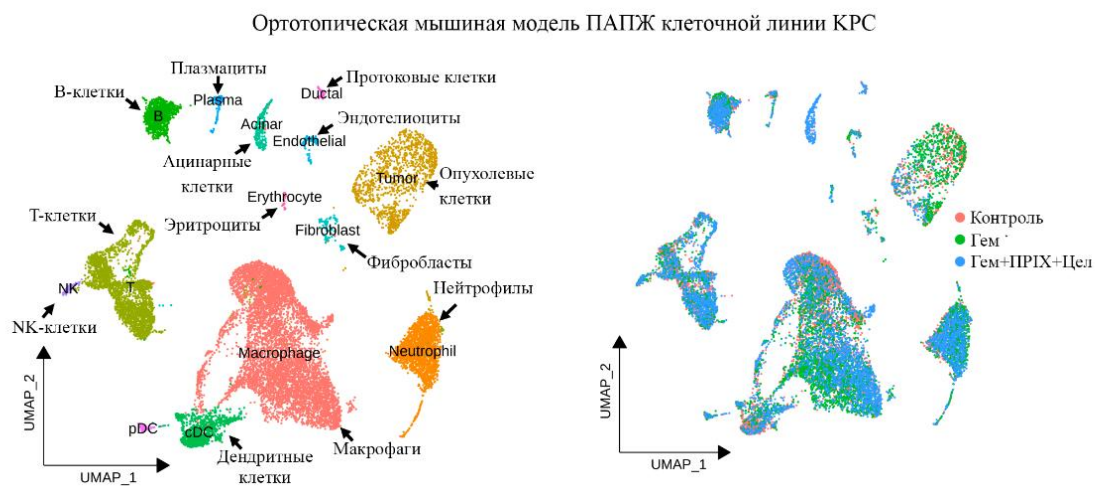


Рисунок 19 – Характеристика клеточных популяций в ПАПЖ мыши. Визуализация в координатах UMAP результатов кластеризации 16445 клеток, полученных из опухолевых образцов КРС, получавших контроль, гемцитабин (Гем) или комбинированную терапию (Гем + ПРИХ + Цел). Окраска кластеров соответствует основным типам клеток (слева) или группам лечения (справа).

Количество фибробластов в целом оказалось выше в группе, получавшей лечение монотерапией, однако комбинированное экспериментальное лечение снижало их количество в опухоли, что согласуется с иммуноокрашиванием на подоплатин (Рисунок 20).

После аннотации отдельных популяций фибробластов было выявлено, что лечение гемцитабином увеличивало количество фибробластов, включая воспалительные фибробласты, опухоль-ассоциированные фибробласты, и миофибробласты, по сравнению с группой контроля, в то время как комбинированная терапия снижала этот эффект (Рисунок 21).

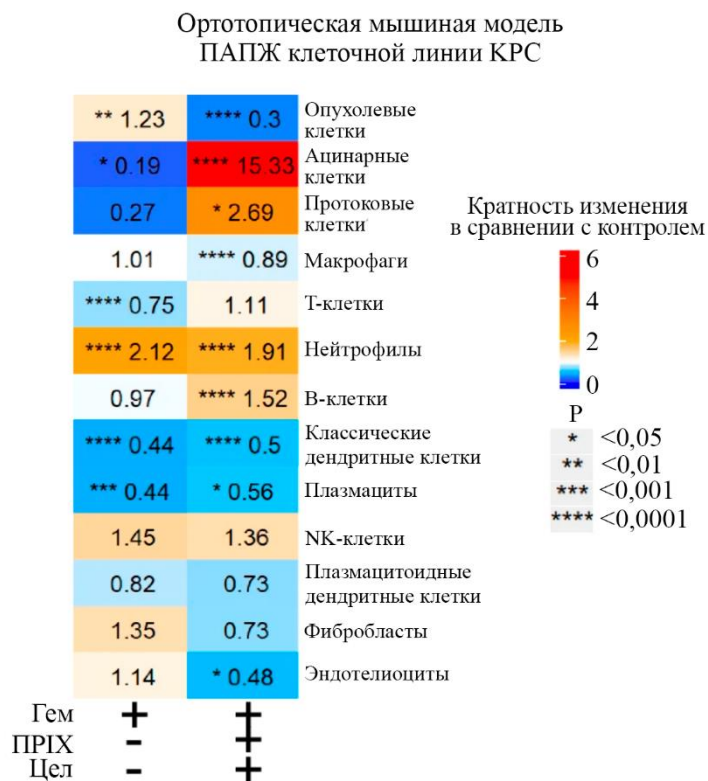


Рисунок 20 – Изменение количества клеток разных типов в опухолях ПАПЖ линии КРС при лечении Гем или комбинацией Гем + ПРИХ + Цел в сравнении с контролем. Статистическая значимость оценена посредством точного критерия Фишера.

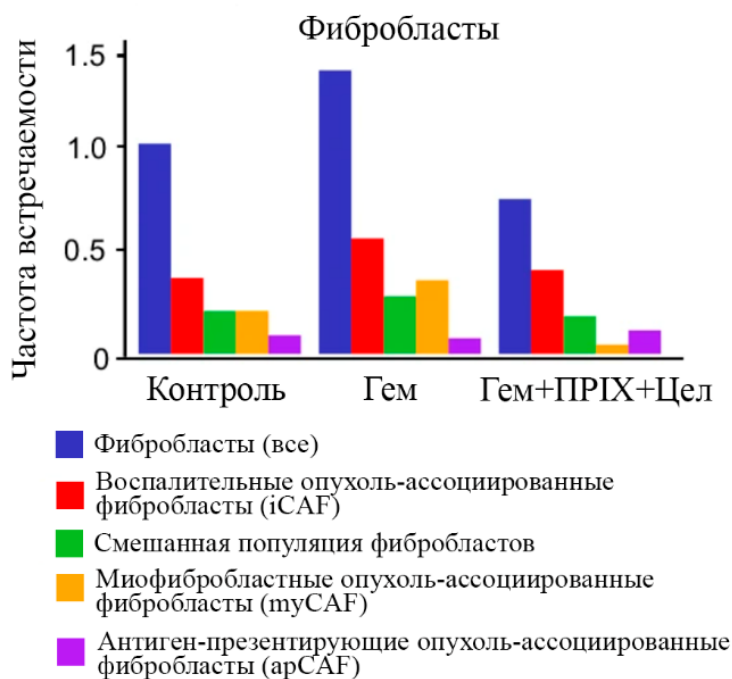


Рисунок 21 – Распределение фибробластов и их субпопуляций в опухолях КРС после указанных вариантов лечения

Лечение гемцитабином не влияло на общее число макрофагов в опухолевом окружении, однако комбинированная терапия приводила к снижению макрофагов в ПАПЖ (Рисунок 20). Кроме того, лечение гемцитабином также существенно влияло на другие миелоидные клетки, включая увеличение ($\sim 2\times$) нейтрофилов и снижение ($\sim 50\%$) дендритных клеток по сравнению с контролем (Рисунок 20). В частности, комбинированная терапия и монотерапия гемцитабином усиливали инфильтрацию нейтрофилов в ПАПЖ по сравнению с контролем (Рисунок 20). Кроме того, комбинированная терапия незначительно увеличивала общее количество В- и Т-лимфоцитов по сравнению с гемцитабином (Рисунок 20). Примечательно, что гемцитабин значительно снижал антиген-опытные CD8⁺ Т-клетки, включая истощенные Т-клетки (Тех), эффекторные Т-клетки памяти (Тем) и плазмциты (или эффекторные В-клетки), что указывает на подавление адаптивного иммунного ответа гемцитабином (Рисунок 22А, Б). Интересно, что комбинированная терапия снижала количество регуляторных Т-клеток (Трег) по сравнению с контролем, в то время как гемцитабин увеличивал Трег. Комбинированная терапия также увеличивала NK-подобные Т-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки (Рисунок 22А).

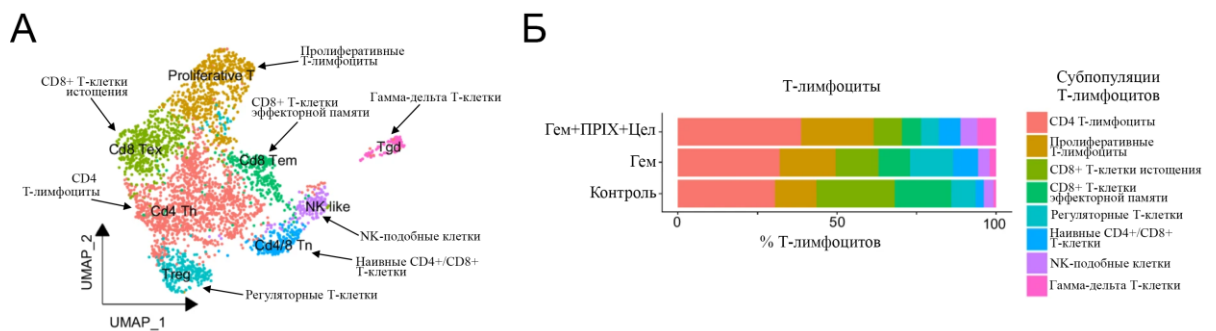


Рисунок 22 – Анализ Т-лимфоцитов. А) Визуализация в UMAP-координатах 2695 Т-лимфоцитов, выделенных из опухолей ПАПЖ линии КРС, получавших лечение контролем, гемцитабином (Гем) и комбинацией Гем + ПРИХ + Цел. Цветовое кодирование соответствует субпопуляциям Т-лимфоцитов. Б) Доля отдельных субпопуляций Т-клеток в опухолевых образцах КРС при указанных вариантах лечения

В совокупности полученные данные scRNA-seq указывают на то, что совместное таргетирование YAP1 и COX-2 перестраивает микроокружение опухоли в ПАПЖ, особенно фибротическую среду, что может способствовать усилению ответа на гемцитабин.

3.4 Анализ вклада белков внеклеточного матрикса опухолевого происхождения в прогрессию ЗНО

Проведенные в предыдущем разделе исследования позволили расширить понимание роли стромального компонента, в первую очередь опухоль-ассоциированных фибробластов, в развитии ЗНО. Однако существуют данные, свидетельствующие о том, что опухолевые клетки могут сами активно синтезировать и секретировать компоненты ВКМ, что служит основанием для предположения, что некоторые из этих белков ВКМ могут способствовать опухолевому росту и инвазии.

Для оценки роли собственно опухолевых клеток в формировании стромального компонента опухолевого микроокружения была использована *in vivo* модель ксенографтов печеночных метастазов КРР. Использование видоспецифичных ПЦР праймеров к человеческим генам в данной модели позволило количественно оценить вклад раковых клеток в синтез ключевых структурных компонентов ВКМ, таких как ламинины и коллагены. В эксперименте были проанализированы эксплантационные метастазы печени человеческих линий КРР НТ-29, НСТ116 и LoVo. Было показано, что раковые клетки в значительной мере депонировали некоторые цепи ламинина, в частности $\alpha 5$, $\beta 1$ и $\gamma 1$, которые формируют макромолекулу ламинин-511, а также другие (Рисунок 23). При этом цепи коллагена опухолевыми клетками практически не экспрессировались (Рисунок 23).

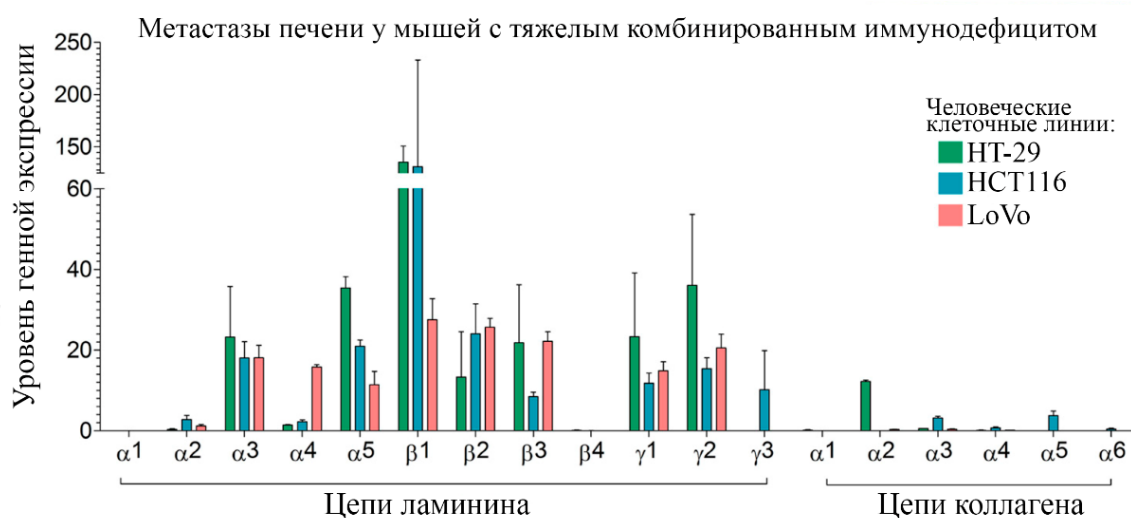


Рисунок 23 – Профиль экспрессии мРНК всех известных генов цепей ламинина и коллагена IV типа в РНК, выделенной из ортотопических печеночных метастазов линий КРР человека НТ-29 (зеленый), НСТ116 (синий) и LoVo (розовый), с использованием специфичных праймеров к человеческим генам

Иммуногистохимическое окрашивание на общий ламинин подтвердило значительные уровни этого белка в метастазах всех исследуемых клеточных линий, а также в печеночных метастазах КРР человека (Рисунок 24).

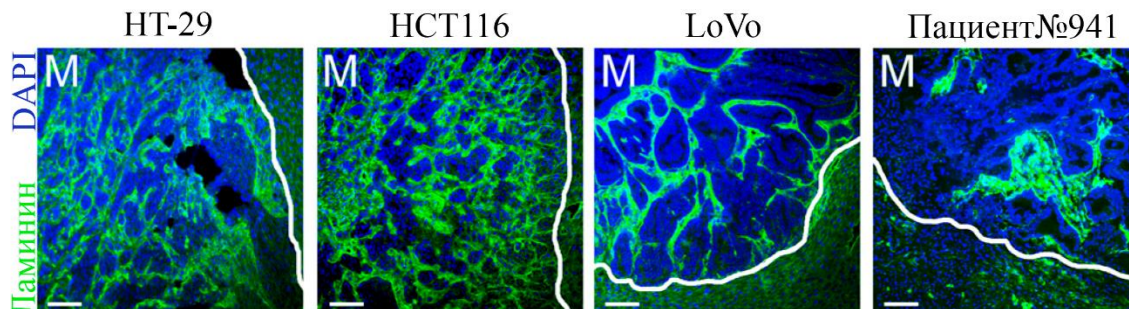


Рисунок 24 – Иммунофлуоресцентное окрашивание ламинина в печеночных метастазах, сформированных с использованием линий КРР человека HT-29, HCT116 и LoVo, а также в образце резекции печеночного метастаза человека. Контрастное окрашивание ядер DAPI. Литера «М» обозначает зону метастазов, белая линия разграничивает пораженный участок и здоровую ткань. Шкала: 100 мкм

Поскольку ламинин является основным компонентом базальной мембраны, пространственная локализация ламинина во многом совпадала с маркером эндотелия CD31 (Рисунок 25).

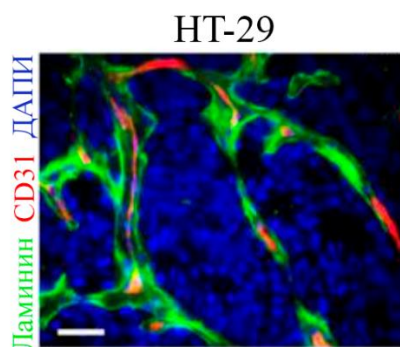


Рисунок 25 – Иммунофлуоресцентное окрашивание печеночных метастазов линии HT-29 с использованием моноклональных антител к указанным маркерам. Шкала: 30 мкм

Дальнейший вектор исследования был направлен на ламинин-511, поскольку экспрессия его структурных компонентов (цепи ламинина $\alpha 5$, $\beta 1$ и $\gamma 1$) была наиболее выражена в опухолевых клетках метастатического КРР. Было показано, что ламинин $\alpha 5$ (LAMA5) высоко ко-локализован с микрососудистым руслом опухоли как в первичном КРР, так и в печеночных метастазах

пациентов (Рисунок 26). Корреляционный анализ Спирмена показал прямую зависимость между областью покрытия LAMA5 и капиллярной сетью опухоли у 30 пациентов с печеночными метастазами КРР (Рисунок 27А, Б). Эти результаты позволили предположить вовлеченность LAMA5 в опухолевый ангиогенез.

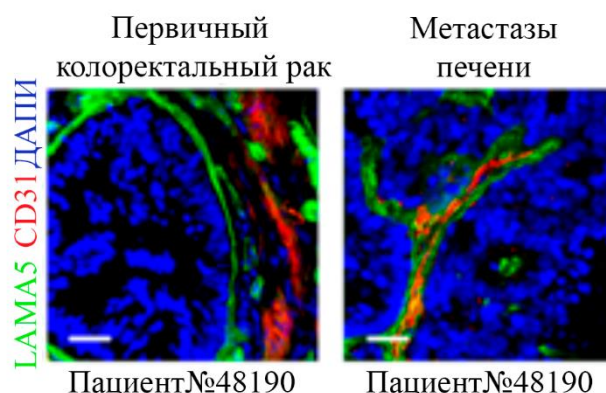


Рисунок 26 – Иммунофлуоресцентное окрашивание архивных образцов резекции первичного КРР человека и печеночных метастазов с использованием антител к LAMA5 (зеленый) и CD31 (красный). Шкала: 40 мкм

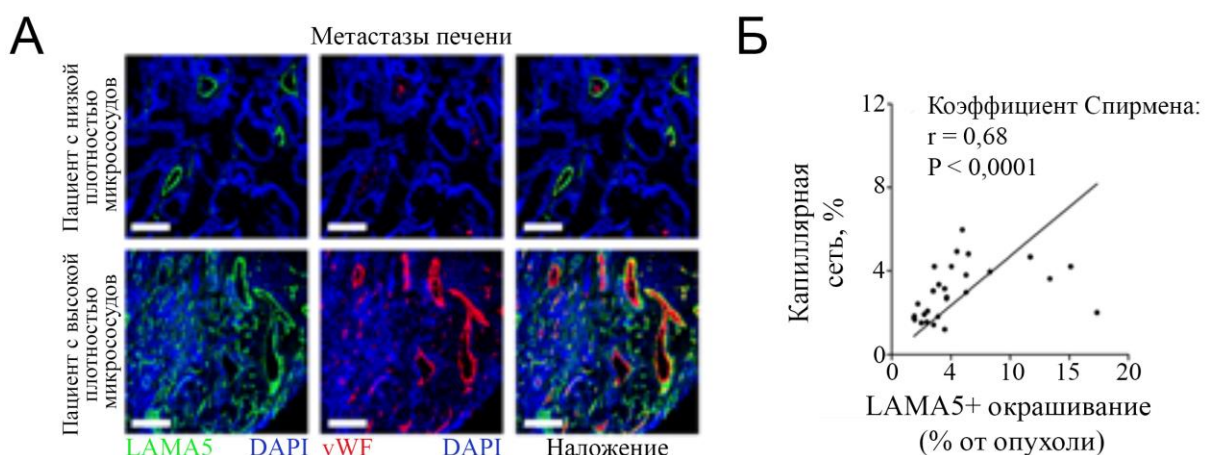


Рисунок 27 – Экспрессия LAMA5 коррелирует с сосудистой плотностью опухолевого микроокружения. А) Иммунофлуоресцентное окрашивание печеночных метастазов человека пациента с низкой плотностью микрососудов (верхний ряд) и пациента с высокой плотностью микрососудов (нижний ряд) с использованием антител к LAMA5 (зеленый) и фактору Виллебранда (красный). Шкала: 100 мкм. Б) Анализ корреляции Спирмена 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, для каждого пациента было проанализировано не менее 5 полей зрения

Далее были изучены потенциальные механизмы, регулирующие экспрессию LAMA5 в клетках KPP. Учитывая ранее показанную способность миелоидных клеток поддерживать рост печеночных метастазов посредством стимуляции ангиогенеза [233], была выдвинута гипотеза о том, что воспалительные сигналы от этих клеток могут индуцировать экспрессию ламинина в опухолевых клетках. Биоинформатический анализ анализа обогащения генных наборов (англ. gene set enrichment analysis, GSEA) показал обогащение миелоидных генных сигнатур [234] в опухолях с повышенным уровнем экспрессии ламинина-511 ($\alpha 5$, $\beta 1$ и $\gamma 1$), в то время как генные сигнатуры, ассоциированные с инфильтрацией Т- или В-клеток, обогащены не были (Рисунок 28). Это указывает на возможную связь экспрессии ламинина-511 с миелоидными клетками.

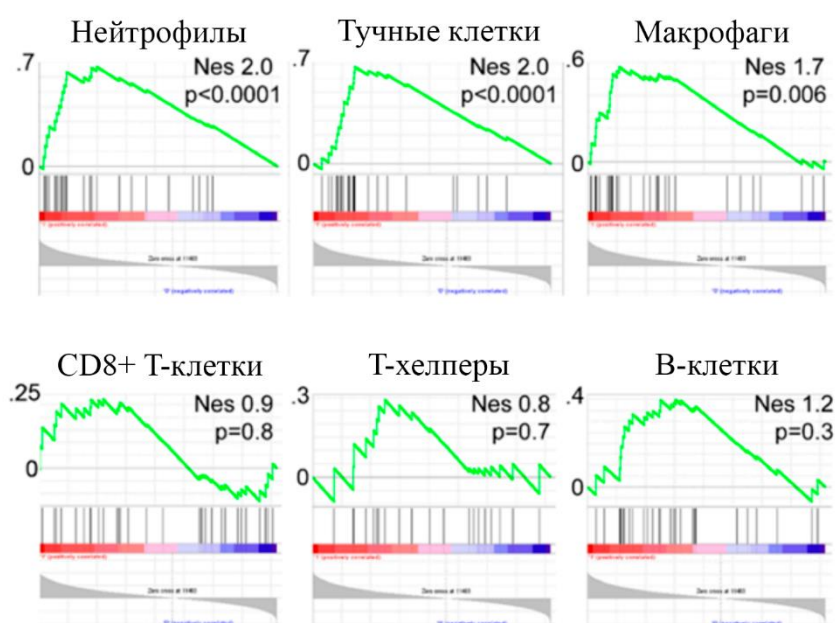


Рисунок 28 – GSEA-анализ степени обогащения иммунных клеточных сигнатур у пациентов с KPP (массив TCGA) экспрессирующих высокие уровни *LAMA5*, *LAMB1* и *LAMC1*

Чтобы экспериментально проверить эту гипотезу было проанализировано влияние кондиционированной среды от CD11b⁺ миелоидных клеток на экспрессию LAMA5 в клетках KPP. Было установлено, что экспрессия LAMA5 достоверно повышалась в клетках, выращенных в среде, кондиционированной миелоидными клетками, выделенными из метастазов, тогда как среда от наивных миелоидных клеток такого эффекта не оказывала (Рисунок 29A).

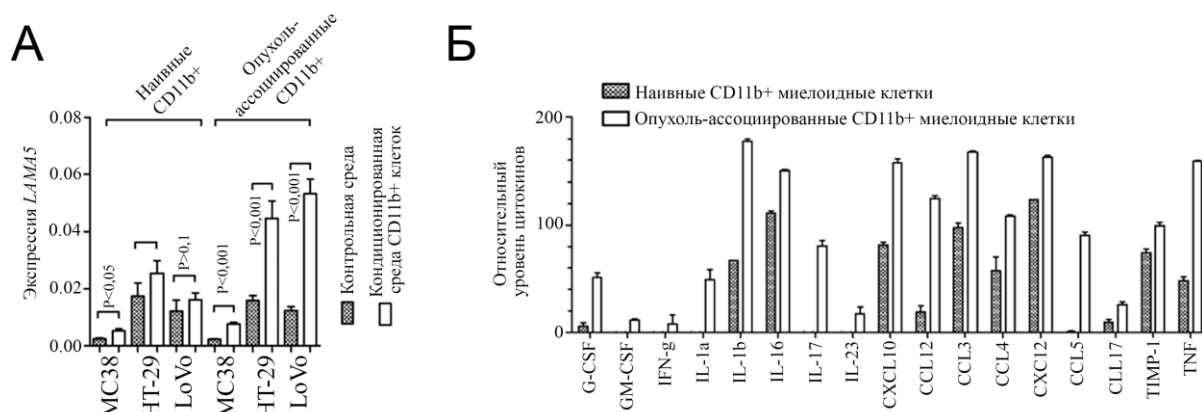


Рисунок 29 – Экспрессия LAMA5 вызвана активностью миелоидных клеток. А) Генная экспрессия LAMA5 в культивируемых мышиных и человеческих клетках KPP после 24 часов культивирования в кондиционированной среде, полученной от наивных CD11b⁺ миелоидных клеток или миелоидных CD11b⁺ клеток, выделенных из печеночных метастазов. Б) Полуколичественный анализ концентраций различных цитокинов в кондиционированной среде от наивных CD11b⁺ миелоидных клеток (серый) или CD11b⁺ миелоидных клеток, выделенных из печеночных метастазов (белый). Для анализа использовался коммерческий дот-блот набор фирмы R&D Systems

Поскольку поляризация миелоидных клеток в опухолевом микроокружении хорошо охарактеризована и ведет к изменению их секрета, для идентификации потенциальных миелоидных факторов, ответственных за индукцию LAMA5, был проведен профильный анализ цитокинов в кондиционированной среде от наивных и опухоль-ассоциированных CD11b⁺ клеток (Рисунок 29Б). Среда от опухоль-ассоциированных клеток показала повышенный уровень цитокинов, включая G-CSF, IL-1β, CXCL10 и TNF, по сравнению со средой от наивных клеток (Рисунок 29Б).

Цитокин TNF показал одну из наиболее высоких кратностей изменения. Обработка клеток KPP рекомбинантным TNF приводила к увеличению экспрессии LAMA5 в сравнении с контролем в трех опухолевых клеточных линиях (Рисунок 30). Таким образом, была показана ключевая функция миелоидных клеток опухолевого микроокружения в TNF-опосредованной индукции LAMA5 клетками печеночных метастазов KPP.

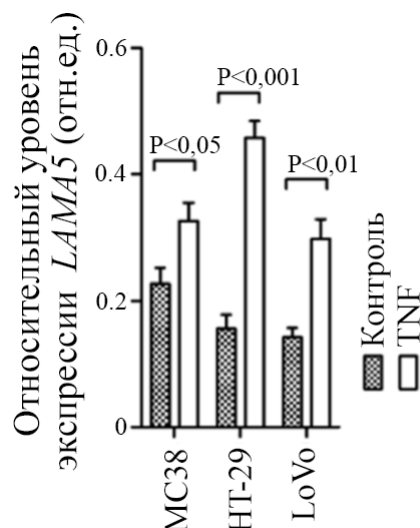


Рисунок 30 – Экспрессия гена *LAMA5* в культивируемых мышинных и человеческих клетках КРР, через 24 часа после стимуляции ФСБ (серый) или 100 нг/мл TNF (белый). N=3 биологических повтора

На последнем этапе была поставлена задача определить функциональную значимость *LAMA5* в развитии печеночных метастазов КРР. В клетки КРР НСТ116 и НТ-29 была введена короткая шпильковая РНК, нацеленная на *LAMA5*, что привело к стабильному нокдауну гена *LAMA5* в раковых клетках (Рисунок 31).

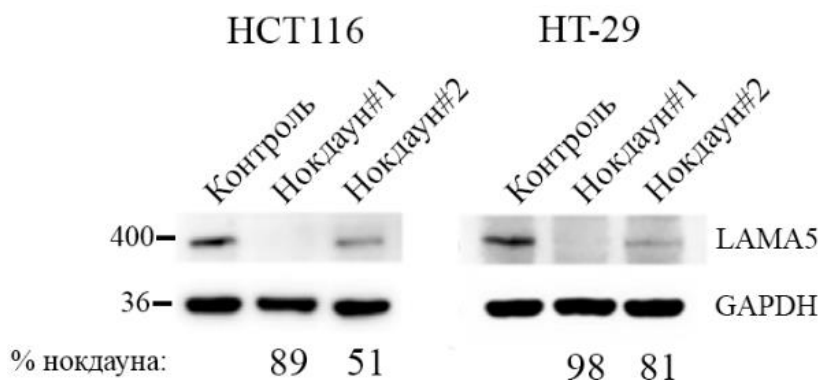


Рисунок 31 – Иммуноблот-анализ белка *LAMA5* в линиях КРР человека НСТ116 и НТ-29, несущих контрольную векторную конструкцию (Контроль) или конструкцию короткой шпильковой РНК, таргетирующей *LAMA5* (Нокдаун #1, #2)

Далее ставили модель экспериментальных печеночных метастазов, используя контрольные опухолевые клетки и клетки с нокдауном *LAMA5*. При достижении конечной точки первой мышью, все животные в группах подвергались гуманной эвтаназии. Было установлено, что снижение экспрессии *LAMA5* приводило к значительному уменьшению объема печеночных

метастазов КРР в сравнении с контрольной группой (Рисунок 32). Эти результаты свидетельствуют о важной роли *LAMA5* в развитии метастатического КРР.

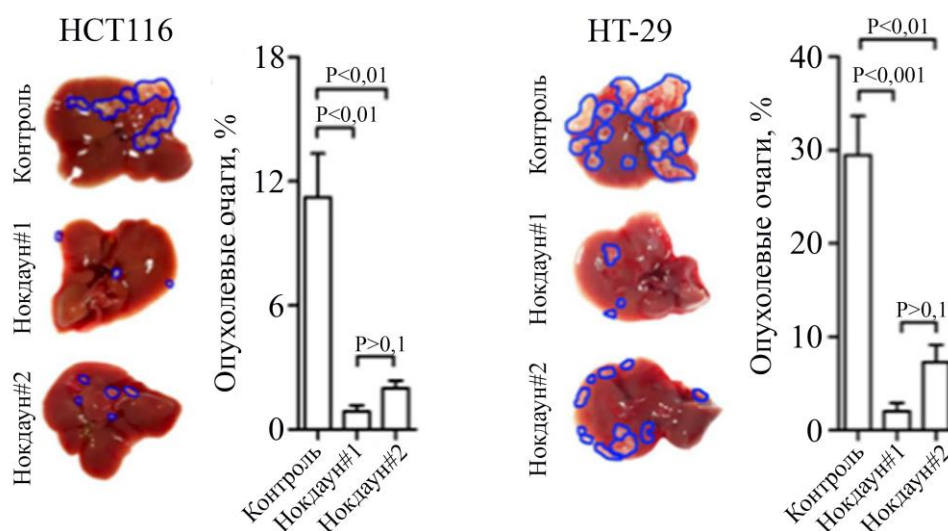


Рисунок 32 – Количественная оценка опухолевых очагов в мышинных моделях метастазов клеточных линий HCT116 и HT-29 с нокдауном гена *LAMA5* или контрольных клеток

3.5 Определение ключевых генов внеклеточного матрикса для прогноза течения солидных ЗНО

На завершающем этапе исследований опухолевого ВКМ была поставлена задача определить компоненты ВКМ, играющие ключевую роль в прогрессировании ЗНО. Для этого было проведено сравнение экспрессии генов ВКМ в транскриптомных массивах данных опухолевых тканей и нормальных тканей человека (таблица 6).

Таблица 6 – Информация о массивных данных, используемых для биоинформатического анализа выживаемости

Тип ЗНО	Программа для анализа выживаемости	Идентификаторы баз данных, используемых в анализе	Количество пациентов (общее)	Количество пациентов (для анализа безрецидивной выживаемости)
Цистаденокарцинома яичников	KM plotter	GSE14764, 15622, 18520, 19829, 23554, 26193, 26712, 27651, 30161, 3149, 51373, 63885, 65986, 9891, TCGA	655	614
Аденокарцинома легкого	KM plotter	GSE14814, 19188, 29013, 30219, 31210, 3141, 31908, 37745, 43580, 4573, 50081, 8894, TCGA, CAARRAY	673	443
Аденокарцинома желудка	KM plotter	GSE14210, 15459, 22377, 29272, 51105, 62254	631	522
Колоректальная аденокарцинома	GraphPad Prism	TCGA	374	329
	GraphPad Prism	GSE17538	232	203

По результатам биоинформатического анализа было выявлено значимое количество генов ВКМ, экспрессирующихся на более высоком уровне в ЗНО по сравнению с соответствующими нормальными тканями (Рисунок 33). В частности, ВКМ рака пищевода и РЛ сильно отличались от исходных органов: 110 и 97 из 274 генов ВКМ были достоверно повышены в этих опухолях, соответственно (Рисунок 33). Для сравнения, рак яичников демонстрировал меньшую разницу: только 43 из 274 генов были достоверно повышены в сравнении с нормальной тканью (Рисунок 33).

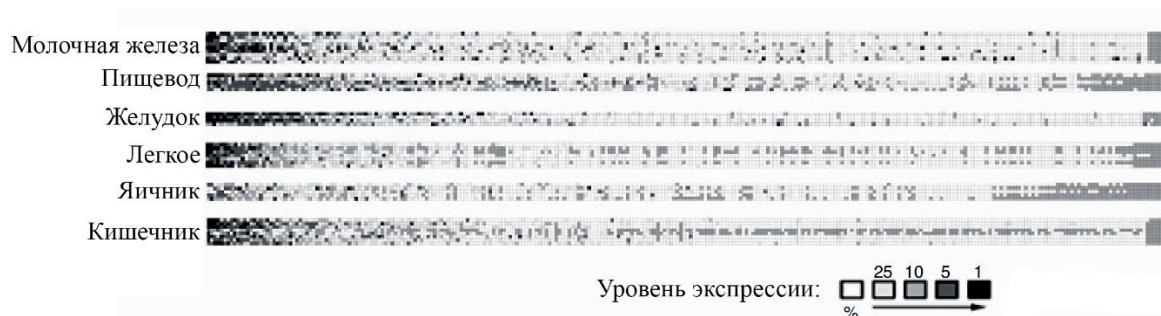


Рисунок 33 – Экспрессия генов ВКМ в зависимости от ранга гена в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью в различных типах ЗНО. Ранг экспрессии присвоен от белого цвета (минимальная экспрессия) до черного цвета (максимальная экспрессия). Гены перечислены в порядке их медианного ранга по всем включенным исследованиям для данного типа ЗНО.

В результате биоинформатического анализа были определены гены, достоверно повышенные во всех изученных типах рака, что позволило сформировать сигнатуры из девяти общих генов (Рисунок 34, Рисунок 35).

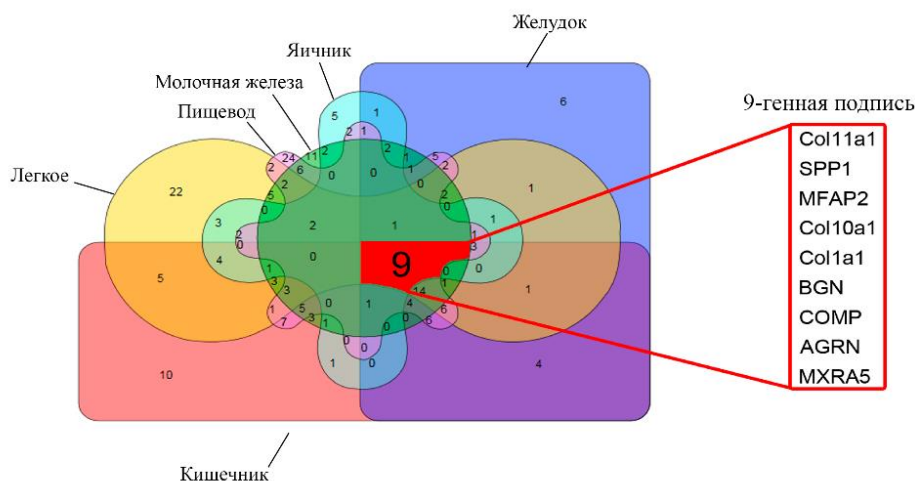


Рисунок 34 – Диаграмма Венна, использованная для идентификации общих генов ВКМ, которые являются значимо сверхэкспрессированными во всех типах ЗНО.

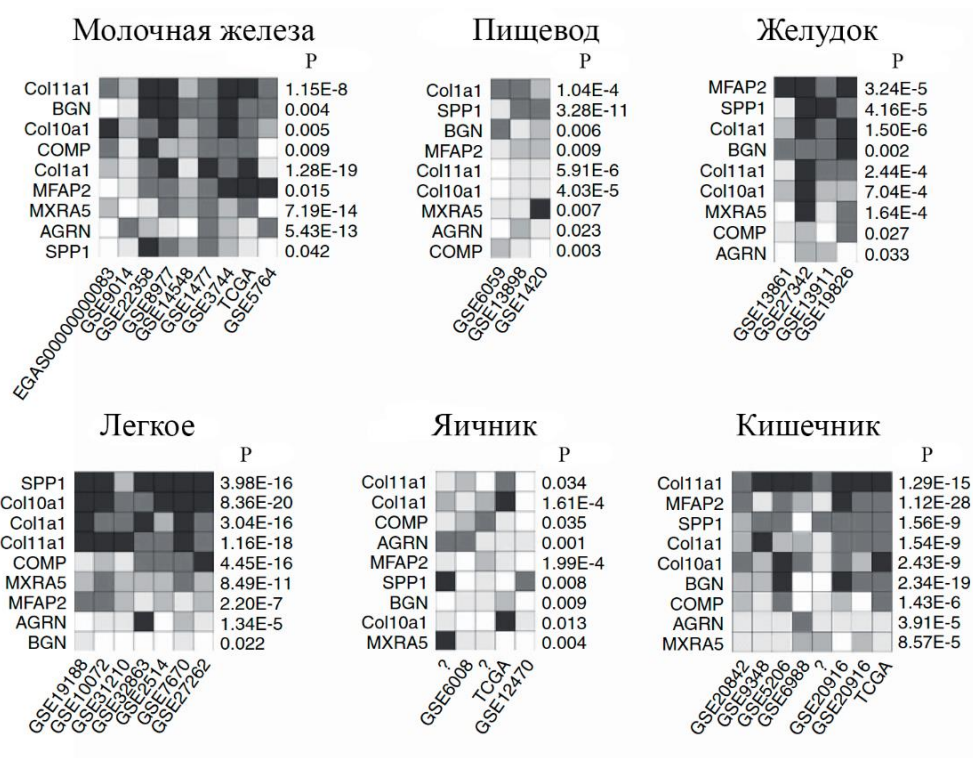


Рисунок 35 – Экспрессия 9-генной сигнатуры ВКМ в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью для каждого включенного исследования и скорректированные по FDR значения статистической значимости. Ранг экспрессии присвоен от белого цвета (минимальная экспрессия) до черного цвета (максимальная экспрессия).

Для валидации данных биоинформатического анализа, уровень экспрессии некоторых компонентов 9-генной сигнатуры был проанализирован иммуногистохимически на спаренных образцах биопсии КРР и здорового кишечника (Рисунок 36). Анализ показал значительное увеличение экспрессии белков COL11A1, COL10A1 и SPP1 в тканях колоректального рака по сравнению со сходными нормальными тканями. Экспрессия COL1A1 также была повышена в опухолевых тканях, однако это различие не достигло статистической значимости. Важно отметить, что в тканях КРР каждый из этих белков был обнаружен в стромальном компоненте, что указывает на их депонирование в ВКМ (Рисунок 36). В нормальной ткани толстой кишки уровни COL11A1 были незначительными, в то время как COL10A1 идентифицирован в цитоплазме эпителиальных клеток, а не в строме (Рисунок 36).

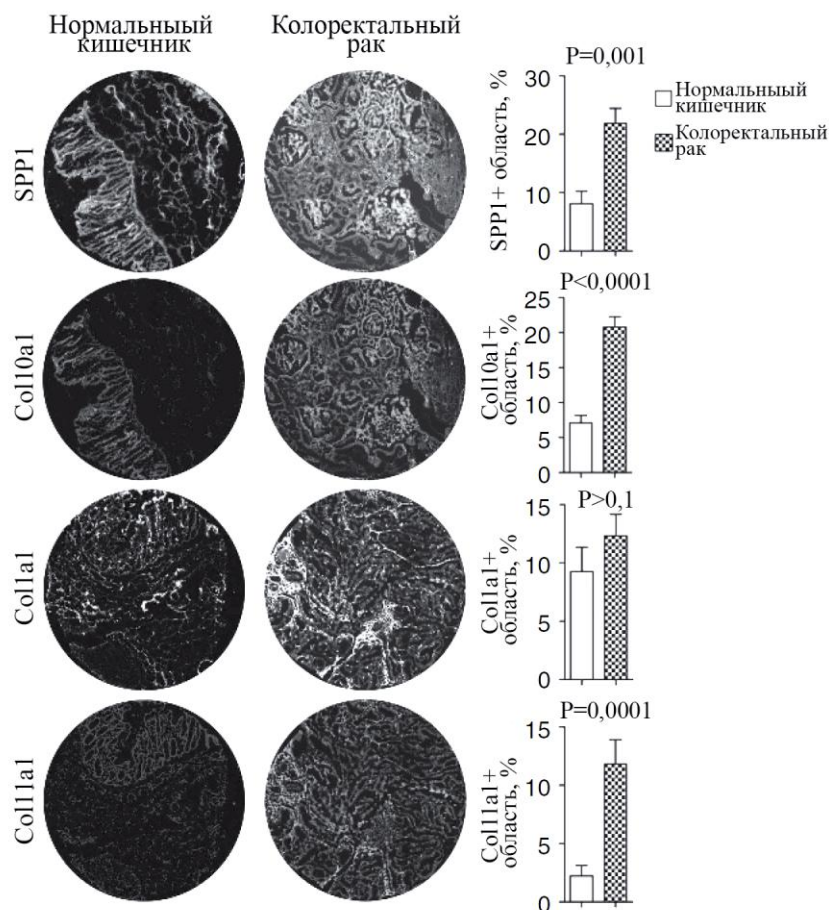


Рисунок 36 – Иммунофлуоресцентное окрашивание белков SPP1, Col10a1, Col1a1 и Col11a1 в тканях КРР и спаренных нормальных тканях кишечника (слева) и полуколичественная оценка площади окрашивания (справа) на тканевой матрице (N=20 пациентов).

Выявленное повышение экспрессии девятигенной сигнатуры ВКМ в ЗНО позволило предположить ее связь с агрессивным фенотипом опухоли. Комплексный анализ нормализованных данных экспрессии из нескольких независимых наборов данных подтвердил данную гипотезу. У пациентов с раком желудка, легкого и яичников высокая экспрессия этой сигнатуры в опухолевой ткани ассоциировалась со сниженными показателями общей и безрецидивной выживаемости (Рисунок 37). Более того, в трех крупных массивах данных по КРР повышенный уровень данной сигнатуры также коррелировал с неблагоприятным прогнозом (Рисунок 37).

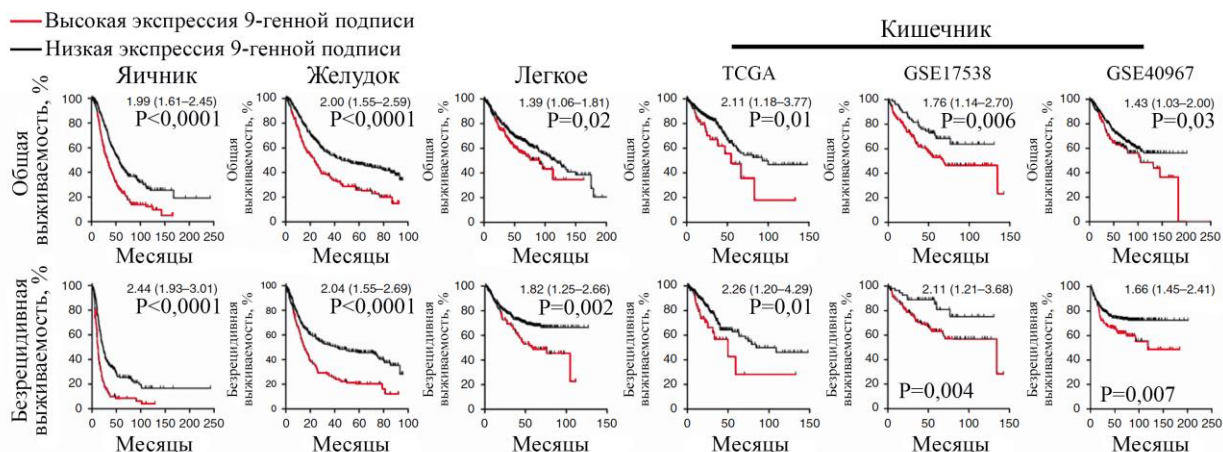


Рисунок 37 – Общая выживаемость (верхний ряд) и безрецидивная выживаемость (нижний ряд) в когортах пациентов, у которых в опухолях наблюдается сверхэкспрессия (красный) или нормальная экспрессия (черный) 9-геной сигнатуры ВКМ. Для сравнения кривых использован Log-Rank test. Приведены значения относительного риска с 95% доверительными интервалами. N=489, 295, 585 и 526 для рака яичника, желудка, легкого, и кишечника, соответственно (массив TCGA), N=232 для КРР (набор GSE17538) и N=566 для КРР (набор GSE40967)

Наконец, многофакторный анализ в наборах данных по раку желудка, легких и КРР определил ВКМ сигнатуру из девяти генов как независимый фактор, значимо связанный с безрецидивной выживаемостью, независимо от стадии или степени заболевания (таблица 7).

Таблица 7 – Многомерный анализ факторов, влияющих на безрецидивную и общую выживаемость пациентов с ЗНО

	Безрецидивная выживаемость		Общая выживаемость	
	ОР (95% ДИ)	P	ОР (95% ДИ)	P
Аденокарцинома желудка (GSE62254)				
Стадия по системе TNM	2,22 (1,76–2,81)	<0,001	Нет данных	
Лимфоваскулярная инвазия	1,55 (0,92–2,61)	0,10	Нет данных	
классификация Лаурена	1,16 (0,85–1,58)	0,36	Нет данных	
9-генная сигнатура	1,59 (1,10–2,31)	0,02	Нет данных	
Аденокарцинома легкого (GSE50081)				
Стадия по классификации AJCC, параметр T	2,88 (1,32–6,27)	0,008	2,28 (1,21 – 4,28)	0,01
Стадия по классификации AJCC, параметр N	1,35 (0,74–2,47)	0,33	1,47 (0,87–2,5)	0,15
Курение	1,94 (0,95–3,97)	0,07	0,81 (0,38–1,7)	0,57
9-генная сигнатура	2,12 (1,17–3,84)	0,01	1,18 (0,71–1,96)	0,51
Колоректальная аденокарцинома (GSE40967)				
Стадия по системе TNM	2,6 (1,89–3,58)	<0,001	2,12 (1,58–2,84)	<0,001
Проксимальное расположение опухоли	1,27 (0,89–1,81)	0,19	1,04 (0,75–1,43)	0,83
Адьювантная химиотерапия	1,10 (0,75–1,61)	0,64	0,59 (0,41–0,83)	0,003
Поражение лимфатических узлов	0,87 (0,64–1,17)	0,36	1,02 (0,77–1,34)	0,88
9-генная сигнатура	1,45 (1,01–2,07)	0,03	1,22 (0,87–1,71)	0,24

ОР – относительный риск, ДИ – доверительный интервал, TNM – стадия опухоли, лимфатических узлов и метастазов, AJCC – американский объединенный комитет по раку.

Важно отметить, что для вышеупомянутых анализов исследовался ВКМ аденокарцином, поскольку данные нозологии как правило характеризуются с повышенным уровнем стромального компонента и усиленным накоплением белков ВКМ. Другие солидные опухоли, например, ГБМ, характеризуются низким содержанием ВКМ, что отчасти объясняется практически полным отсутствием в головном мозге структурных белков матрикса. В частности, было показано, что опухоли с низким содержанием матриксных белков (например, глиобластома) имеют другой профиль генов ВКМ, определяющих прогноз заболевания.

Резюме

В данной главе исследовались особенности качественного и количественного состава ВКМ солидных опухолей, а также функциональная значимость отдельных белков ВКМ для роста и прогрессирования ЗНО. По итогам главы можно сформулировать следующие выводы:

1. Разработанная и оптимизированная методика децеллюляризации с последующим биохимическим обогащением позволила выделять фракции ВКМ как опухолевой, так и нормальной ткани. Полученные очищенные образцы ВКМ отличались высокой биохимической чистотой, что обеспечивало применение методов высокопроизводительного масс-спектрометрического анализа;

2. Были идентифицированы белки ВКМ, активно секретируемые в опухолевом микроокружении печеночных метастазов КРР. Лучевая терапия КРР приводила к значимому ремоделированию структурных компонентов ВКМ в опухоли;

3. Показано, что стресс, вызванный химиотерапией, изменяет молекулярный фенотип как опухолевых клеток, так и фибробластов местного микроокружения, активируя сигнальные пути, ассоциированные с формированием химиорезистентности. Терапевтическое таргетирование отдельных таких путей (например, YAP1 в раковых клетках и COX-2 в опухоль-ассоциированных фибробластах) может повысить чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии;

4. Установлено, что помимо опухоль-ассоциированных фибробластов, раковые клетки способны продуцировать структурные белки ВКМ. Печеночные метастазы КРР активно секретируют некоторые цепи ламинина, особенно компоненты ламинина-511 ($\alpha 5$, $\beta 1$ и $\gamma 1$). Эти белки часто окружают микрососудистое русло опухоли, что свидетельствует об их потенциальной роли 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 снижал количество опухолевых очагов;

5. Идентифицированы ключевые гены ВКМ, высокая экспрессия которых связана с неблагоприятным прогнозом у пациентов с солидными опухолями.

ГЛАВА 4 КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ: ПОИСК МИШЕНЕЙ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

4.1 Оценка инфильтрации опухоли иммунными клетками после лучевой терапии, с выявлением ключевой роли макрофагов в развитии иммуносупрессии

Противоопухолевая терапия вызывает значимые изменения не только в опухоли, но и во всем ее микроокружении. Поскольку лучевая терапия в дозе 10 Гр (локально) приводила к ремоделированию ВКМ, была выдвинута гипотеза о том, что облучение может также влиять на инфильтрацию опухоли иммунными клетками. Для проверки этой гипотезы проводили проточную цитометрию подкожных опухолей при КРР (сингенная модель МС38) на основные иммунные популяции после псевдооблучения и локального воздействия облучения в дозе 10 Гр. Через 5 суток после лучевой терапии популяция CD45⁺ клеток в опухоли значительно увеличивалась, причем наибольшую кратность изменения демонстрировали МСКЛ и макрофаги (Рисунок 38). Нейтрофилы и CD4⁺ Т-клетки также значительно повышались, хотя их удельное содержание в опухолях оставалось невысоким (Рисунок 38). Полученные данные подтверждают, что облучение связано с относительным увеличением миелоидного компартмента, включая выраженный рост инфильтрации опухоль-ассоциированными макрофагами (Рисунок 38).

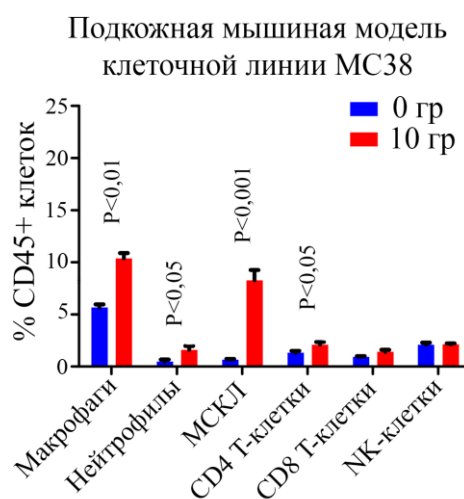


Рисунок 38 – Проточная цитометрия иммунных клеток в подкожных опухолях МС38 через 5 дней после облучения в дозе 10 Гр в сравнении с необлученными опухолями. Были проанализированы макрофаги (CD11b+F480⁺), нейтрофилы (CD11b+Ly6G⁺), МСКЛ (CD11b+Gr1⁺), CD8⁺ Т-клетки (CD45+CD3+CD8⁺), CD4⁺ Т-клетки (CD45+CD3+CD4⁺) и NK-клетки (CD45+NK1.1⁺). N=3 биологических повтора

Результаты проточной цитометрии были независимо подтверждены иммунофлуоресцентным окрашиванием опухолевых срезов, которое выявило увеличение количества CD68⁺ макрофагов в тканях КРР (Рисунок 39).

Подкожная мышинная модель клеточной линии MC38

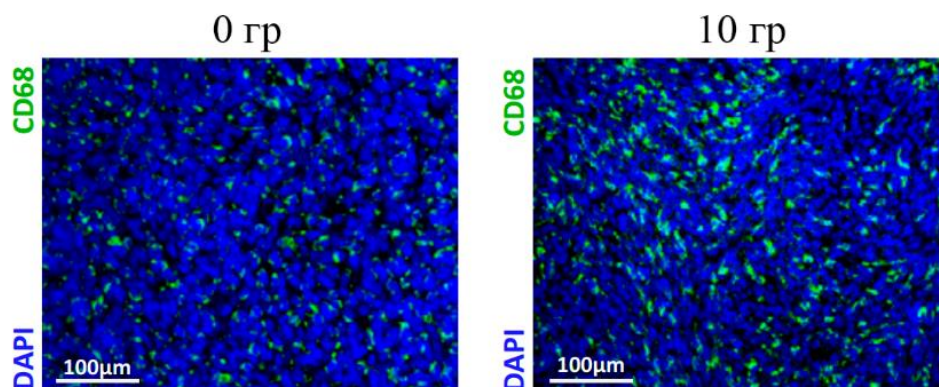


Рисунок 39 – Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов опухолей MC38 на опухоль-ассоциированные макрофаги (CD68). Ядра клеток окрашены DAPI. Шкала=100 мкм

Далее было предположено, что злокачественные клетки привлекают моноциты/макрофаги в очаг опухоли посредством секреции цитокинов или хемокинов. Облученные в дозе 10 Гр клетки MC38 были проанализированы на предмет экспрессии ключевых аттрактантов макрофагов – CCL2, GM-CSF, CXCL12, и M-CSF. По сравнению с псевдооблученными контрольными клетками, облученные раковые клетки проявляли повышенную секрецию M-CSF, но не других исследуемых цитокинов (Рисунок 40).

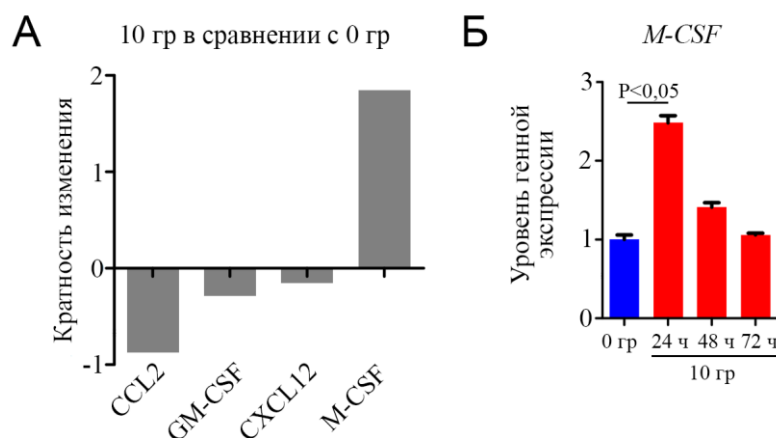


Рисунок 40 – Лучевая терапия клеток KPP влияет на выработку М-CSF. А) Культуру клеток MC38 облучали в дозе 10 Гр или 0 Гр, через 48 часов собирали кондиционированную среду и проводили анализ указанных цитокинов методом дот-блоттинга. Б) Экспрессия мРНК М-CSF в клетках, облученных в дозе 10 Гр, в сравнении с необлученными клетками. Клетки собирали через 24, 48 и 72 часа после облучения. N=3 биологических повтора

Методом иммуноферментного анализа было экспериментально подтверждено достоверное увеличение концентрации М-CSF как в кондиционированной среде клеток MC38 после облучения, так в модели MC38 *in vivo* на третий день после лучевой терапии (Рисунок 41).

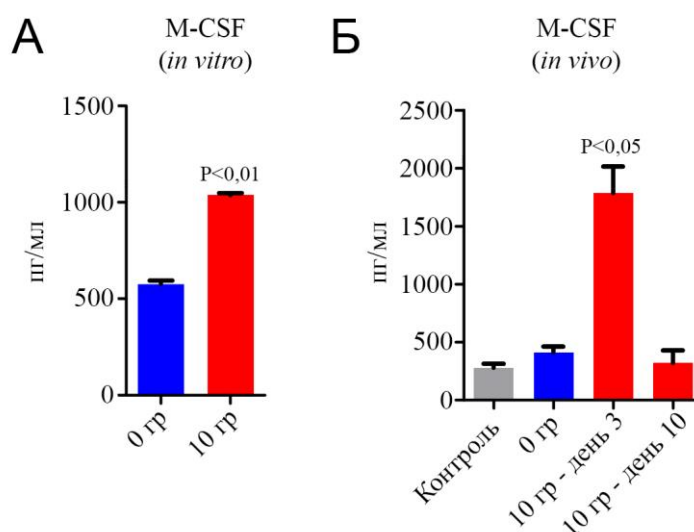


Рисунок 41 – Оценка уровня М-CSF в опухолевых клетках KPP после лучевой терапии. А) Количество М-CSF (пг/мг общего белка) в кондиционированной среде, собранной из клеток MC38 через 48 часов после облучения в дозе 10 Гр, в сравнении с необлученными клетками. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего и проанализированы с помощью теста Манна-Уитни (N=3). Б) Уровень белка М-CSF (пг/мг общего белка), измеренный с помощью ИФА в сыворотке крови контрольных мышей и мышей с облученными опухолями, в указанные временные точки (N=4 биологических повтора на группу)

Для оценки функционального статуса опухоль-ассоциированных макрофагов, CD11b+F4/80+ клетки были выделены методом клеточного сортирования из опухолей мышей, подвергнутых псевдооблучению или локальному облучению в дозе 10 Гр. Из макрофагов выделяли мРНК, после чего проводили ПЦР в реальном времени для определения профиля генной экспрессии данной клеточной популяции. Было установлено, что привлеченные облучением макрофаги характеризовались достоверно повышенным уровнем

иммуносупрессивных цитокинов (гены *Arg1*, *Il10*), в то время как экспрессия некоторых провоспалительных цитокинов была достоверно снижена (гены *Il1α*, *Il1β*) (Рисунок 42). Стоит отметить, что также был статистически значимо снижен важный провоспалительный цитокин *Ccl2* (Рисунок 42). Данные результаты указывают на преимущественно иммуносупрессивный фенотип таких макрофагов.

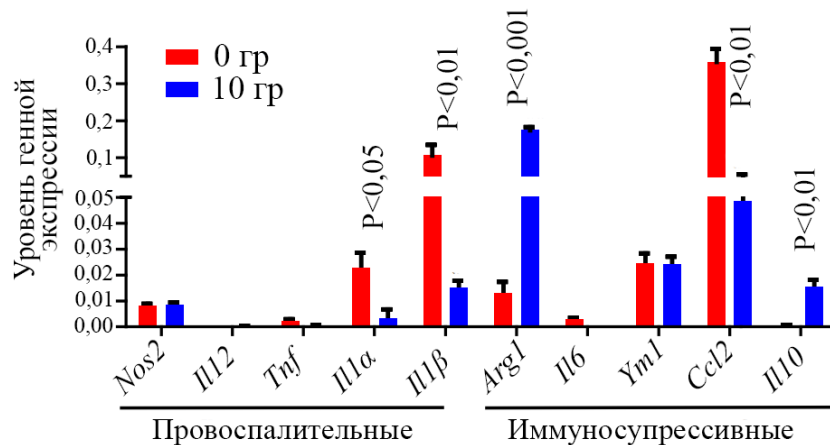


Рисунок 42 – Опухоль-ассоциированные макрофаги (CD11b+F4/80+) были выделены методом клеточного сортирования с последующим анализом экспрессии указанных иммуностимулирующих и иммуносупрессивных генов. N=3 биологических повтора

На основе полученных данных была выдвинута гипотеза о том, что терапевтическое ингибирование M-CSF способно усилить эффект лучевой терапии. В подкожной модели KPP линии MC38 было испытано влияние нейтрализующего антитела αM-CSF после лучевой терапии в дозе 10 Гр (контроль — изотипный IgG в эквивалентной дозе) (Рисунок 43).

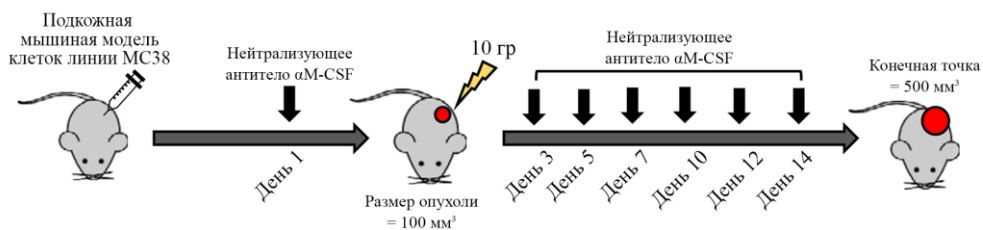


Рисунок 43 – Дизайн *in vivo* эксперимента

Было показано, что терапия αM-CSF достоверно снижала количество CD11b+F4/80+ макрофагов в опухолевых тканях (Рисунок 44). Комбинация лучевой терапии и αM-CSF значительно замедляла темпы роста опухоли по сравнению с контролем (Рисунок 44).

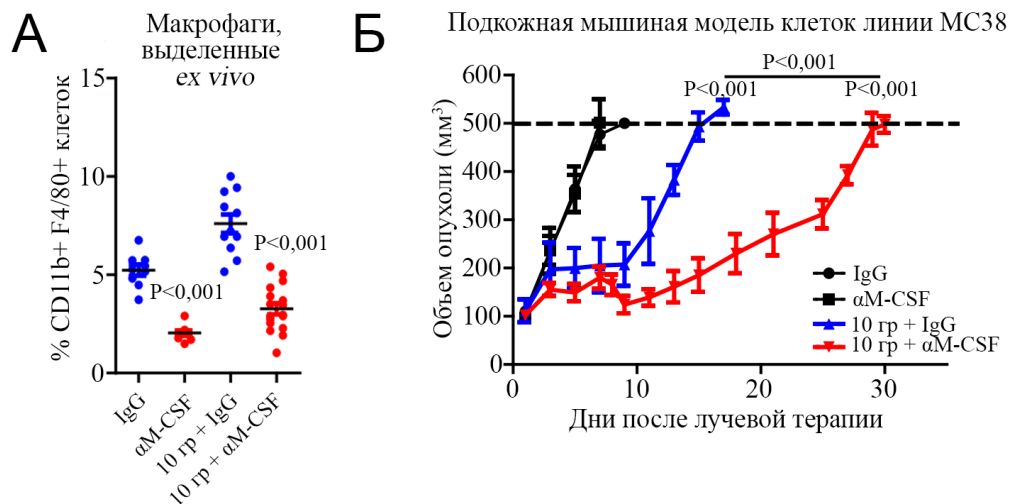


Рисунок 44 – Таргетирование макрофагов усиливает эффективность лучевой терапии *in vivo*. А) Количество опухолево-ассоциированных макрофагов (CD11b+F480+) в опухолях MC38 после указанных видов лечения. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Б) Кинетика роста опухолей MC38 после указанных видов лечения. N=6 биологических повторов

Анализ генной экспрессии выделенных из опухоли CD11b+F4/80+ клеток показал, что комбинация лучевой терапии с αM-CSF перепрограммирует фенотип макрофагов с иммуносупрессивного в провоспалительный. В частности, нейтрализация αM-CSF приводила к значимому повышению генной экспрессии *Il12*, *Tnf*, и *Il1α*, при этом достоверно снижалась экспрессия генов *Arg1*, *Ccl2*, и *Il10* (Рисунок 45).

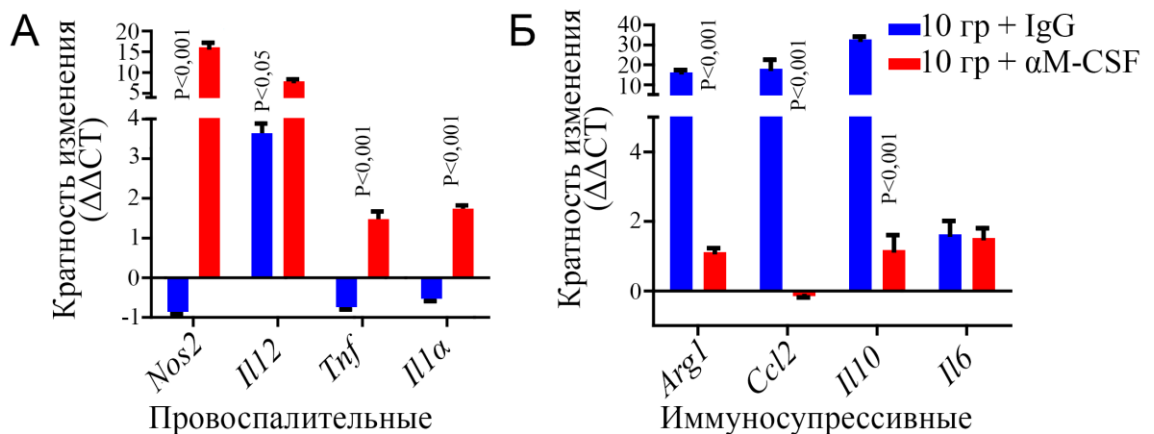


Рисунок 45 – Опухоль-ассоциированные макрофаги (CD11b+F480+) были выделены из опухолей MC38 через 5 дней после указанных видов лечения, с последующим выделением РНК и анализом экспрессии указанных иммуностимулирующих (А) и иммуносупрессивных (Б) генов. N=6 биологических повторов.

Провоспалительный фенотип макрофагов способен усилить адаптивный противоопухолевый иммунитет [235]. В эксперименте *in vivo* терапия α M-CSF значительно усиливала эффект лучевой терапии, и было высказано предположение, что данный эффект мог достигаться за счет усиленной инфильтрации Т-клеток в опухоль. Действительно, монотерапия α M-CSF увеличивала процент CD45+CD3+CD8a+ клеток в опухолевом микроокружении, а при комбинированной терапии этот эффект был еще более выражен (Рисунок 46). На иммуногистохимических снимках подкожных опухолей очевидно доминирование CD8+ Т-клеточного компонента в группе комбинированной терапии в сравнении с монотерапией облучением (Рисунок 46).

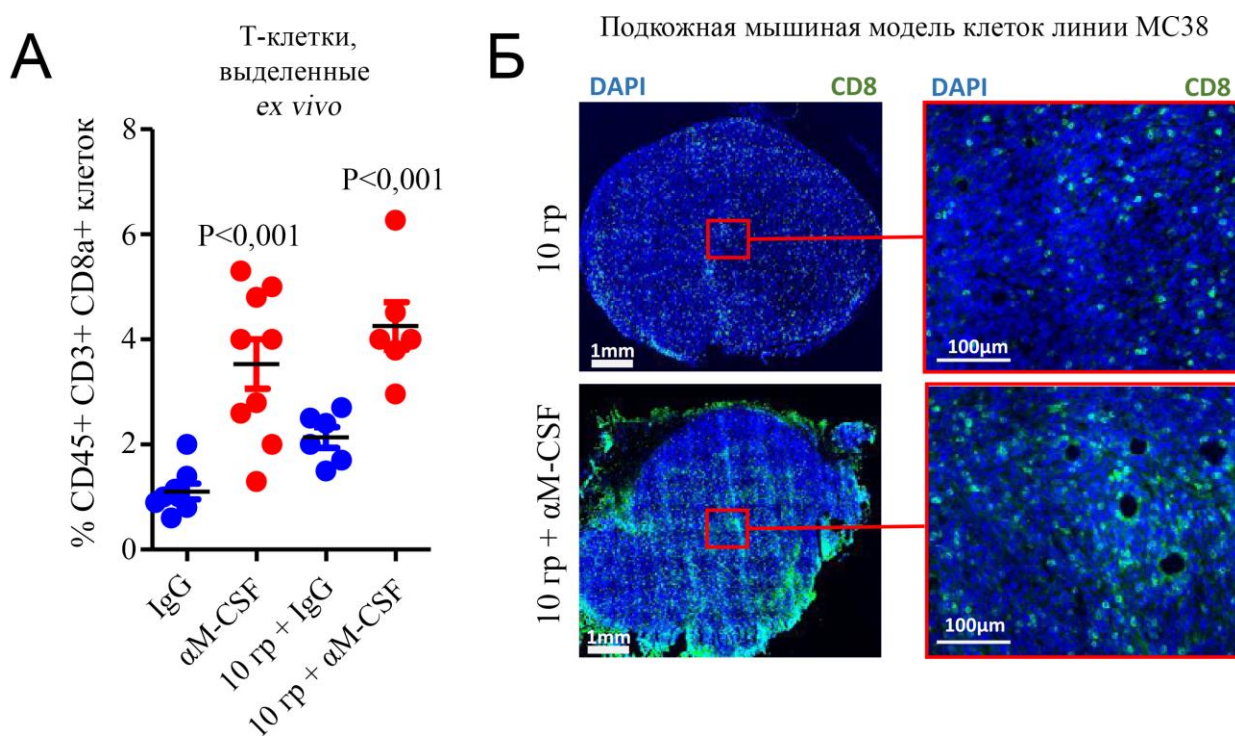


Рисунок 46 – Терапевтическое нацеливание на макрофаги (деплегия) усиливает инфильтрацию опухоли Т-лимфоцитами *in vivo*. А) Опухоли MC38 были исследованы методом проточной цитометрии через 5 дней после указанного лечения на предмет количества CD45+CD3+CD8a+ Т-клеток. N=6 биологических повторов. Б) Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов опухолей MC38 на Т-лимфоциты (CD8) в указанных группах. Ядра клеток окрашены DAPI. Шкала=100 мкм.

В заключительном эксперименте было изучено, участвует ли лучевая терапия в прайминге опухолеспецифических Т-клеток. Ключевым процессом в антигенспецифичном уничтожении Т-клетками является взаимодействие Т-клеточных рецепторов с комплексами антигена главного

комплекса гистосовместимости I класса (МНС-I) [180]. Было установлено, что экспрессия МНС-I увеличивалась в клетках MC38 после облучения *in vitro* (Рисунок 47). Кроме того, экспрессия МНС-I в опухолевых клетках возрастала после облучения подкожных опухолей MC38 (Рисунок 47). Эти результаты указывают на положительный эффект лучевой терапии на прайминг Т-клеток.

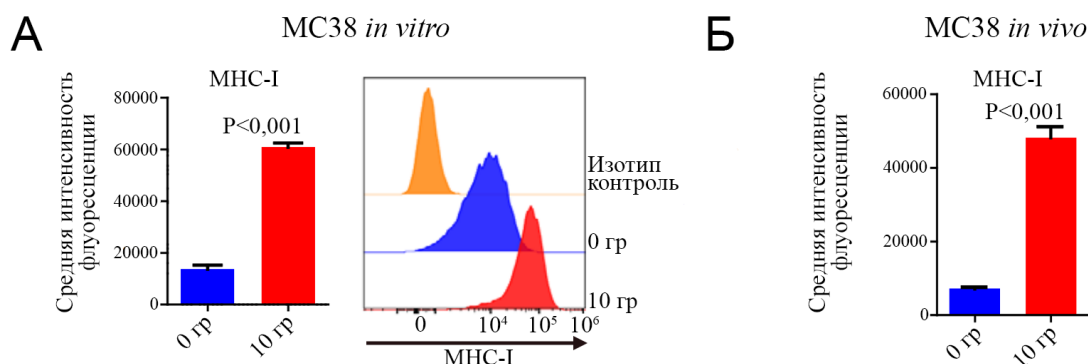


Рисунок 47 – Лучевая терапия повышает экспрессию МНС-I опухолевыми клетками. А) Анализ уровня МНС-I на поверхности опухолевых клеток MC38 в культуре *in vitro* через 48 часов после облучения в дозе 10 Гр. Б) Количественная оценка методом проточной цитометрии уровня МНС-I в опухолях линии MC38 *in vivo*. Исследование проводили через 48 часов после облучения в дозе 10 Гр.

Таким образом, в серии экспериментов было установлено, что адаптивный иммунный ответ, индуцируемый лучевой терапией, может подавляться рекрутированием иммуносупрессивных макрофагов. При этом терапевтическое нацеливание на макрофаги способно частично снизить иммуносупрессию и приводить к усиленному ответу на радиотерапию.

4.2 Оценка роли моноцитов/макрофагов опухолевого в пролиферации, миграции и инвазии раковых клеток

Обнаружение иммуносупрессивной роли макрофагов в ответе на лучевую терапию КРР поставило вопрос о других потенциальных эффектах, которые эти и другие миелоидные клетки могут оказывать на опухолевый фенотип (Рисунок 46). Была оценена пролиферация клеточной линии КРР MC38 при добавлении в культуру кондиционированной среды первичных мышиных моноцитов (CD11b+Gr1^{low/mid}) или гранулоцитов (CD11b+Gr1^{high}). Установлено, что злокачественные клетки росли значительно быстрее в кондиционированной среде моноцитов или гранулоцитов в сравнении с контрольной средой DMEM или бессывороточной средой (Рисунок

48). Важно отметить, что моноцитарная среда оказывала более выраженное влияние на пролиферацию по сравнению с гранулоцитарной средой (Рисунок 48).

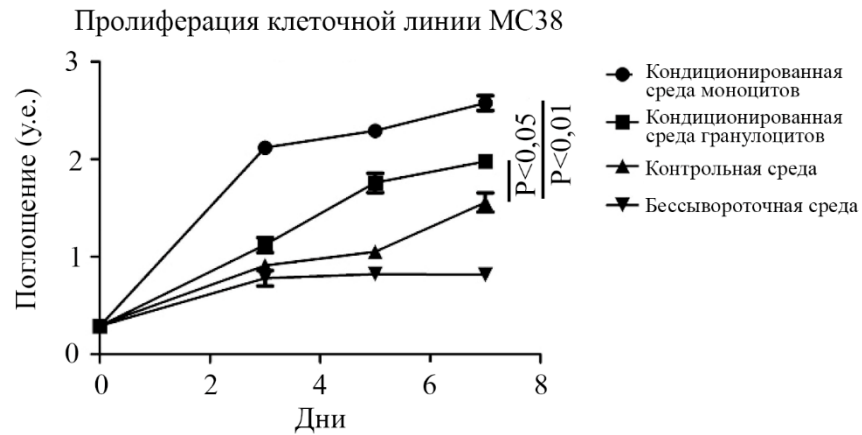


Рисунок 48 – Клетки линии МС38 культивировали в кондиционированной среде, полученной от моноцитов/макрофагов или гранулоцитов, либо в контрольной среде. Пролиферацию оценивали с помощью водорастворимого тетразолиевого теста. N = 3 биологических повтора

Далее рассматривали влияние кондиционированной среды миелоидных клеток на миграцию и инвазию раковых клеток в системе Transwell. Было показано, что опухолевые клетки мигрировали значительно активнее в присутствии кондиционированной среды моноцитов (Рисунок 49). Для группы МС38 с гранулоцитарной средой была отмечена тенденция к ускоренной миграции клеток, однако не было достигнуто статистической значимости в сравнении с контролем (Рисунок 49).

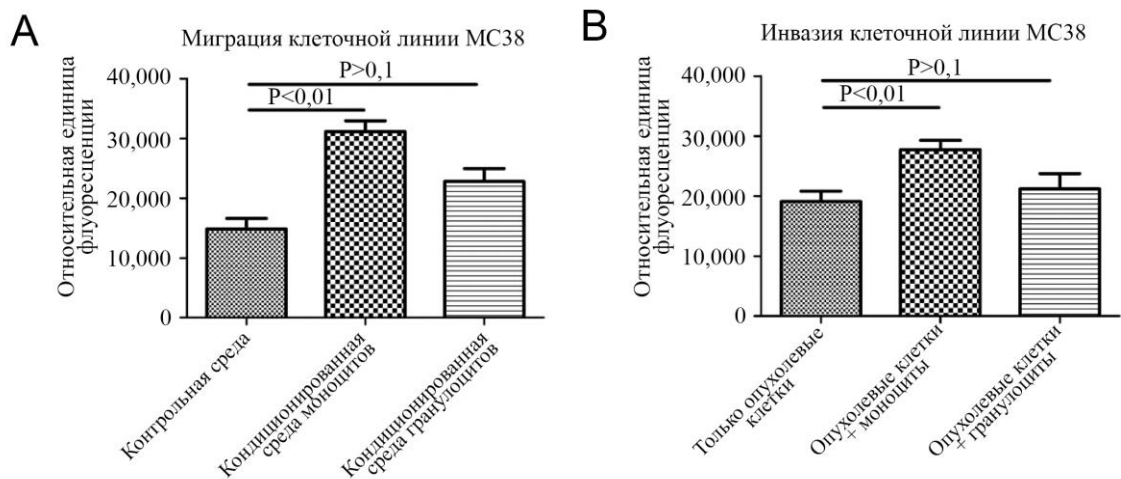


Рисунок 49 – Миграция (А) и инвазия (Б) клеток линии МС38 в ответ на добавление в культуру контрольной среды, среды, кондиционированной моноцитами/макрофагами, или среды, кондиционированной гранулоцитами. N=3 биологических повтора

В отношении инвазии клеток МС38 были получены аналогичные результаты: среда, кондиционированная моноцитами, достоверно усиливала инвазивность раковых клеток, при этом для гранулоцитарной кондиционированной среды не было обнаружено значимых различий при наличии тенденции (Рисунок 49). Таким образом, и гранулоциты, и моноциты поддерживают злокачественный фенотип, выраженный в усиленной пролиферации, инвазии и миграции клеток КРР, при этом для моноцитов этот эффект является более выраженным.

Для определения молекулярных путей, активируемых в опухолевых клетках при взаимодействии с миелоидным компонентом иммунного ответа, был проведен анализ методом дот-блота. Клеточная линия МС38 показала лишь одно достоверное различие: уровень фосфорилирования киназ ERK1/2 в позициях Тре202/Тир204 был значимо увеличен при добавлении кондиционированной среды как моноцитов (в большей степени), так и гранулоцитов (в меньшей степени) (Рисунок 50).

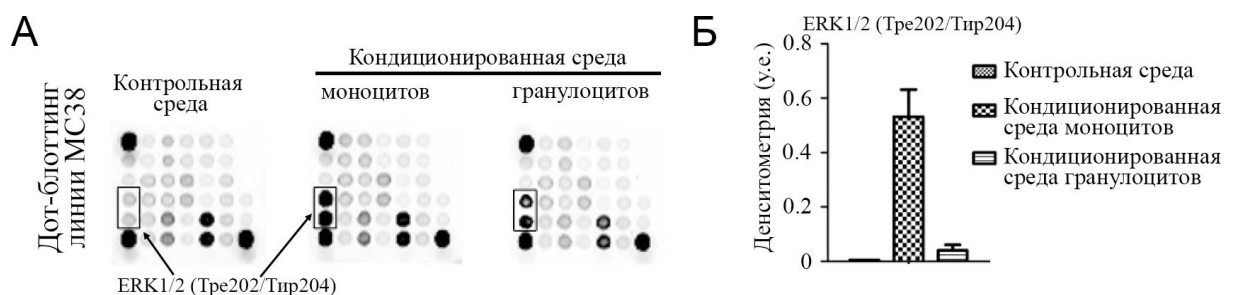


Рисунок 50 – Клетки линии МС38 культивировали в контрольной среде, среде, кондиционированной моноцитами/макрофагами или гранулоцитами, после чего активацию сигнальных путей оценивали с помощью набора PathScan Intracellular Signaling Array (А) путем измерения значений денситометрии (Б). N=2 повтора

Для экспериментального подтверждения вовлеченности ERK1/2 во взаимодействие между миелоидными и раковыми клетками, в экспериментальную систему был добавлен U0126 — селективный не-АТФ-конкурентный ингибитор MEK1 и MEK2, блокирующий молекулярный путь Ras/Raf/MEK/ERK. Исходный эксперимент с кондиционированной средой и злокачественными клетками был повторен с добавлением 10 мкМ U0126, после чего проводили анализ пролиферации, миграции и инвазии клеток МС38. Было установлено, что блокирование ERK1/2 нейтрализовало стимулирующий пролиферацию эффект, вызванный

кондиционированной средой миелоидных клеток (Рисунок 51). Аналогичные результаты были показаны при исследовании инвазии и миграции клеток MC38 (Рисунок 52, Рисунок 53). Таким образом, полученные результаты указывают на то, что моноциты/макрофаги стимулируют проопухолевый фенотип KPP посредством активации фосфорилирования ERK1/2 в позициях Thr202/Tyr204.

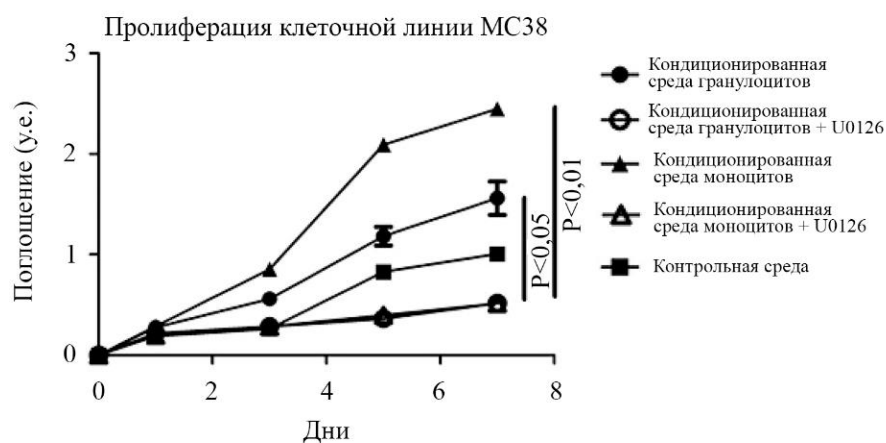


Рисунок 51 – Пролиферация клеточной линии MC38, культивируемой в контрольной среде, среде, кондиционированной моноцитами/макрофагами или гранулоцитами в присутствии ингибитора ERK U0126 (10 мкМ). Пролиферацию оценивали с помощью водорастворимого тетразолиевого теста. N=3 биологических повтора

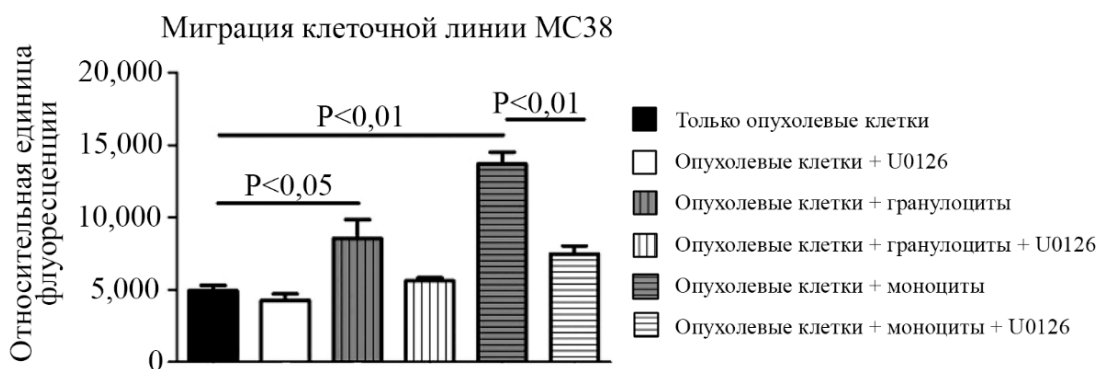


Рисунок 52 – Миграция клеточной линии MC38, культивируемой в контрольной среде, среде, кондиционированной моноцитами/макрофагами или гранулоцитами в присутствии ингибитора ERK U0126 (10 мкМ).

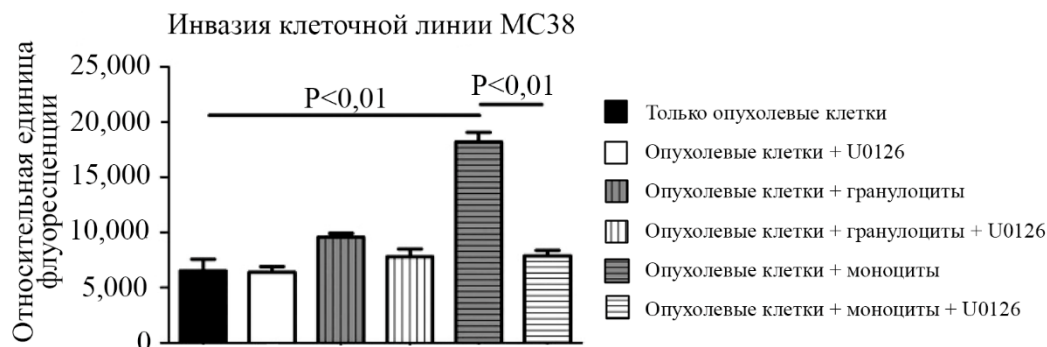


Рисунок 53 – Инвазия клеточной линии MC38, культивируемой в контрольной среде, среде, кондиционированной моноцитами/макрофагами или гранулоцитами в присутствии ингибитора ERK U0126 (10 мкМ).

4.3 Разработка метода стимуляции дендритных клеток с целью повышения эффективности ингибиторов контрольных точек

Результаты, полученные в разделах 4.1 и 4.2, указывают на функциональную роль популяций макрофагов в опухолевом микроокружении, где их присутствие связано с иммуносупрессией и ускоренным потенциалом роста и инвазии ЗНО. Полученные данные свидетельствуют о проопухолевом фенотипе этой иммунной популяции, хотя некоторые недавние работы утверждают обратное [236]. Помимо моноцитов и макрофагов, в микроокружении солидных опухолей присутствуют другие миелоидные клетки, активация которых может способствовать борьбе с раковыми клетками. Например, реализация противоопухолевого Т-клеточного ответа определяется не только поляризацией макрофагов, но и эффективностью презентации опухолевых антигенов. В связи с этим следующим шагом диссертационного исследования стало изучение дендритных клеток как ключевых инициаторов и регуляторов адаптивного иммунного ответа в опухолевом очаге.

Дендритные клетки поглощают и кросс-презентируют опухолевые антигены для прайминга и активации цитотоксических Т-лимфоцитов в антиген-специфическом Т-клеточном ответе. Однако инфильтрирующие опухоль дендритные клетки часто становятся дисфункциональными или толерогенными в супрессивном опухолевом микроокружении, что снижает эффективность Т-клеточной терапии [237, 238]. Было предположено, что активация дендритных клеток или преодоление иммуносупрессивных сигналов может усилить противоопухолевый Т-клеточный ответ и повысить терапевтическую эффективность ИИКТ и других видов иммунотерапии.

Для стимуляции дендритных клеток человека использовалась панель пищевых добавок, включающая витамины В, В2, В12, С, D, Е и Омега-3 жирные кислоты. Выбор кандидатов для

стимуляции дендритных клеток обоснован их широким применением как здоровыми людьми, так и пациентами с онкологическими заболеваниями [239, 240]. Применение таких добавок на фоне стандартной терапии ЗНО привлекает возрастающее внимание как практичный и потенциально полезный подход [241]. Однако информация о влиянии компонентов питания и нутрицевтиков на современные методы иммунотерапии остается ограниченной. Установленная связь между нутритивным статусом (т.е. комплексным показателем состояния организма, отражающим степень его обеспеченности питательными веществами, такими как белки, жиры, углеводы, витамины и минералы) и иммунным гомеостазом [242] позволяет предположить, что диетические вмешательства могут влиять на противоопухолевый иммунитет и эффективность иммунотерапии рака. Таким образом, выявление полезных диетических добавок и исследования механизмов их действия в усилении иммунотерапии ЗНО может найти клиническое применение в онкологии.

Моноциты человека, полученные от здоровых доноров, дифференцировали в дендритные клетки согласно общепринятому протоколу, после чего клетки обрабатывали вышеупомянутыми добавками в течение 48 часов и стимулировали липополисахаридом (20 нг/мл) в течение 24 часов. Показателями функционального статуса дендритных клеток служил уровень экспрессии поверхностных ко-стимулирующих молекул CD40, CD86 и HLA-DR, который определяли методом проточной цитометрии. Было показано, что среди всех использованных добавок только витамин Е в дозе 50 мкг/мл приводил к значительному повышению уровня всех исследуемых маркеров, что может свидетельствовать об усилении антигенпрезентирующей функции дендритных клеток (Рисунок 54). Кроме того, совместное культивирование дендритных клеток человека с CD8⁺ Т-лимфоцитами человека после обработки витамином Е приводило к достоверному повышению продукции гамма-интерферона последними (Рисунок 54).

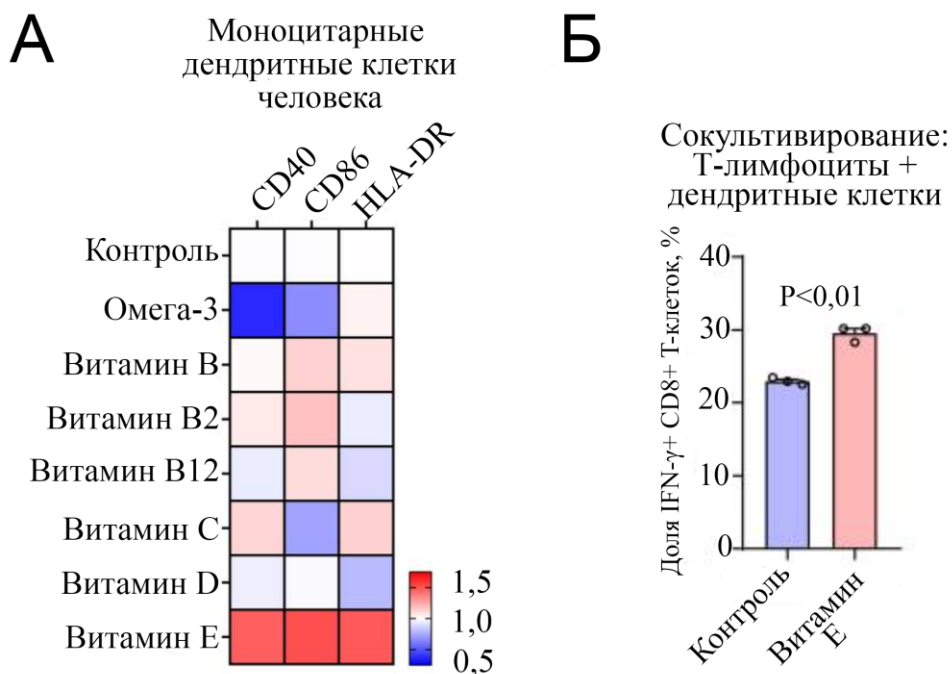


Рисунок 54 – Оценка влияния витаминов и добавок на функциональный статус дендритных клеток. А) Тепловая карта уровня ко-стимулирующих молекул на поверхности моноцитарных дендритных клеток человека, обработанных добавками: витамин Е (50 мкг/мл), витамин С (20 мкг/мл), витамин D (100 нг/мл), витамин В9 (фолат, 200 нг/мл), витамин В2 (2 мкг/мл), витамин В12 (10 нг/мл) и Омега-3 (100 мкМ) в течение 48 часов, а затем стимулированных липополисахаридом (20 нг/мл) в течение 24 часов. Средняя интенсивность флуоресценции каждого маркера была нормализована к контрольной группе. 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 Е. N=3 биологических повтора.

Для валидации полученных результатов *in vivo* была поставлена ортотопическая мышинная модель РМЖ с использованием клеточной линии EMT6. После прохождения курса лечения витамином Е или контролем мыши подвергались гуманной эвтаназии, опухоли эксплантировались и анализировались методом проточной цитометрии. Было установлено, что опухолевое микроокружение мышей, получавших витамин Е, было обогащено как CD8⁺ Т-клетками, так и дендритными клетками (Рисунок 55). Углубленный анализ подтипов дендритных клеток показал наибольшее увеличение классических дендритных клеток типа 1 (Рисунок 55), специализированной подгруппы антигенпрезентирующих клеток, отличающейся высокой способностью к кросс-презентации антигена.

Ортотопическая мышинная модель РМЖ
клеточной линии ЕМТ6

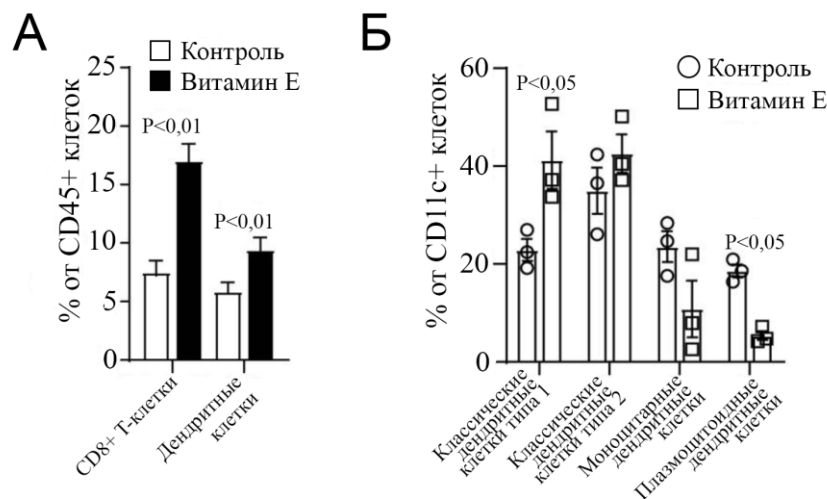


Рисунок 55 – Влияние витамина Е на количество CD8+ Т-клеток и CD11c+ дендритных клеток в опухолевом микроокружении. А) Количество CD8+ Т-клеток и CD11c+ дендритных клеток в ортотопических опухолях линии ЕМТ6, после курса лечения мышей витамином Е или контролем. N=6 биологических повторов. Б) Количественное определение различных субпопуляций CD11c+ дендритных клеток в том же эксперименте

На следующем этапе была проверена гипотеза, согласно которой витамин Е способен усилить терапевтический эффект ИИКТ за счет стимуляции дендритных клеток. Были поставлены мышинные ортотопические модели РМЖ и ПАПЖ, для которых КИ монотерапии ИИКТ не показали значительных успехов. Мыши получали стандартное химиотерапевтическое лечение (доксорубин для РМЖ и гемцитабин для ПАПЖ) в комбинации с ИИКТ (антитело α PD-1) и витамином Е. Было показано что монотерапия химиопрепаратами, а также монотерапия ИИКТ не приводили к улучшению общей выживаемости мышей по сравнению с контролем (Рисунок 56). Комбинация ИИКТ с химиотерапией показала статистически значимое, но умеренное улучшение выживаемости для модели РМЖ, но не для модели ПАПЖ. Примечательно, тройная комбинация химиотерапии, ИИКТ и витамина Е показала высокую противоопухолевую эффективность и достоверное улучшение выживаемости мышей в обеих исследуемых моделях (Рисунок 56). Таким образом, витамин Е может выступать перспективным иммуностимулирующим агентом для усиления ИИКТ в тех нозологиях, где такой вид лечения не показал эффективности в качестве монотерапии.

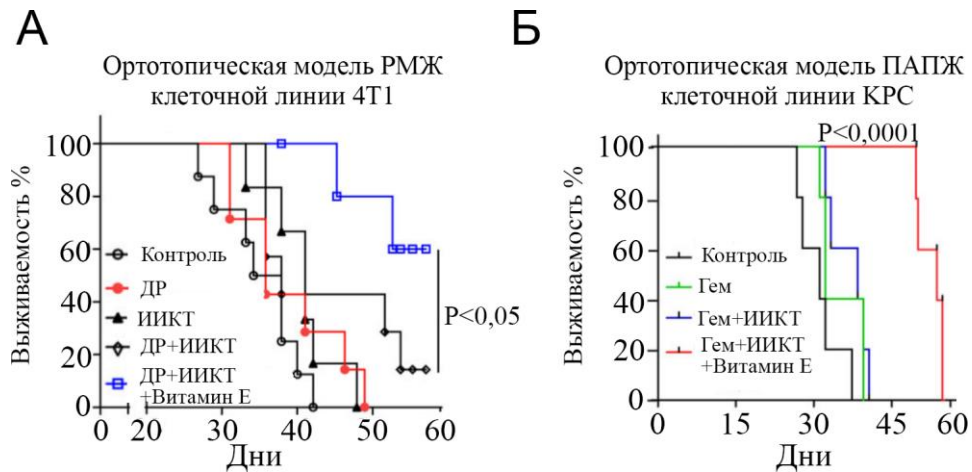


Рисунок 56 – Влияние витамина Е на эффективность лечения ортоотопических мышинных опухолей химиотерапией в комбинации с ИИКТ. А) Кривая выживаемости по Каплану-Майеру для мышей с ортоотопическими опухолями 4Т1, получавших указанное лечение. Б) Кривая выживаемости по Каплану-Майеру для мышей с опухолями ортоотопическими КРС, получавших указанное лечение. N=5–10 биологических повторов на группу для каждого эксперимента.

Далее оценивали влияние витамина Е на антиген-специфический Т-клеточный ответ *in vivo* с использованием подкожной мышинной модели опухоли B16-GMCSF-OVA, в которой иммуногенный белок OVA сверхэкспрессировался в клетках B16-GMCSF для изучения антиген-специфических иммунных ответов против OVA. Было установлено, что лечение витамином Е подавляло рост меланомы в указанной модели (Рисунок 57). Дополнительно оценена эффективность витамина Е в сочетании с терапевтической вакциной ГВАКЦ — аутологичной противораковой вакциной на основе облученных мышинных клеток меланомы B16, генетически модифицированных для секреции GM-CSF [243]. В подкожной модели B16-GMCSF монотерапия вакциной ГВАКЦ не влияла на динамику опухолевого роста по сравнению с контролем, и аналогичные результаты получены для группы, получавшей только витамин Е. Однако комбинация витамина Е с ГВАКЦ приводила к двукратному замедлению опухолевого роста в сравнении с контрольной группой (Рисунок 57). В совокупности эти результаты раскрывают перспективу использования витамина Е как иммуноадьюванта для лечения ЗНО.

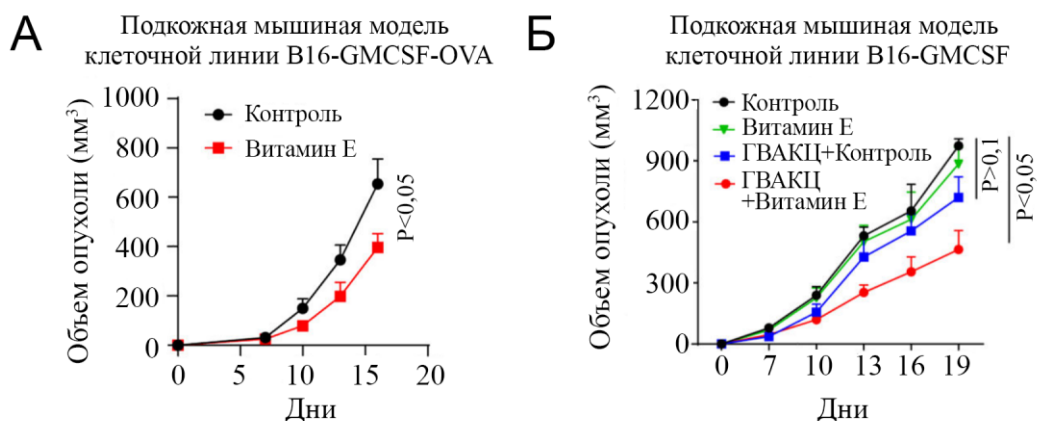


Рисунок 57 – Витамин Е усиливает антигенспецифичный Т-клеточный противоопухолевый ответ *in vivo*. А) Кривые роста подкожных опухолей меланомы B16-GMCSF-OVA у мышей линии OT-I, получавших лечение витамином Е в дозе 50 мг/кг (N=5 биологических повторов) или контролем. Б) Кривые роста ортотопических опухолей B16-GMCSF у мышей, подкожно вакцинированных ГВАКЦ (в дни 1, 4, 7), а затем перорально получавших витамин Е (50 мг/кг/сутки) с 4-го по 20-й день, или контроль. N=6 биологических повторов.

На заключительном этапе было проведено ретроспективное популяционное исследование с целью выяснить, является ли прием витамина Е фактором, связанным с благоприятным прогнозом при лечении ИИКТ. В когорте пациентов с меланомой, получавших лечение в Онкологическом центре им. М.Д. Андерсона (г.Хьюстон, США), анализировались медицинские карты с последующей категоризацией больных по группам согласно приему витаминов и диетических добавок (Рисунок 58).

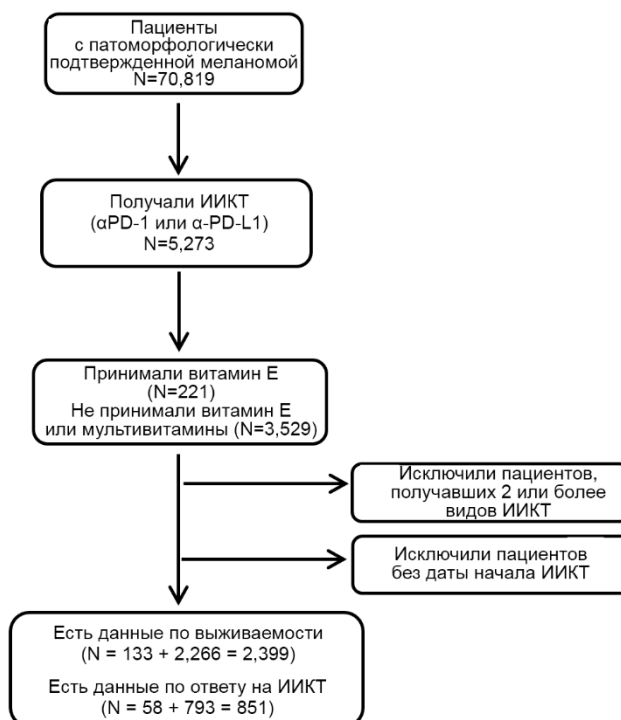


Рисунок 58 – Дизайн ретроспективного исследования

Было установлено, что летальный исход был наиболее редким событием среди пациентов, регулярно принимавших витамин Е в качестве отдельного препарата (не в составе мультивитаминов) (Рисунок 59). Кроме того, прием витамина Е был связан со статистически значимым увеличением выживаемости среди больных меланомой, получавших ИИКТ (Рисунок 59).

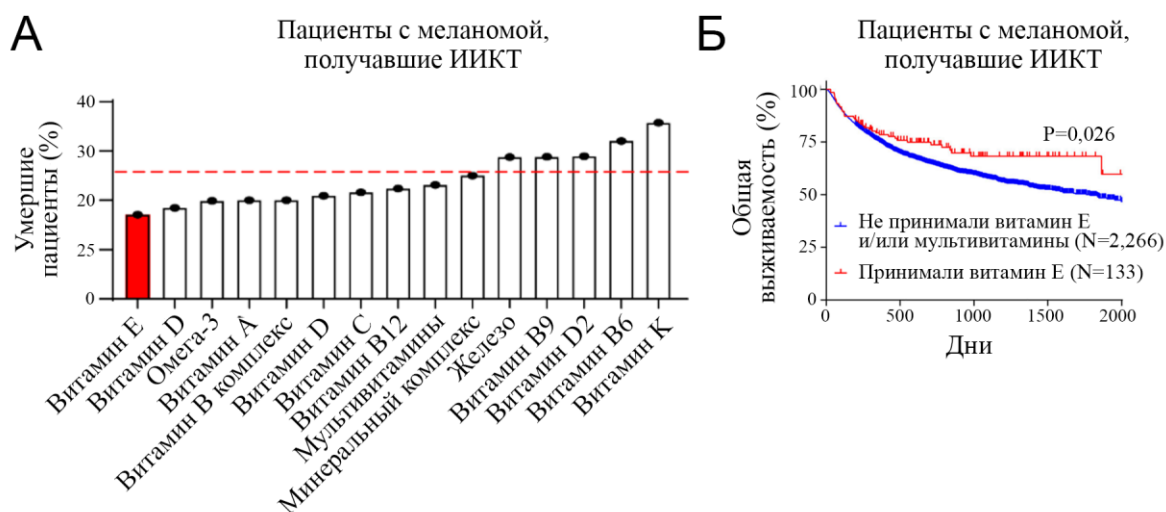
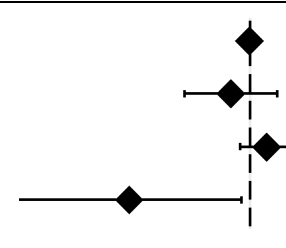


Рисунок 59 – Прием витамина Е связан с пониженной смертностью и улучшенной общей выживаемостью среди пациентов с меланомой, получавших ИИКТ. А) Процент умерших

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. Б) 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

Наконец, многомерный анализ определил прием витамина Е как независимый фактор, определяющий благоприятный исход среди пациентов с меланомой (таблица 8).

Таблица 8 – Многомерный анализ выживаемости пациентов в когорте пациентов с меланомой

Конечная точка	Группа	Отношение рисков (95% ДИ)		Р
Выживаемость	Возраст		1,00 (0,99-1,00)	0,626
	Пол		0,95 (0,83-1,08)	0,419
	Раса		1,05 (0,97-1,13)	0,218
	Витамин Е		0,71 (0,51-0,98)	0,036

Подытожив, витамин Е через активацию дендритных клеток опухолевого микроокружения усиливает антигенспецифичный Т-клеточный ответ и потенциально может использоваться в комбинации с ИИКТ для лечения иммуногенных ЗНО, таких как меланома.

4.4 Нейтрофилы опухолевого микроокружения как фактор активации ангиогенеза солидных ЗНО

Нейтрофилы являются ключевой подгруппой миелоидных клеток, которые наряду с моноцитами/макрофагами и дендритными клетками могут оказывать значимое влияние на патофизиологию ЗНО. Разными авторами были показаны сценарии как положительного, так и отрицательного влияния этой клеточной популяции на рост и развитие солидных опухолей [244]. В контексте развития метастазов, нейтрофилы играют важную роль в развитии предметастатической ниши [245]. Среди задач диссертационного исследования были: i) установить степень инфильтрации нейтрофилами опухолей в мышинных моделях заболевания (на примере печеночных метастазов КРР); ii) выявить, влияет ли терапевтическое нацеливание на

нейтрофилы на темпы развития опухоли *in vivo*, и если да, то исследовать молекулярный механизм этого феномена.

Для оценки инфильтрации нейтрофилами метастазов КРР в печень было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание срезов печеночной ткани органов мышей на специфический маркер Ly6G. Было установлено, что в сравнении со здоровой печенью метастазы показали значительно большее количество нейтрофилов в ксенографтных моделях с использованием клеточных линий HT-29, HCT116 и LoVo (Рисунок 60). Этот результат позволил предположить функциональную значимость этой популяции клеток для развития печеночных метастазов КРР.

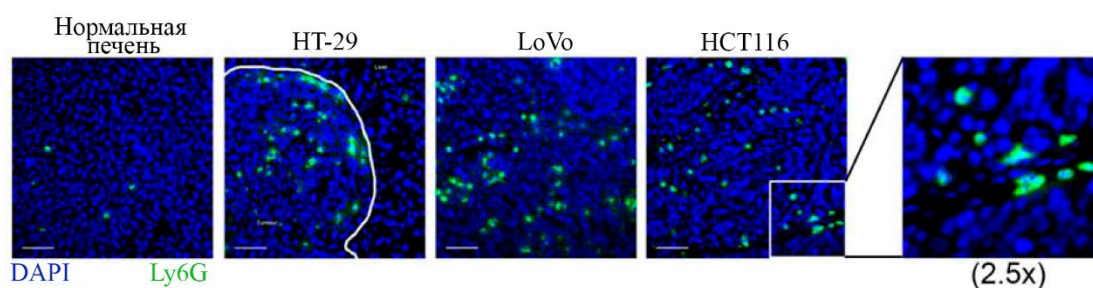


Рисунок 60 – Микрофотографии репрезентативных образцов печени контрольных мышей линии SCID и мышей с метастазами КРР, окрашенных на маркеры Ly6G (зеленый) и DAPI (синий). Белая линия обозначает границу между нормальной тканью печени и зоной метастаза, где виден участок нормальной печени. Шкала=40 мкм

Для определения динамики роста опухоли в клеточные линии КРР HT-29, HCT116 и LoVo был введен генноинженерный конструкт pLuc (люцифераза светлячка), который позволял отслеживать биOLUMИнесцентный сигнал опухоли как *in vivo*, так и *ex vivo*. Далее проводили постановку экспериментальной модели печеночных метастазов КРР путем инъекции клеток в паренхиму селезенки. Через 7 суток после инъекции мыши получали лечение нейтрализующими антителами α Ly6G или IgG до достижения конечной точки. Оценка нормализованного потока фотонов показала значительное снижение опухолевой массы у мышей, получавших лечение α Ly6G (Рисунок 61, Рисунок 62).

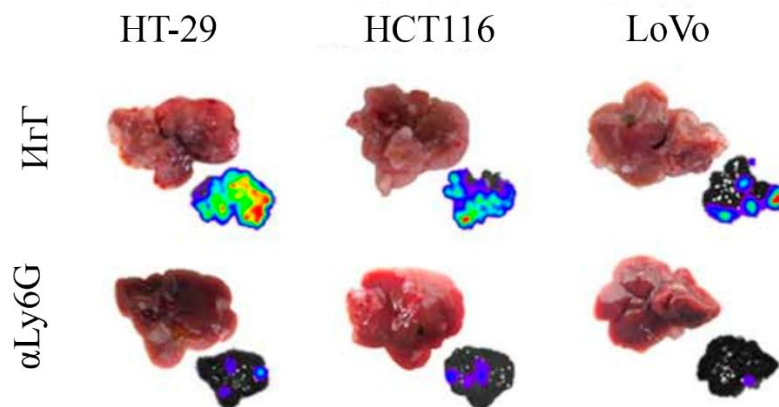


Рисунок 61 – Фотографии печени мышей с терминальной стадией метастазов KPP, которые получали лечение IgG или α Ly6G с интервалом в 24 часа, начиная с 7-го дня после инъекции опухолевых клеток

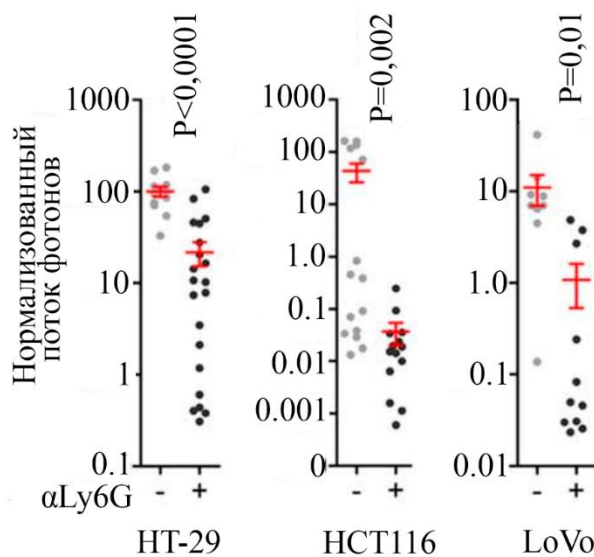


Рисунок 62 – Нормализованная люминесценция печени, зарегистрированная *ex vivo*, у мышей с метастазами KPP

Поскольку нейтрофилы способны экспрессировать VEGFP1 и регулировать ангиогенез [246], было проведено иммуноокрашивание опухолевой ткани из групп α Ly6G и IgG на маркер эндотелия CD31. Установлено, что метастазы с нейтрофилами в опухолевом микроокружении характеризовались развитой микрососудистой сетью (Рисунок 63), в то время как таргетирование нейтрофилов приводило к снижению области CD31+ окрашивания (таблица 9).

Таблица 9 – Подсчет процента области покрытия CD31+ в опухолевой ткани у мышей с печеночными метастазами, получавшими IgG или α Ly6G. Для подсчета использовалось >5 полей зрения, N=3. Т-критерий Стьюдента

	Область CD31+ (%)		
Группа	IgG	α Ly6G	P
HT-29	9,3 $\pm$ 0,6	6,9 $\pm$ 0,6	<0,05
HCT116	5,6 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,7	<0,05
LoVo	6,0 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,4	<0,05

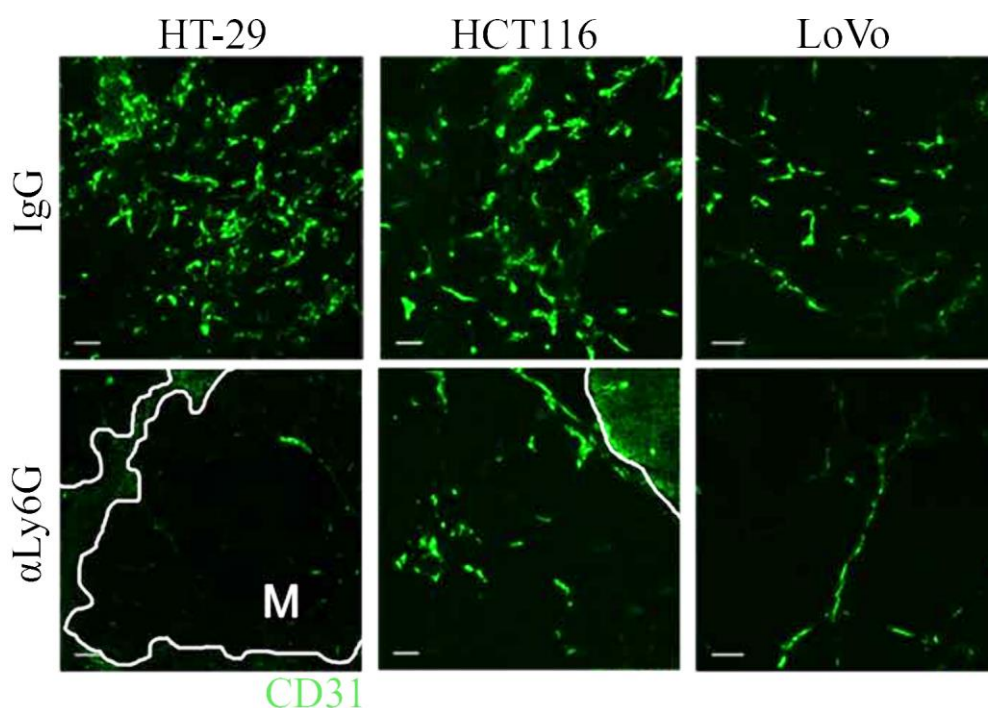


Рисунок 63 – Иммуногистохимическое окрашивание на CD31 в образцах печени мышей с метастазами KPP, которые получали лечение антителами IgG или α Ly6G. Белая линия обозначает границу между нормальной тканью печени и метастазом в тех случаях, когда видна нормальная ткань. Шкала=80 мкм

Кроме того, нейтрофилы находились в непосредственной близости от капилляров опухоли, что подтверждалось статистическим анализом расстояния между нейтрофилами и другими типами клеток опухоли (Рисунок 64А-В). В совокупности, эти результаты показывают связь между опухоль-ассоциированными нейтрофилами и ангиогенезом.

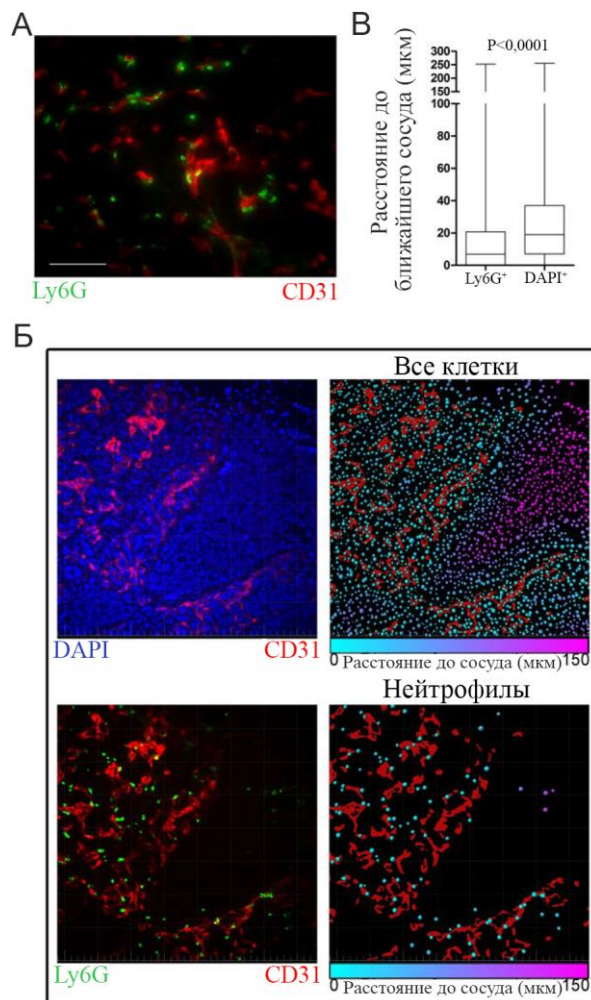


Рисунок 64 – Преимущественное расположение нейтрофилов в периваскулярном пространстве печеночных метастазов KPP. А) Иммуногистохимическое окрашивание срезов метастаза рака HT29 в печени, демонстрирующее окрашивание Ly6G (зеленый) и CD31 (красный). Шкала=40 мкм. Б) Анализ изображений в программе Imaris™ для определения взаимосвязи между расположением нейтрофилов и близостью к сосудам. Вверху слева показано окрашивание сосудов (CD31, красный) и ядер (DAPI, синий). На соответствующем изображении (вверху справа): клетки DAPI+ окрашены в соответствии с их расстоянием до ближайшей области CD31+; шкала цветового кодирования расстояний показана ниже. Внизу слева показано окрашивание сосудов (CD31, красный) и нейтрофилов (Ly6G, зеленый). На соответствующем изображении (внизу справа): клетки Ly6G+ окрашены в соответствии с их расстоянием до ближайшей области CD31+; шкала цветового кодирования расстояний показана ниже. В) Диаграмма типа «ящик с усами», показывающая расстояние от ближайшей области CD31+ для клеток Ly6G+ или DAPI+. Данные получены на основе анализа не менее 5 областей опухоли от 5 мышей.

В целях определения способности нейтрофилов печеночных метастазов к продукции факторов, стимулирующих ангиогенез, было проведено сравнение профилей мРНК нейтрофилов, выделенных методом клеточного сортирования из метастазов печени и из печени здоровых мышей. Установлено, что экспрессия фактора роста фибробластов 2 (FGF2), фибронектина и серпина Е1 была повышена десятикратно в нейтрофилах печеночных метастазов всех трех исследованных линий КРР по сравнению с нейтрофилами здоровой печени (Рисунок 65).

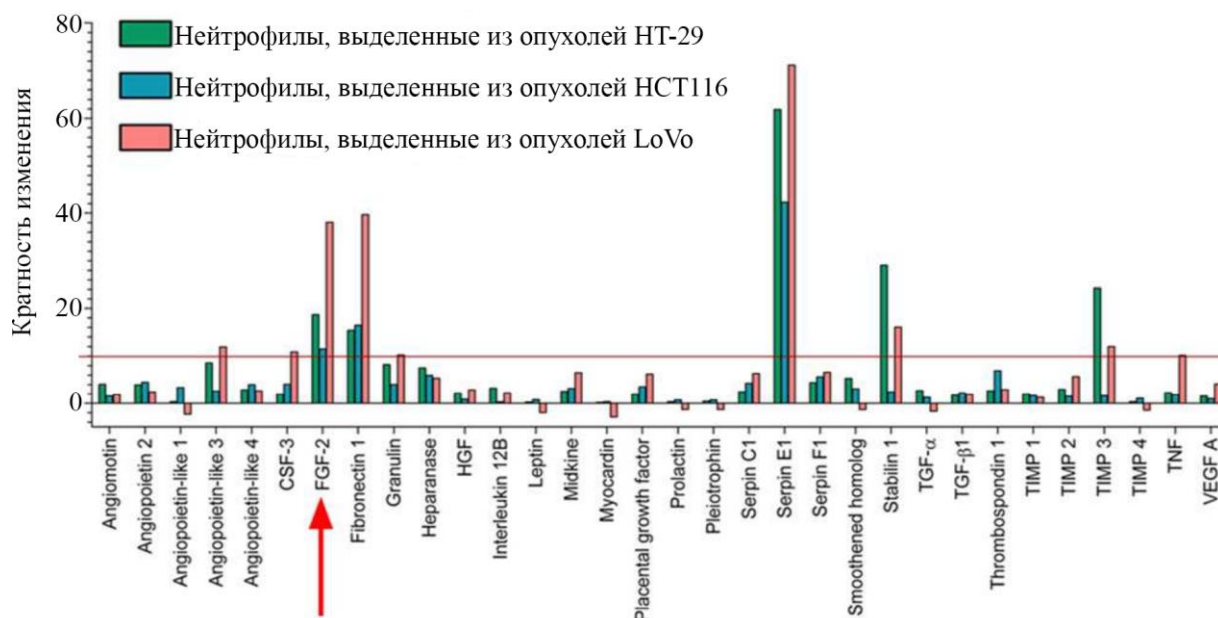


Рисунок 65 – Количественная ПЦР в реальном времени для определения генной экспрессии факторов, стимулирующих ангиогенез, в нейтрофилах, выделенных из печеночных метастазов клеточных линий HT-29, HCT116 или LoVo. Уровни экспрессии представлены относительно наивных нейтрофилов, выделенных из печени здоровых мышей. Красная линия указывает на 10-кратное относительное изменение уровня экспрессии

Для подтверждения этих данных *in vivo* были определены уровни экспрессии *FGF2* в нейтрофилах и других типах клеток опухоли. Среди клеточных популяций опухолевого микроокружения печени наиболее высокие уровни мРНК *FGF2* были обнаружены в нейтрофилах (CD11b+Ly6G+), по сравнению с раковыми клетками (GFP+), другими миелоидными клетками (CD11b+Ly6G-) и прочими клетками (GFP-CD11b-Ly6G-) (Рисунок 66).

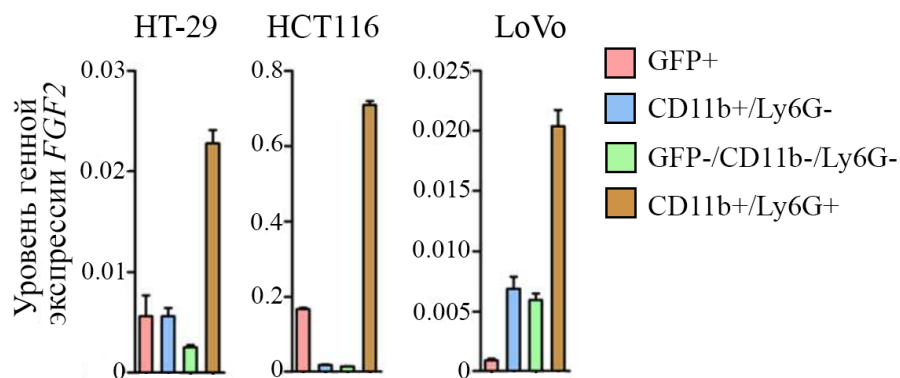


Рисунок 66 – Относительный уровень генной экспрессии *FGF2* в опухолевых клетках (GFP⁺), миелоидных клетках (CD11b⁺/Gr1⁻), нейтрофилах (CD11b⁺/Gr1⁺) и других типах клеток (GFP⁻/CD11b⁻/Gr1⁻), выделенных методом клеточного сортирования из печеночных метастазов указанных клеточных линий

Кроме того, в метастазах печени мышей, получавших лечение антителами α Ly6G, было выявлено достоверное снижение уровня белка FGF2 в сравнении с опухолями контрольных животных при анализе методом иммуноблоттинга (Рисунок 67).

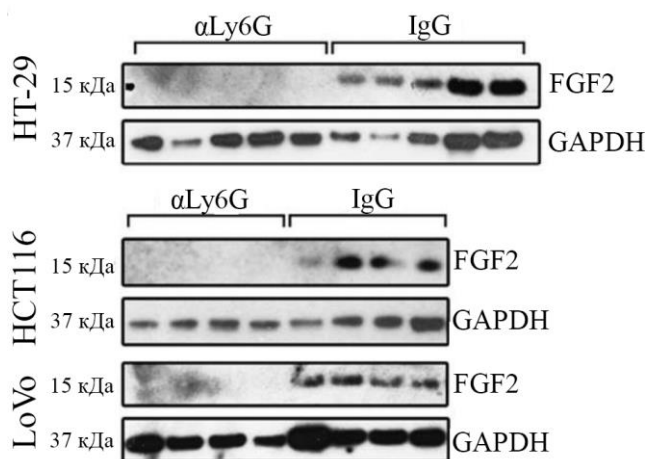


Рисунок 67 – Результаты иммуноблоттинга на белок FGF2 в образцах печеночных метастазов мышей, которые получали лечение антителами IgG или α Ly6G

Методом иммуноокрашивания было показано, что FGF2 локализовался в двух различных компартментах опухоли, а именно в самих нейтрофилах и в ВКМ (Рисунок 68). Большинство Ly6G⁺ нейтрофилов печеночных метастазов экспрессировали FGF2 (Рисунок 68).

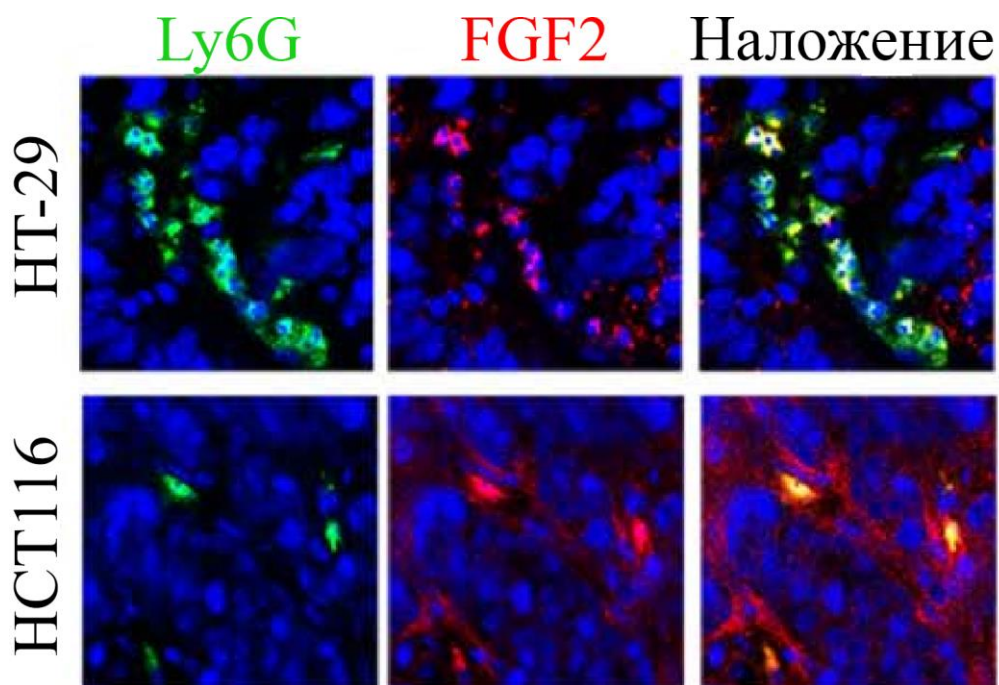


Рисунок 68 – Совместное окрашивание (ко-локализация) печеночных метастазов указанных клеточных линий на маркеры Ly6G⁺ нейтрофилов (зеленый), FGF2 (красный) и DAPI (синий)

Для изучения роли FGF2 в контексте печеночных метастазов было исследовано влияние терапии моноклональными антителами, блокирующими этот фактор роста (GalF2 [247]), на рост метастатического КРР. При введении GalF2 мышам каждые 48 часов через одну неделю после инъекции злокачественных клеток было достигнуто снижение как количества так и размера печеночных метастазов (Рисунок 69).

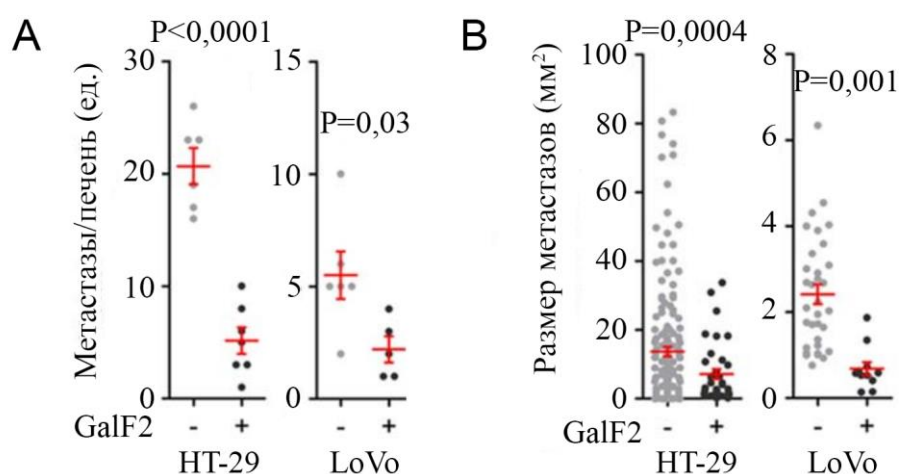


Рисунок 69 – Количество видимых метастазов (А) и площадь поверхности (мм²) каждого метастатического очага печени (Б) у мышей, получавших лечение IgG или антителом GalF2 с

интервалом в 72 часа, начиная со 2-й недели после инъекции указанных опухолевых клеточных линий

Было показано, что плотность CD31+ сосудов была достоверно снижена в опухолях мышей, получавших лечение GalF2 (Рисунок 70). Кроме того, было выявлено изменение сосудистой архитектуры, проявляющееся в снижении ветвления сосудов в группе мышей, получавших GalF2 (Рисунок 70). Эти морфологические изменения соответствуют феномену так называемой «сосудистой нормализации» [248]. Особенности такой «нормализации» сосудов в том, что они становятся более упорядоченными, менее проницаемыми и лучше покрыты перицитами. При этом снижается внутриопухолевое давление и улучшается доставка лекарств и кислорода [248]. При такой нормализации уменьшаются хаотичность ветвления, число слепых и тупиковых сосудов, а также выраженность отека и гипоксии в опухоли [248]. Стоит отметить, что ранее была показана роль FGF-2 в ангиогенезе [249]. Таким образом, снижение гипоксии в проведенном эксперименте может быть связано именно с процессами нормализации сосудов в опухоли.

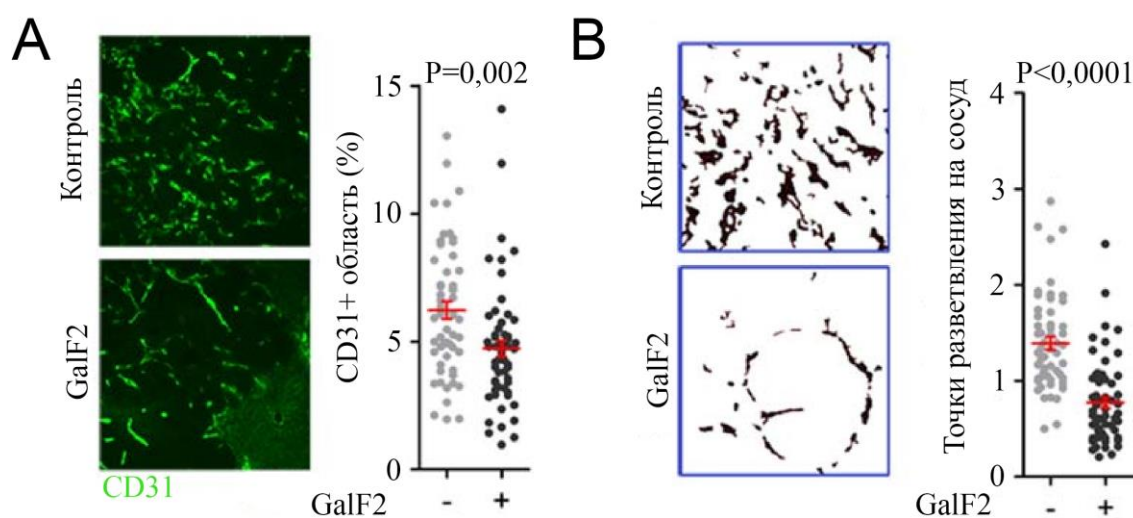


Рисунок 70 – Слева: иммуногистохимическое окрашивание и количественная оценка площади окрашивания CD31 (зеленый) в печеночных метастазах линии HT-29 у мышей, которые получали лечение IgG или антителом GalF2. Шкала=80 мкм. Справа: визуализация и количественная оценка точек ветвления сосудов в печеночных 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

Поскольку плотность сосудов и их разветвленность снижались, было предположено что сосудистая нормализация приведет к изменениям в кислородном балансе опухолевой ткани. Был использован гистологический маркер гипоксии EF5, нитроимидазольное соединение, которое способно визуализировать уровень кислорода в тканях *in vivo* за счет восстановления нитрогрупп ферментами нитроредуктазами [250]. Установлено, что опухоли мышей, получавшие терапию антителом GalF2, показывали значительное снижение гипоксии по сравнению с опухолями контрольных животных, что указывает на улучшение функции сосудов и лучшую оксигенацию опухоли несмотря на снижение общей плотности сосудов (Рисунок 71).

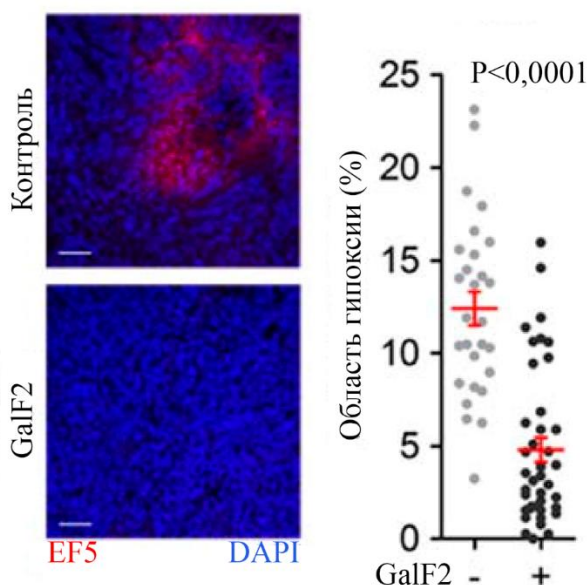


Рисунок 71 – Иммуноокрашивание (слева) и количественная оценка (справа) EF5+ зоны гипоксии в печеночных метастазах НТ-29 в процентах от общей площади опухолевого очага у мышей, получавших лечение IgG или GalF2

Таким образом, проведенные исследования выявили проопухолевую роль нейтрофилов в микроокружении печеночных метастазов KPP, реализуемую за счет секреции FGF2 и активации ангиогенеза опухоли.

4.5 Подавление экспрессии МНС-I опухолевыми клетками посредством взаимодействия с нормальными клетками опухолевого микроокружения, для уклонения от антигенспецифичного Т-клеточного ответа

Проведенные работы в рамках исследования показали, что иммунные клетки микроокружения и опухолевые клетки находятся в динамическом взаимодействии и активно обмениваются информацией посредством секреции сигнальных белков, в первую очередь цитокинов и хемокинов. Для определения ключевых компонентов опухолевого сигналинга,

ответственного за взаимодействие с иммунным компонентом микроокружения были исследованы уровни белков семейства CDK в метастатических тканях. Традиционно CDK рассматривались исключительно как регуляторы клеточного цикла [27], однако современные исследования показывают, что они выполняют «неканонические» функции, напрямую влияя на иммунный ландшафт опухоли. Эти механизмы варьируются в зависимости от конкретного типа киназы. Например, активность CDK4/6 в злокачественных клетках снижает экспрессию генов, ответственных за презентацию антигенов (в частности, молекул MHC-I) [251]. Это позволяет опухоли избегать распознавания иммунной системой. Ингибирование CDK4/6, напротив, имитирует вирусную атаку, индуцируя выработку интерферонов III типа и повышая экспрессию MHC-I, что делает опухоль видимой для иммунитета [251].

Для исследования была выбрана модель метастазов в головной мозг, поскольку этот орган считается «иммунопривилегированным» [252]. В норме мозг защищен от активных иммунных ответов, которые в других органах служат стандартной защитой от патогенов. Физические структуры, окружающие головной мозг, блокируют распространение лимфатических сосудов и ограничивают доступ иммунных клеток. Главную роль играет ГЭБ — высокоселективная мембрана, которая строго регулирует проникновение веществ и кровяных клеток в нервную ткань. В связи с этим предполагалось, что выбранная модель обеспечит наиболее строгие критерии валидации из-за селективности иммунного ответа в этом органе.

Экспрессия генов CDK была проанализирована в тканях первичной опухоли пациентов с РМЖ и в спаренных опухолевых метастазах головного мозга этих пациентов (РМЖ-ММ). Экспрессию генов в РМЖ-ММ нормализовали по уровню соответствующих генов в РМЖ, после чего ранжировали гены по уровню мозг-специфичной экспрессии. Биоинформатический анализ выявил, что CDK5 имел самый высокий уровень экспрессии в РМЖ-ММ относительно РМЖ (Рисунок 72). Примечательно, что уровни CDK4/6 в РМЖ-ММ были понижены по сравнению с соответствующими уровнями в первичном РМЖ (Рисунок 72). Параллельно был проведен биоинформатический анализ набора данных по ортотопической мышинной модели РМЖ/РМЖ-ММ с использованием клеточной линии MDA-MB-231. В этом анализе также сравнивали уровни экспрессии всех генов семейства CDK, среди которых CDK5 показал наиболее высокий уровень экспрессии в РМЖ-ММ по сравнению с РМЖ (Рисунок 72).

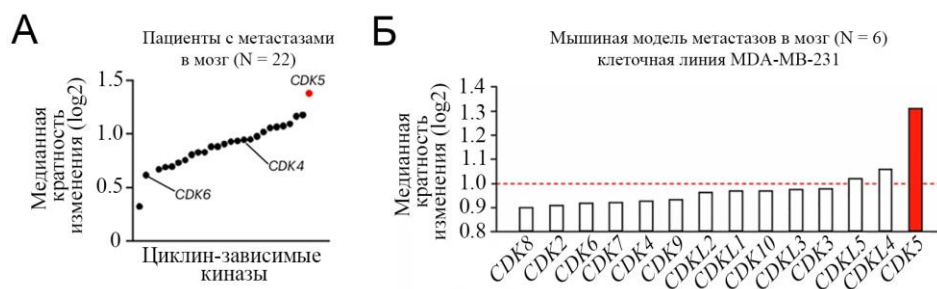


Рисунок 72 – Результаты биоинформатического анализа. А) Медианное изменение уровня экспрессии генов семейства *CDK* в церебральных метастазах пациентов (N=22), нормализованное относительно соответствующей экспрессии в спаренных первичных опухолях РМЖ. Б) Медианное изменение уровня экспрессии генов семейства *CDK* в церебральных метастазах мышей, нормализованное относительно соответствующей экспрессии в спаренных первичных опухолях

Для валидации полученных результатов были окрашены на CDK5 гистологические срезы образцов РМЖ и неспаренных РМЖ-ММ из архива биобанка Онкологического центра им. М.Д. Андерсона. Выявлено достоверное увеличение интенсивности окрашивания на CDK5 в тканях РМЖ-ММ в сравнении с РМЖ (Рисунок 73).



Рисунок 73 – Результаты иммуногистохимического анализа. А) Репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания на CDK5 в указанных тканях онкологических больных. Б) Гистохимический индекс CDK5 в указанных тканях онкологических больных. Шкала=100 мкм

На основании полученных результатов была выдвинута гипотеза о функциональной значимости CDK5 для развития РМЖ-ММ. Для ее проверки в клеточную линию РМЖ EO771.Вг3 вводился генноинженерный конструкт, несущий короткую шпильковую РНК, нацеленную на CDK5 (shCDK5), что привело к стабильному нокдауну гена *CDK5* в раковых клетках (Рисунок 74). Далее контрольные и shCDK5 клетки вводили в сонную артерию иммунокомпетентных мышей для формирования метастатических очагов в головном мозге. Было показано, что

выживаемость мышей с РМЖ-ММ с shCDK5 была достоверно выше, чем у контрольной группы, что указывает на важность CDK5 для метастатического роста опухоли (Рисунок 74).

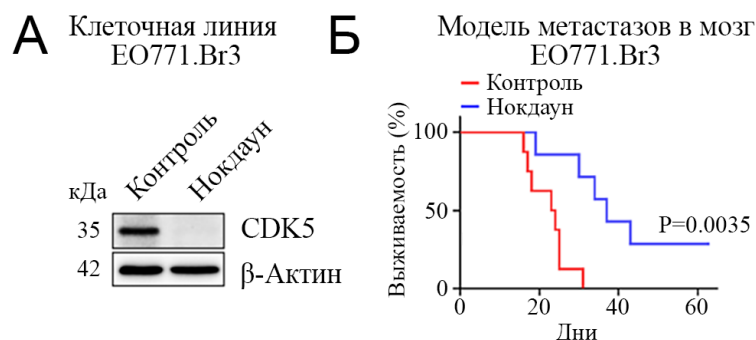


Рисунок 74 – Валидация *in vitro* и *in vivo*. А) Иммуноблоттинг на указанные белки в клетках EO771.Br3 с нокдауном гена *CDK5* и без такового (контроль). Б) Выживаемость мышей с церебральными метастазами, индуцированных клетками EO771.Br3 с нокдауном *CDK5* и без такового (контроль)

Аналогично результатам, полученным *in vivo*, данные биоинформатического анализа пациентов с РМЖ-ММ также свидетельствовали о связи высокой опухолевой экспрессии *CDK5* с низкой выживаемостью онкобольных (Рисунок 75).

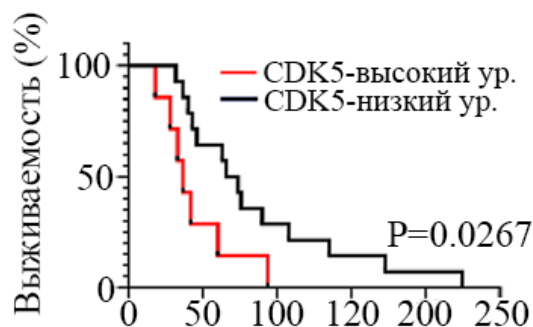


Рисунок 75 – Общая выживаемость пациентов с церебральными метастазами с высоким или низким опухолевым уровнем экспрессии гена *CDK5*

Для определения молекулярного механизма, ответственного за *CDK5*-опосредованное развитие РМЖ-ММ, было проведено секвенирование единичных клеток опухолей, извлеченных из мозга мышей с метастазами с нокдауном *CDK5* и контрольными метастазами. Для этого в клеточную линию EO771.Br3 вводился генноинженерный конструктор, несущий зеленый флуоресцентный белок (GFP). По достижению конечной точки *in vivo* эксперимента, GFP+

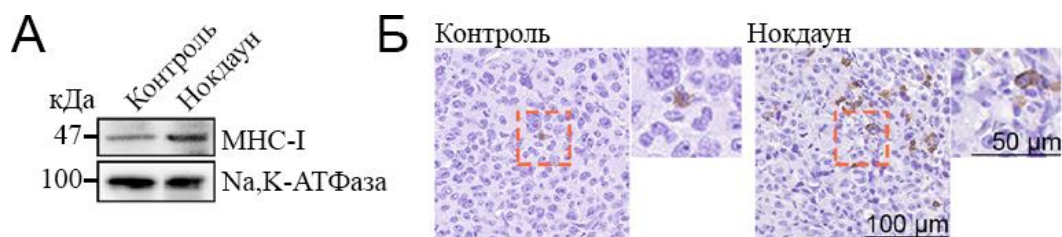


Рисунок 78 – Валидация результатов секвенирования. А) Иммуноблоттинг на указанные белки в клетках EO771.Br3 с нокдауном CDK5 и без такового (контроль). Б) Репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания на CD8 в церебральных метастазах мышей, индуцированных клетками EO771.Br3 с нокдауном CDK5 и без такового (контроль)

Также был проведен анализ субпопуляций Т-клеток в опухолевом микроокружении церебральных метастазов. Помимо выделения GFP⁺ опухолевых клеток, в вышеупомянутом эксперименте параллельно проводили флуоресцентный сортирование CD45⁺ клеток, которые также подвергались scRNA-seq анализу. Было показано, что нокдаун CDK5 приводил к изменению уровней экспрессии ключевых функциональных маркеров Т-клеток. Так, CD8⁺ Т-лимфоциты в группе shCDK5 в среднем имели повышенный уровень экспрессии GZMB (Рисунок 79), что согласуется с вышеупомянутыми изменениями в направлении активации адаптивного иммунного ответа.

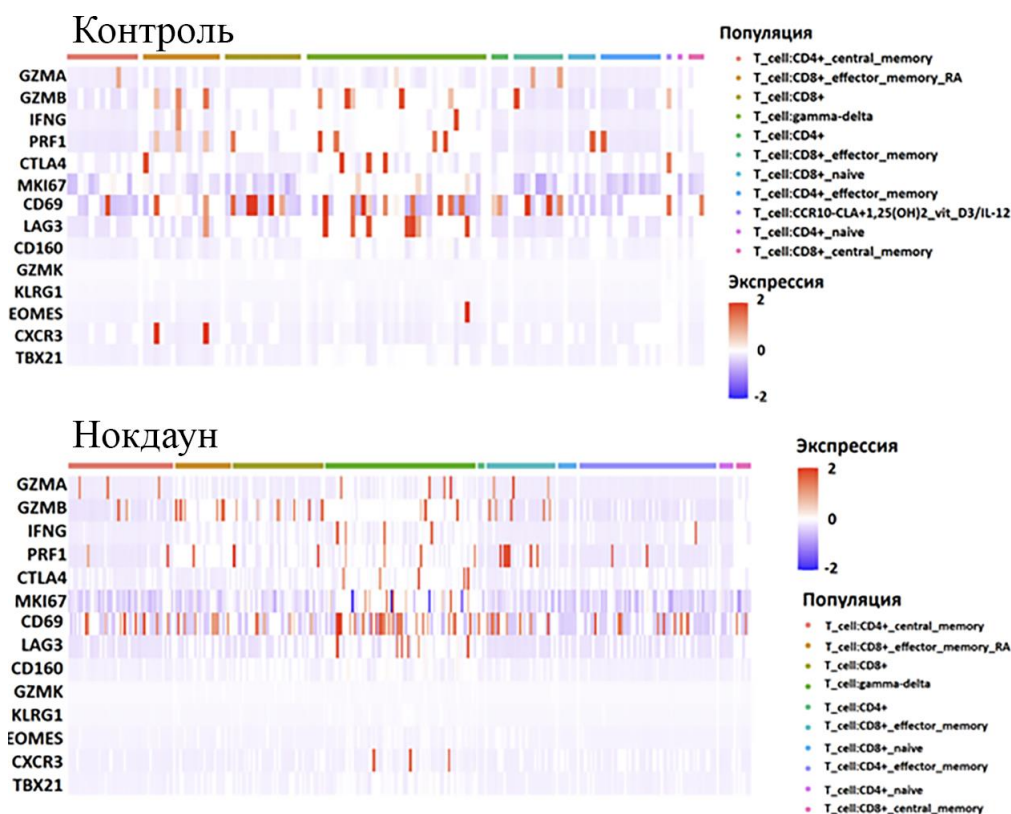


Рисунок 79 – Тепловая карта экспрессии исследуемых генов с цветовыми обозначениями уровней экспрессии и типов клеток. Названия генов приведены в левой панели карты. Красный цвет в ячейке – высокий уровень экспрессии соответствующего гена, синий цвет – низкий уровень экспрессии. Обозначение Т-клеточных популяций приведено в правой панели. Верхняя панель отображает принадлежность ячеек к определенной субпопуляции Т-клеток. Сверху: карта, составленная на основе данных РНК-секвенирования для контрольной группы без нокдауна *Cdk5* (контроль). Снизу – карта, составленная на основе данных РНК-секвенирования для группы с нокдауном гена *Cdk5* (shCdk5)

При интракаротидной инъекции раковых клеток с shCDK5 при использовании блокирующих антител α CD8 было полностью нивелировано влияние нокдауна *CDK5* на выживаемость мышей при РМЖ-ММ (Рисунок 80). Это контрастировало с различиями в выживаемости, наблюдавшимися у иммунокомпетентных мышей (Рисунок 74).

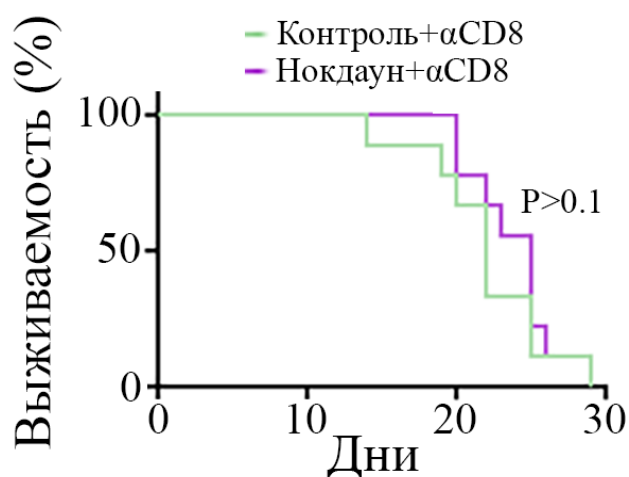


Рисунок 80 – Кривые выживаемости мышей с церебральными метастазами, полученными путем интракаротидной инъекции опухолевых клеток EO771.Br3 с нокдауном CDK5 и без такового (контроль). Мыши в обеих группах получали нейтрализующие антитела α CD8 для системной деплеции цитотоксических Т-лимфоцитов

Для терапевтического таргетирования CDK5 в модели РМЖ-ММ был использован специфичный ингибитор росковитин, который подавлял активность CDK5 уже через 15 мин после обработки опухолевых клеток (Рисунок 81).

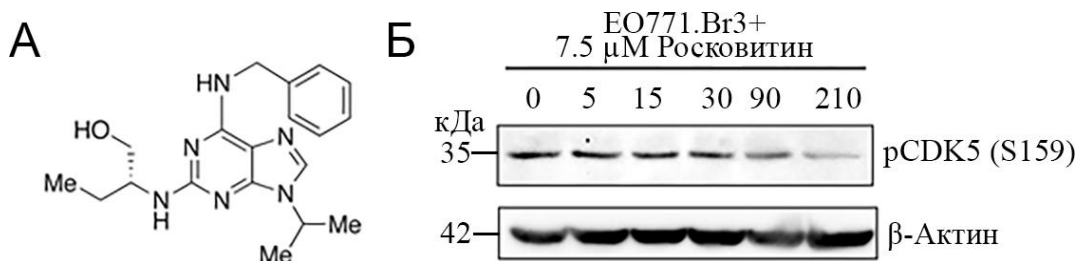


Рисунок 81 – Химическая формула росковитина (А) и валидация ингибирующего эффекта росковитина на киназную активность CDK5 в опухолевых клетках EO771.Br3 методом иммуноблоттинга (Б)

Для оценки биодоступности и токсичности росковитина проводили ряд исследований. После курса лечения росковитином *in vivo*, образцы РМЖ-ММ подвергались анализу методом масс-спектрометрии, которая подтвердила доставку клинически релевантных концентраций препарата в очаг опухоли (таблица 10). Кроме того, было установлено, что уровни основных маркеров повреждения тканей в сыворотке крови не повышались, что свидетельствует об общей переносимости росковитина при применяемых дозах (таблица 11).

Таблица 10 – Концентрация росковитина в РМЖ-ММ по результатам масс-спектрометрии

Образец №	нМ/мг
0418	90,96
0419	34,58
0420	104,15
Среднее значение	76,5

Таблица 11 – Сывороточная концентрация маркеров АЛТ, АСТ, ЛДГ у мышей после двухнедельного курса лечения росковитином (среднее значение ± стандартное отклонение).

Маркер	Контроль (N=4)	Росковитин (N=4)	P
АЛТ	2330,75±1465,37	869,25±368,32	0,1
АСТ	347,75±159,18	177±50,81	0,2
ЛДГ	5588,25±2437,59	2313±789,63	0,04

АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспаратаминотрансфераза, ЛДГ — лактатдегидрогеназа.

При введении росковитина мышам с РМЖ-ММ было выявлено значительное снижение как частоты, так и размера церебральных метастазов. Было продемонстрировано, что лечение росковитином приводило к снижению частоты и общей площади метастазов как в модели «холодной» опухоли 4T1.Br3, так и в более иммуногенной модели T11 (Рисунок 82). При применении росковитина было выявлено значительное повышение инфильтрации метастазов CD8⁺ Т-лимфоцитами (Рисунок 83).

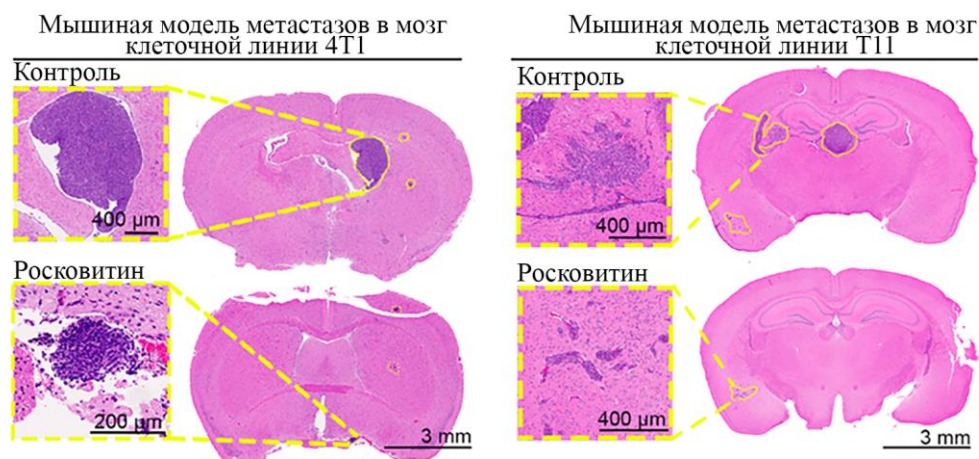


Рисунок 82 – Репрезентативные микрофотографии головного мозга мышей, получавших указанное лечение, после окрашивания ГЭ.

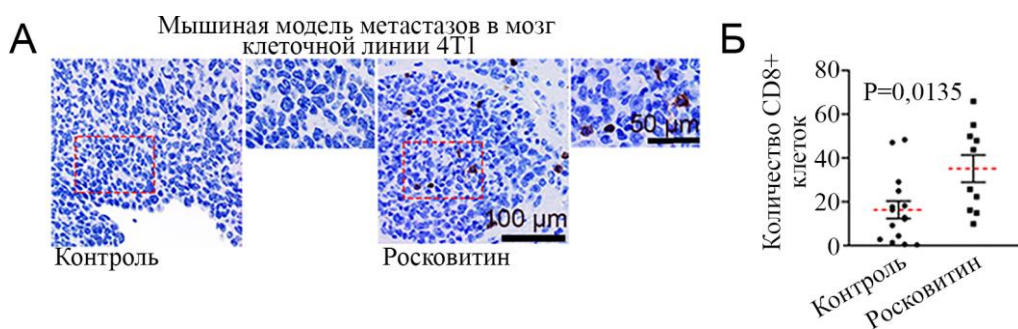


Рисунок 83 – Результаты иммуногистохимического анализа. А) Репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания на CD8 в церебральных метастазах мышей, индуцированных клетками 4T1.Br3 после курса лечения росковитином или контролем (ДМСО). А) Подсчет количества CD8⁺ клеток в группах. N=3 биологических повтора

Полученные результаты позволили предположить, что росковитин может усиливать терапевтический эффект ИИКТ, которые не показали должной эффективности при лечении больных с РМЖ [253]. При проведении *in vivo* исследования на мышах с РМЖ-ММ (модель T11)

было установлено, что комбинированное лечение росковитином и α PD-1 приводило к значительному замедлению роста церебральных метастазов (Рисунок 84, Рисунок 85). Было выявлено, что монотерапия ИИКТ (α PD-1) не изменяла частоту метастатических кластеров по сравнению с контрольной группой (Рисунок 85). Напротив, комбинированный режим росковитина и α PD-1 приводил к статистически значимому снижению размеров опухоли, при этом лишь у небольшого числа мышей были обнаружены различимые метастатические кластеры (Рисунок 85). Примечательно, что комбинированное лечение росковитином и α PD-1 приводило к повышению содержания CD8⁺ GZMB⁺ инфильтрирующих Т-лимфоцитов в церебральных метастазах по сравнению с другими группами лечения (Рисунок 86).

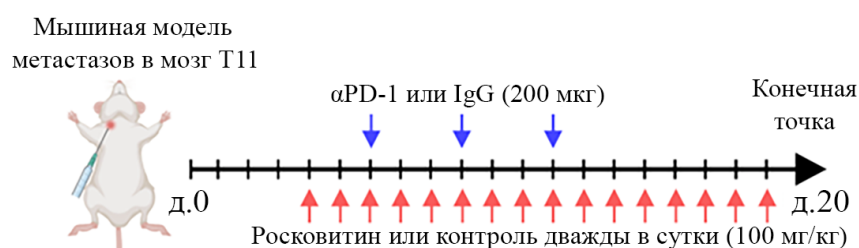


Рисунок 84 – Дизайн *in vivo* исследования

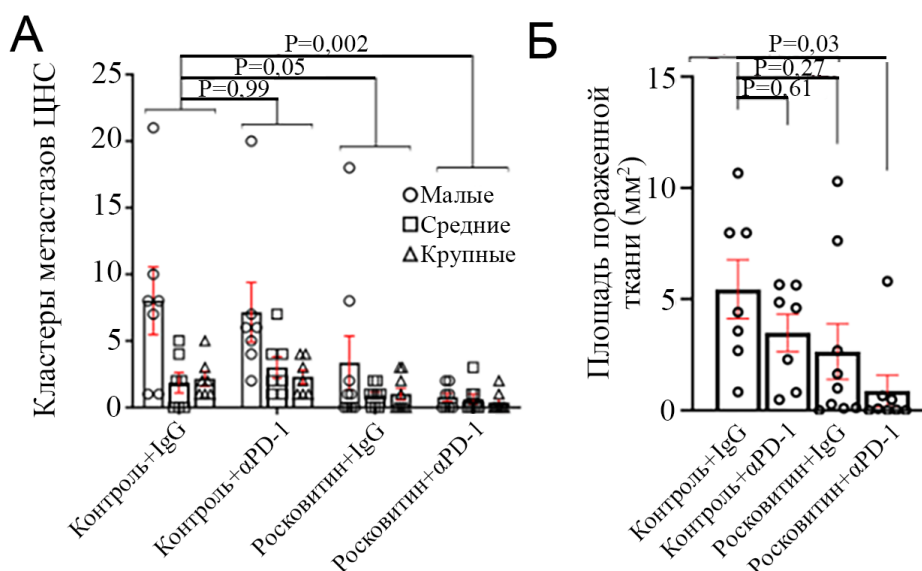


Рисунок 85 – Количество опухолевых кластеров (А) и площадь пораженной опухолью ткани мозга (Б) у мышей, получавших указанное лечение. N=7-9 биологических повторов

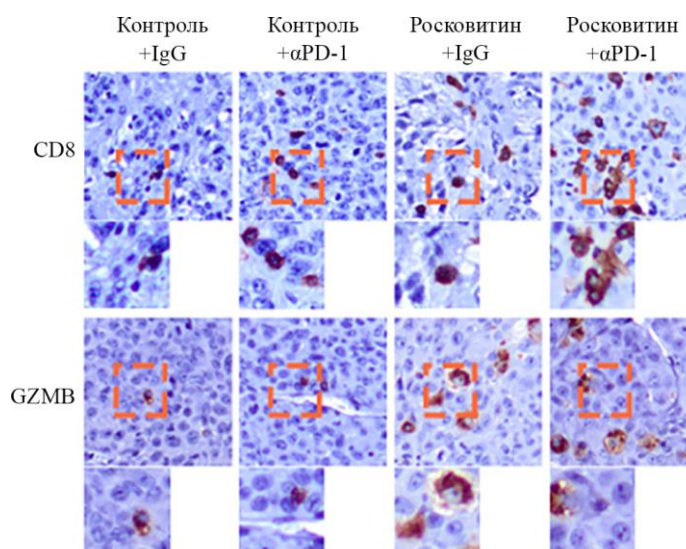


Рисунок 86 – Репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания на маркеры CD8 (сверху) и GZMB (снизу) в церебральных метастазах мышей, получавших указанное лечение

Поскольку в литературе не было обнаружено данных о связи между CDK5 и регуляцией МНС-I и/или адаптивным иммунным ответом, были предприняты попытки провести углубленный анализ этого взаимодействия с целью раскрытия новых молекулярных механизмов развития ЗНО. Для выявления механизмов CDK5-опосредованного подавления МНС-I был проведен анализ субстратов CDK5 с использованием фосфопротеомики в клетках РМЖ линии 4T1 с нокдауном CDK5 и в контрольных клетках. С целью идентификации потенциальных регуляторов был использован метод стабильно-изотопного мечения аминокислот при культивировании в клеточной культуре (англ. SILAC-phosphoproteomics). При анализе клеток с нокдауном CDK5 было выявлено, что большинство дефосфорилированных белков были связаны с известной функцией CDK5 – сборкой микротубулярных структур, включая Map1b и другие (Рисунок 87). 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 интерфероновой сигнализации. Анализ показал, что фосфорилирование Irf2bp1 по остатку серина S66 было ингибировано на 51% при нокдауне CDK5 (Рисунок 87).

Дефосфорилированные белки
(нокдаун в сравнении с контролем)

Белок	Кратность изменения (log10)	
Tpx2	-0.88	Известные мишени для фосфорилирования CDK5
Afp1	-0.57	
Ubx1	-0.55	
Ahn1	-0.54	
Map7d1	-0.52	Медиатор иммунного ответа, белок связывающий фактор регуляции интерферона 2 (IRF-2)
Irf2bp1	-0.51	
Nop56	-0.51	Известные мишени для фосфорилирования CDK5
Gm44505	-0.49	
Mia2	-0.49	
Larp4b	-0.48	
Mybbp1a	-0.45	
Map1b	-0.44	
Cdk12	-0.36	
Cdc42bpb	-0.36	
Gatad2b	-0.33	
Ybx3	-0.33	
Pds5b	-0.30	

Клеточная линия 4T1

Рисунок 87 – Результаты масс-спектрометрического исследования фосфорилированных белков в культурах клеточных линий 4T1 с нокдауном CDK5 и без такового (контроль).

При иммунопреципитации Irf2bp1 из клеток с нокдауном CDK5 уровни фосфосерина были достоверно снижены (Рисунок 88), что указывает на роль CDK5 в фосфорилировании этого белка. Данный результат позволил предположить возможность прямого фосфорилирования белком CDK5 белка Irf2bp1.

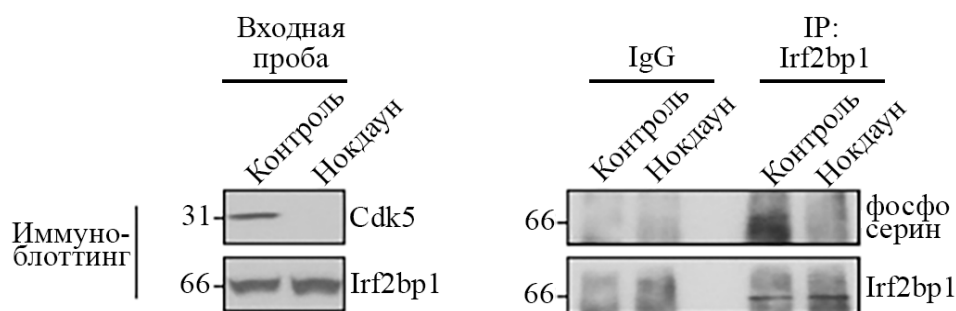


Рисунок 88 – Результаты иммуноблоттинга на общий фосфосерин после иммунопреципитации Irf2bp1 из клеточной линии 4T1.Br3

При проведении экспериментов иммунопреципитации с последующим иммуноблоттингом было установлено, что CDK5 и Irf2bp1 образуют протеиновый комплекс в опухолевых клетках (Рисунок 89), что обуславливает возможность фосфорилирования Irf2bp1 белком CDK5.

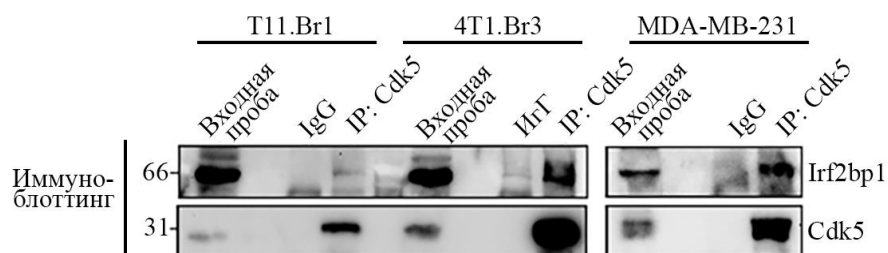


Рисунок 89 – Результаты иммуноблоттинга на белок Irf2bp1 после иммунопреципитации CDK5 из указанных опухолевых клеточных линий

Далее методом анализа прямой киназной активности *in vitro* было выявлено, что очищенный человеческий CDK5 в комплексе с его активатором p25 напрямую фосфорилирует как мышинный, так и человеческий рекомбинантный Irf2bp1 (Рисунок 90). При этом добавление в систему росковитина полностью блокировало фосфорилирование Irf2bp1, подтверждая зависимость от киназной активности CDK5 (Рисунок 90).

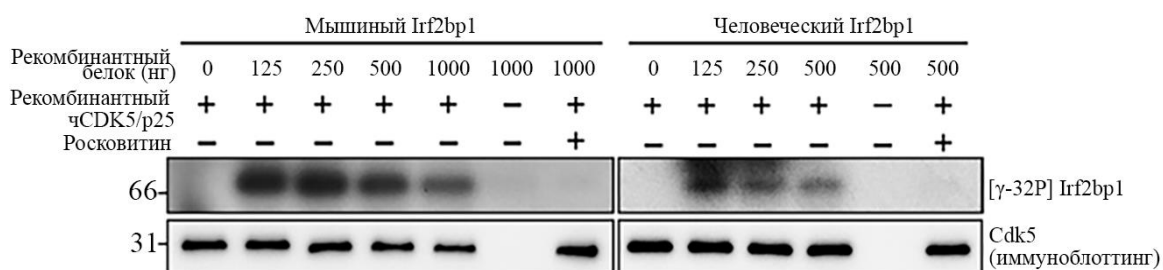


Рисунок 90 – Оценка *in vitro* киназной активности CDK5 в отношении Irf2bp1 с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, где γ -фосфат мечен изотопом фосфора-32, высокоэнергетическим β -излучателем.

Для дальнейшего исследования молекулярного пути CDK5-опосредованного ингибирования МНС-I было проведено мРНК секвенирование клеточных линии EO771.Br3 с нокдауном CDK5. По результатам секвенирования особое внимание уделялось транскрипционным факторам, вовлеченным в регуляцию МНС-I [181]. По результатам анализа было выявлено 2 транскрипционных фактора, STAT1 и NLRC5, шестикратно повышенных в условиях shCDK5 (Рисунок 91).

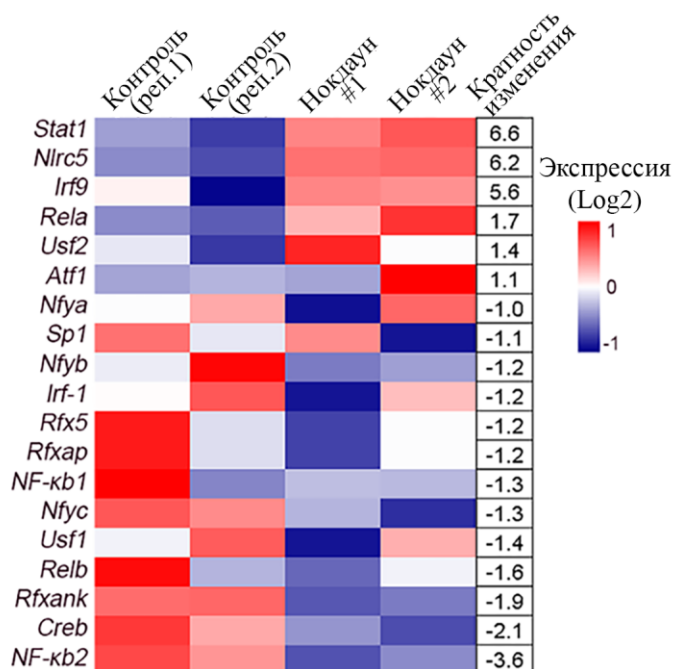


Рисунок 91 – Тепловая карта, отражающая уровень экспрессии транскрипционных факторы, регулирующих МНС-I, по результатам полнотранскриптомного секвенирования клеточной линии EO771.Br3 с нокдауном CDK5 и без такового (контроль)

Результаты секвенирования были подтверждены для STAT1 и NLRC5 иммуноблотингом в трех мышинных клеточных линиях с нокдауном CDK5 (Рисунок 92). Оба транскрипционных фактора были значимо повышены у клеток с shCDK5 (Рисунок 92). При этом анализ фосфорилирования ключевых функционально значимых остатков STAT1 выявил, что нокдаун CDK5 вызывал фосфорилирование по остатку серина S727 но не тирозина Y701 (Рисунок 92).

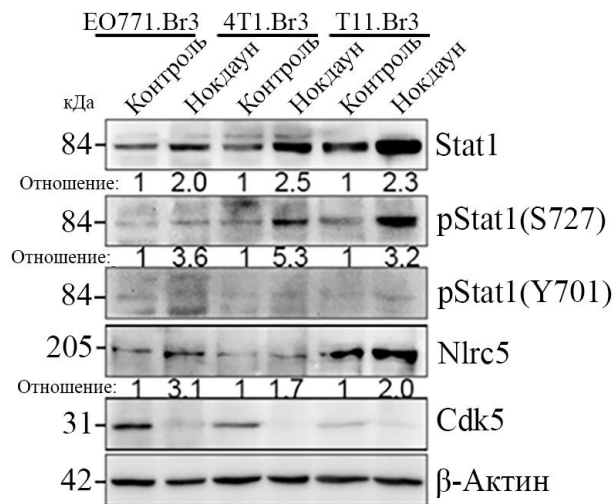


Рисунок 92 – Результаты иммуноблоттинга мышинных опухолевых клеточных линий РМЖ с нокдауном CDK5 и без такового (контроль) на указанные белки.

Примечательно, что в церебральных метастазах мышей зоны опухоли с повышенным уровнем STAT1, фосфорилированного по остатку серина S727, пространственно соответствовали зонам с активной инфильтрацией CD8+ Т-лимфоцитами (Рисунок 93).

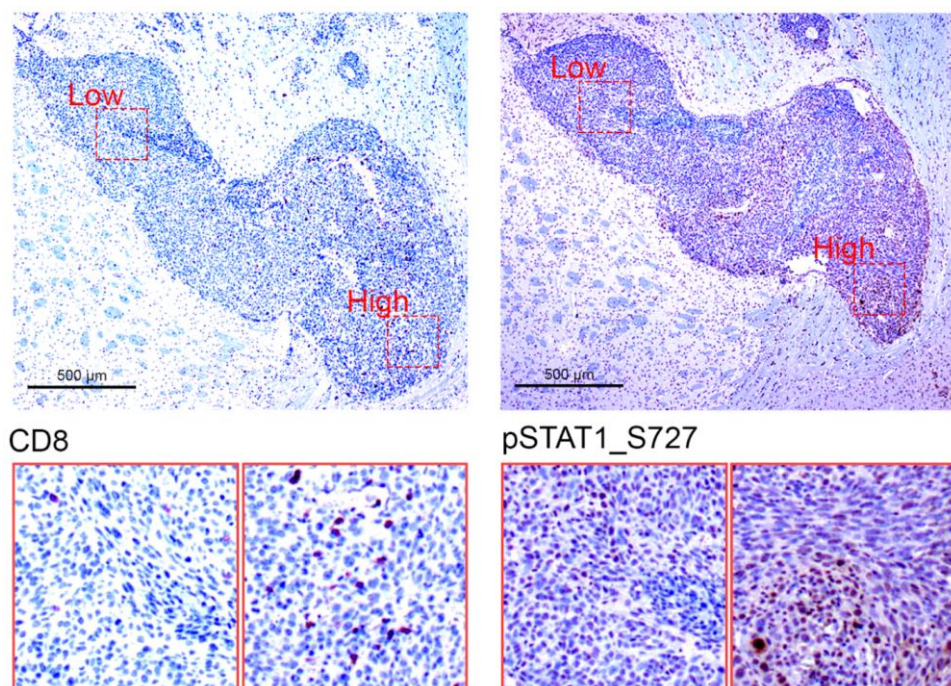


Рисунок 93 – Репрезентативные микрофотографии инфильтрации CD8⁺ Т-клеток в церебральных метастазах мышей с низкими (low) и высокими (high) уровнями STAT1, фосфорилированного по остатку серина S727

Поскольку ранее было установлено, что CDK5 напрямую фосфорилирует иммунорегуляторный белок Irf2bp1, было предположено, что именно Irf2bp1 может ингибировать транскрипционные факторы STAT1 и NLRC5. Для проверки этой гипотезы методом CRISPR были созданы нокауты по гену *Irf2bp1* в двух мышиных линиях РМЖ (Рисунок 94). Было показано, что делеция гена *Irf2bp1* приводила к значимому увеличению белковых уровней NLRC5 и STAT1, в том числе и фосфорилированного по остатку серина S727 (Рисунок 94). Таким образом, был раскрыт молекулярный механизм, связывающий CDK5 и регуляцию МНС-I на поверхности опухолевых клеток.

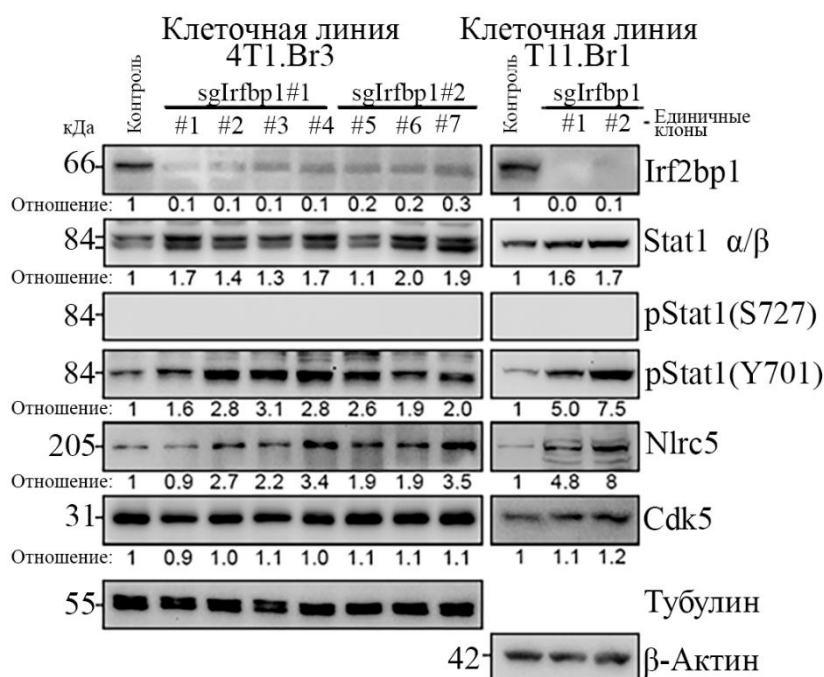


Рисунок 94 – Результаты иммуноблоттинга указанных линий 4T1.Br3 и T11.Br1 с нокаутом Irf2bp1 и без такового (контроль) на указанные белки.

На заключительном этапе исследования были проанализированы возможные причины повышения уровня CDK5 в РМЖ-ММ в сравнении с первичным РМЖ (Рисунок 73). Было проведено сравнение уровней CDK5 в родительских (исходных) клеточных линиях РМЖ и в дочерних клонах, полученных после нескольких раундов *in vivo* селекции в мышиных метастазах головного мозга. И клеточные линии (EO771, MDA-MB-231, HCC1954) и ксенотрансплантаты,

полученные от пациента (WHIM3), показали отсутствие различий в уровнях CDK5 между исходными и метастатическими линиями (Рисунок 95). Эти данные не подтверждали предыдущие наблюдения у пациентов (Рисунок 73). Было предположено, что повышение CDK5 является специфичным для церебральных метастазов и зависит от местного микроокружения головного мозга. Для проверки этой гипотезы уровни CDK5 сравнивали в парных образцах: маммарных опухолях и индуцированных теми же клетками церебральных метастазах (Рисунок 96). Первичные опухоли получали путем введения исходного клона EO771-GFP в молочную жировую прослойку (МЖП), а метастатические – путем инъекции Br3-субклона EO771-GFP во внутреннюю сонную артерию (Рисунок 96). По достижению конечной точки опухолевые клетки из первичных и метастатических очагов извлекали методом клеточного сортирования (используя GFP метку), после чего 50% клеток высевали для культуры *in vitro* в течение 6 суток, а из оставшихся 50% немедленно выделяли белок для анализа уровней CDK5 (Рисунок 96).

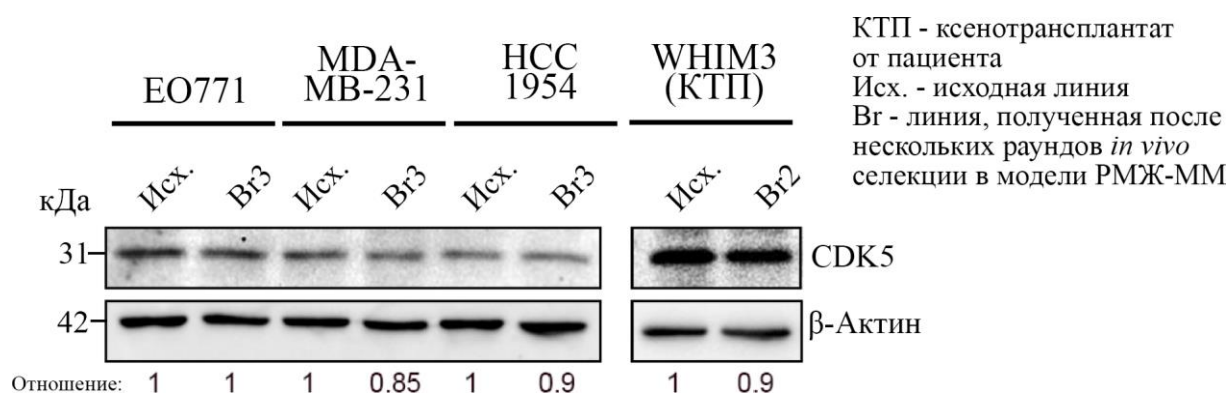


Рисунок 95 – Иммуноблоттинг, отражающий уровень CDK5 в указанных клеточных линиях и ксенотрансплантатах от пациента

В GFP-сортированных злокачественных клетках было выявлено, что CDK5 экспрессируется на более высоком уровне в раковых клетках, изолированных из церебральных метастазов, по сравнению с первичным РМЖ (Рисунок 96). При этом после шестидневного культивирования *ex vivo*, различия в уровнях CDK5 между клетками из первичной опухоли и церебральных метастазов полностью нивелировались (Рисунок 96), что указывает на ключевую роль микроокружения головного мозга в поддержании высокого уровня CDK5.

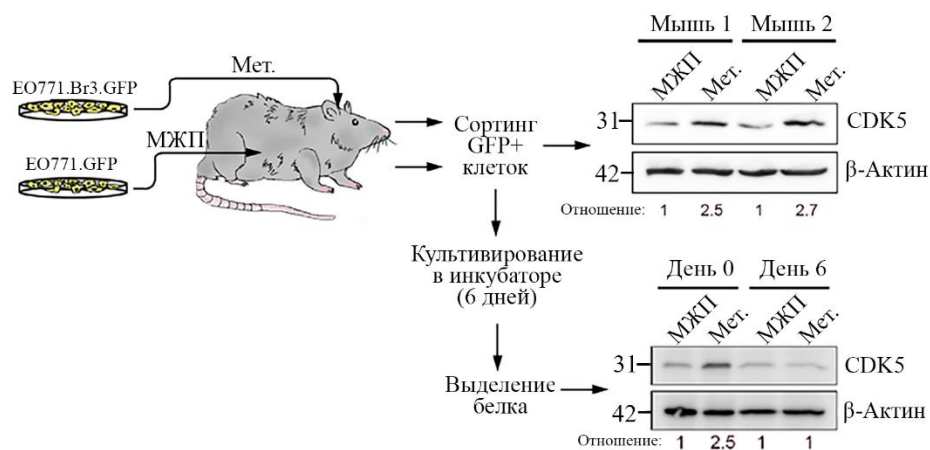


Рисунок 96 – Дизайн эксперимента (слева) и результаты иммуноблоттинга на уровни CDK5 в указанных группах (справа).

В серии дальнейших экспериментов было установлено, что опухоль-ассоциированные астроциты ответственны за высокий уровень CDK5 в РМЖ-ММ. Первичные мышинные астроциты были сокультивированы с клетками EO771 и 4T1 в камере Бойдена, где прямой контакт клеток был исключен. В этих условиях в злокачественных клетках отмечалось повышение CDK5 (Рисунок 97), что свидетельствует о влиянии факторов секретома астроцитов.

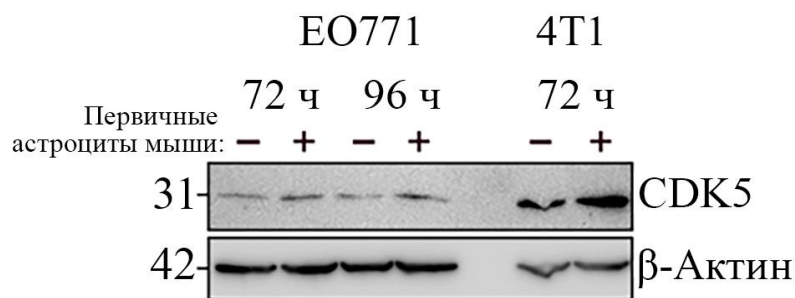


Рисунок 97 – Результаты иммуноблоттинга, отражающие уровень CDK5 в указанных клеточных линиях в присутствии первичных мышинных астроцитов после культивирования в камере Бойдена.

При культивировании клеток EO771 и 4T1 в кондиционированной среде от астроцитов, заранее активированной кондиционированной средой от соответствующих опухолевых клеток, было зафиксировано повышение уровней CDK5 в раковых клетках (Рисунок 98). Данный

результат указывает на то, что под воздействием метастатических клеток формируется проонкогенная, CDK5-индуцирующая популяция астроцитов.

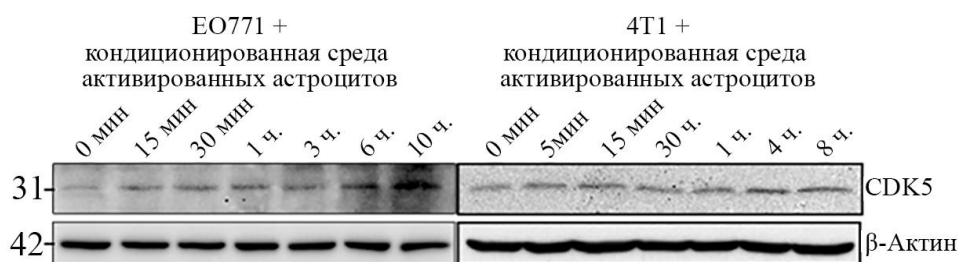


Рисунок 98 – Результаты иммуноблоттинга, отражающие динамику уровня CDK5 в указанных клеточных линиях после добавления кондиционированной среды активированных астроцитов.

Для выявления конкретного фактора, секретируемого «обученными» астроцитами, был применен количественный протеомный анализ их кондиционированной среды. Культуральная среда астроцитов, предварительно экспонированных кондиционированной средой от опухолевых клеток 4T1.Br3, была проанализирована методом безметочной масс-спектрометрии. Среди белков, обогащенных в кондиционированной среде «обученных» астроцитов по сравнению с наивными, был выявлен значительный подъем уровня белка emilin-1, который показал наибольшую кратность изменения (в 2,7 раза в сравнении с контролем) (Рисунок 99).

Белок	Кондиционированная среда				Кратность изменения
	Контрольная		Активированная		
	#1	#2	#1	#2	
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-III	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 99 – Сравнение белкового состава кондиционированной среды наивных астроцитов (контроль) и астроцитов, «обученных» кондиционированной средой от опухолевых клеток 4T1 в течение 72 часов

Для оценки влияния белка emilin-1 на уровень CDK5, в культуры раковых клеточных линий 4T1 и EO771 был добавлен рекомбинантный emilin-1 в дозе от 125 до 500 нг. При обработке клеток этим белком было зарегистрировано дозо- и времязависимое увеличение уровней CDK5 по результатам иммуноблоттинга (Рисунок 100).

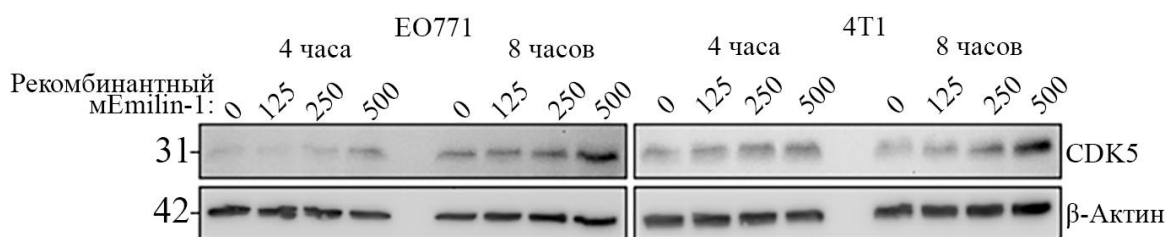


Рисунок 100 – Результаты иммуноблоттинга, отражающие динамику изменения уровня CDK5 в указанных опухолевых клеточных линиях после обработки рекомбинантным белком emilin-1. Дозировки указаны в нг

Таким образом, был обнаружен новый молекулярный механизм ухода опухолевых клеток от иммунного ответа. Гипотетический механизм выглядит следующим образом. Злокачественные клетки церебральных метастазов секретируют факторы, «обучающие» астроциты головного мозга. В ответ обученные астроциты усиливают продукцию и секрецию белка emilin-1, который депонируется в непосредственной близости от опухолевых клеток и индуцирует в них CDK5. В свою очередь CDK5 понижает уровни МНС-I на мембране раковых клеток, что ингибирует CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ (Рисунок 101).

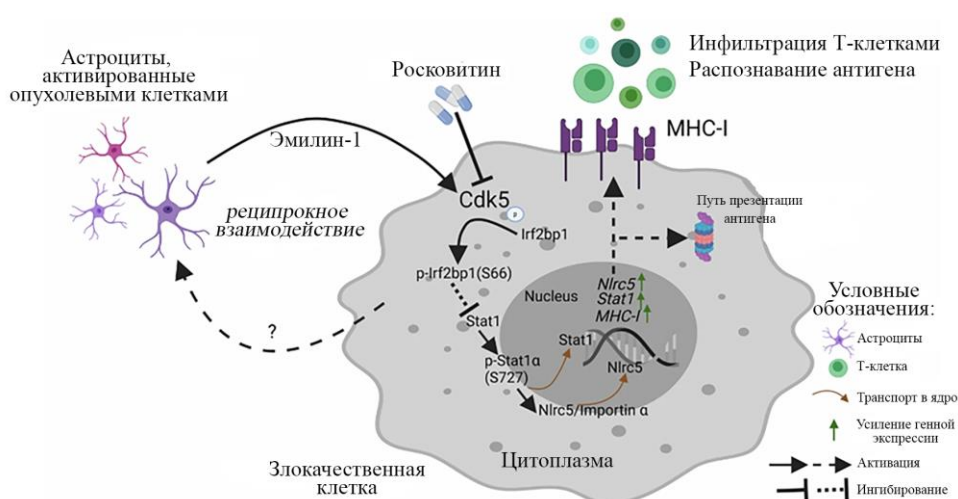


Рисунок 101 – Гипотетический механизм уклонения злокачественных клеток церебральных метастазов от иммунного ответа

Резюме

В данной главе исследовались особенности иммунного ответа в опухолевом микроокружении солидных опухолей. Были досконально изучены ключевые типы иммунных клеток: моноциты/макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, и Т-лимфоциты в моделях как первичных (РМЖ, меланома) так и метастатических (печень, мозг) ЗНО. По итогам главы можно сформулировать следующие выводы:

1. Опухоль-ассоциированные макрофаги секретируют цитокины и хемокины, которые усиливают рост (пролиферация) и развитие (миграция, инвазия) опухоли посредством индукции онкогенных молекулярных путей в злокачественных клетках (например, ERK1/2);
2. Лучевая терапия усиливает инфильтрацию макрофагов в опухоль, при этом они приобретают выраженный иммуносупрессивный (M2-подобный) фенотип. При этом таргетирование данной клеточной популяции нейтрализующими антителами подавляет иммуносупрессию, активирует Т-клеточный ответ и способствует подавлению опухолевого роста;
3. 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 имели лучшие показатели выживаемости в сравнении с больными, не принимавшими эту добавку;
4. Злокачественные клетки церебральных метастазов секретируют факторы, «обучающие» астроциты головного мозга. В ответ такие астроциты усиливают продукцию и секрецию белка emilin-1, который депонируется в непосредственной близости от опухолевых клеток и индуцирует в них белок CDK5. В свою очередь CDK5 понижает уровни МНС-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.

ГЛАВА 5 ОСОБЕННОСТИ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА МИКРОБИОМА ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ: ПОПУЛЯЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

5.1 Изучение микробиома нижних дыхательных путей у больных раком легкого и здоровых субъектов в зависимости от статуса курения

Опухолевый микробиом присутствует практически при всех видах ЗНО, при этом его наиболее доказанное и клинически значимое влияние наблюдается при КРР, ПАПЖ и РЛ [254, 255]. 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 [255]) или статус курения (для микробиоты дыхательных путей [256]). 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 [212].

В заключительной главе диссертационного исследования была дана характеристика таксономическому составу микробиоты в образцах мокроты, полученных от здоровых людей (N=107) и больных РЛ (N=190) в российской популяции в зависимости от статуса курения (Рисунок 102).



Рисунок 102 – Дизайн популяционного исследования

Образцы мокроты характеризуют состояние нижних дыхательных путей (трахея, бронхи, легкие), и могут опосредованно указывать на состав микробиома РЛ [257]. Целью популяционного исследования было установить:

1) Существуют ли различия в содержании отдельных таксономических единиц в мокроте больных РЛ в зависимости от статуса курения;

- 2) Существуют ли различия в сигнатурах микробиома мокроты в исследованной выборке вне зависимости от статуса курения;
- 3) Влияет ли курение на альфа-разнообразие и вызывает ли различия в структуре бактериальных сообществ исследованной выборки;
- 4) Одинаково или разнонаправленно влияет фактор курения на состав бактериальной микробиоты в исследованной выборке;
- 5) Влияет ли длительность и интенсивность курения на состав микробиоты в исследованной выборке.

Каждая группа была дополнительно стратифицирована на некурящих, курящих и бывших курильщиков. После выделения прокариотической ДНК из образцов мокроты был амплифицирован ген 16S рибосомальной РНК (рРНК) и проведено секвенирование следующего поколения.

Секвенирование V3–V4 региона гена 16S рРНК выявило девять бактериальных типов с относительной численностью более 0,1% в образцах мокроты. Преобладающими типами были Firmicutes и Bacteroidetes, составлявшие примерно 70% от общего микробиома. Всего было идентифицировано 43 бактериальных рода с частотой встречаемости не менее 0,1% (Рисунок 103), среди которых наиболее распространенными были *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* и *Anaerostipes*.

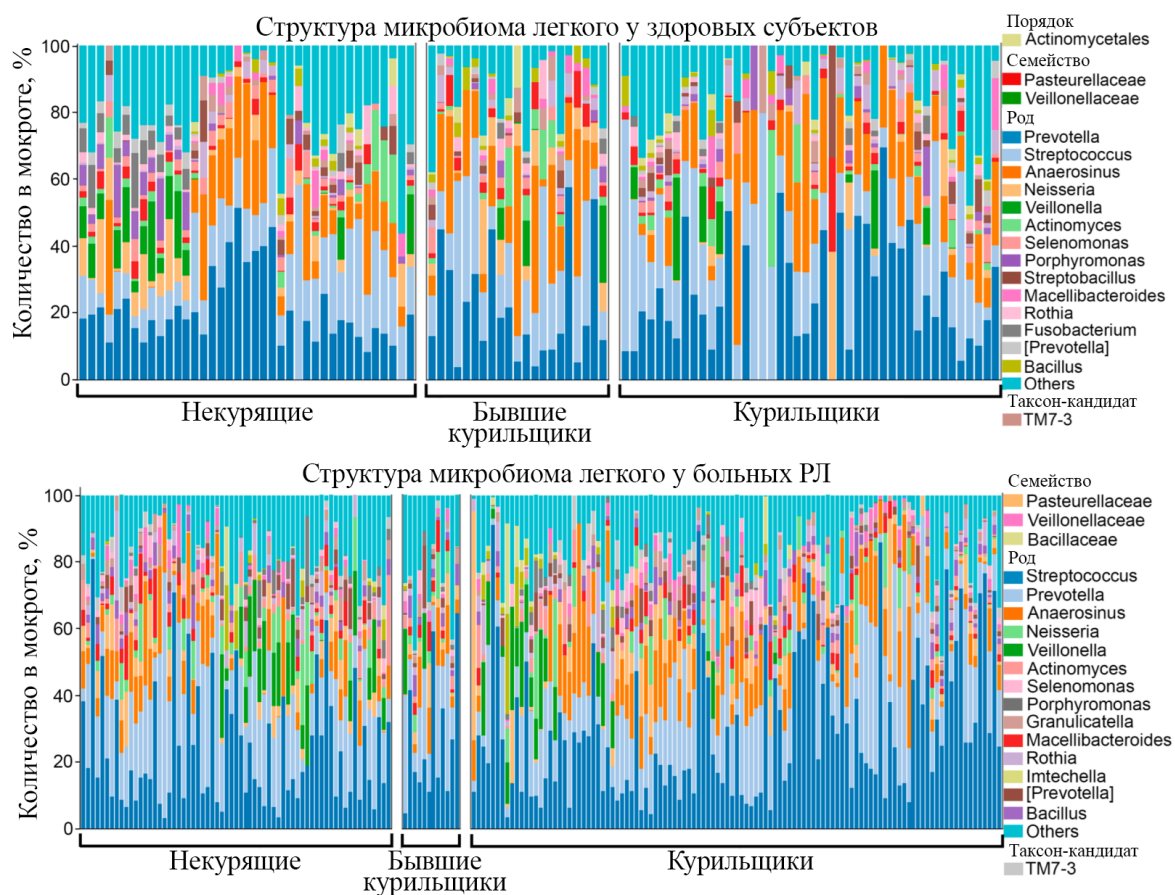


Рисунок 103 – Микробиомные карты, отображающие наиболее распространенные бактериальные семейства и роды, обнаруженные в образцах мокроты здоровых людей (N=107, сверху) и пациентов с РЛ (N=190, снизу) с различным статусом курения

Бактериальный состав не показал значимых различий в альфа-разнообразии у здоровых субъектов, независимо от статуса курения (Рисунок 104). В отличие от здоровых лиц, микробиота мокроты курящих пациентов с РЛ показала сниженное альфа-разнообразие по сравнению как с некурящими пациентами, так и с бывшими курильщиками, что предполагает ослабленную микробную экосистему у субъектов, испытывающих значительный респираторный дистресс (Рисунок 104).

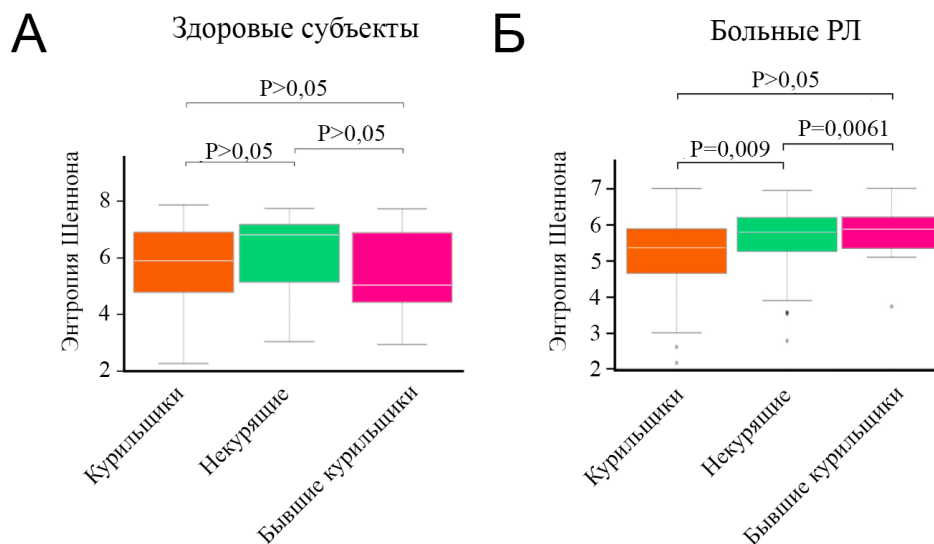


Рисунок 104 – Энтропия Шеннона (альфа-разнообразие) бактериальных сообществ в образцах мокроты здоровых людей (А) и пациентов с РЛ (Б) с различным статусом курения

У здоровых лиц и у пациентов с РЛ не наблюдалось значимых различий в бета-разнообразии в зависимости от статуса курения, что демонстрируется минимальными расстояниями между исследуемыми когортами (Рисунок 105).

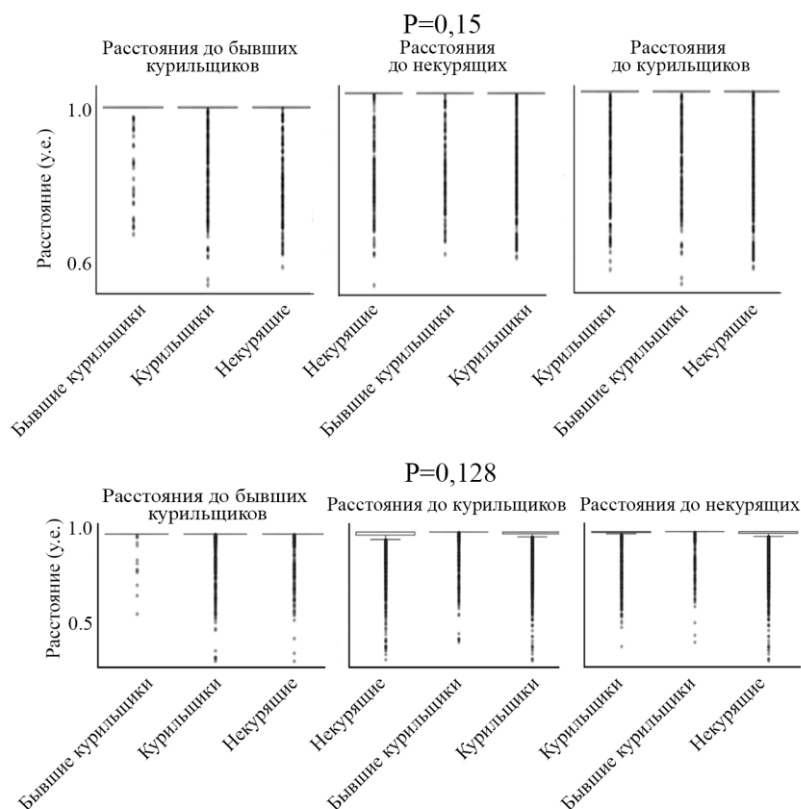


Рисунок 105 – Бета-разнообразие бактериальных сообществ в образцах мокроты здоровых людей и пациентов с РЛ с различным статусом курения

При анализе микробиома легкого здоровых курильщиков и некурящих было выявлено несколько различий. *Streptococcus* (тип Firmicutes) была единственной бактерией, достоверно обогащенной в мокроте здоровых курильщиков по сравнению со здоровыми некурящими (Рисунок 106), что указывает на то, что курение табака создает благоприятную среду для состояний, ассоциированных со *Streptococcus*, таких как бронхит и пневмония. Типы Proteobacteria и Fusobacteria были достоверно снижены в мокроте здоровых курильщиков по сравнению с некурящими (Рисунок 106).

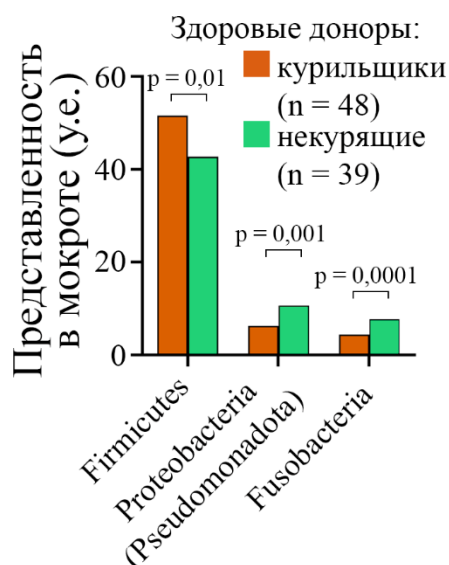


Рисунок 106 – Прокариотические типы, достоверно различавшиеся в микробиоме нижних дыхательных путей у здоровых доноров в зависимости от статуса курения

Микробиом легкого здоровых бывших курильщиков был более схож с таковым у здоровых некурящих, чем у текущих курильщиков. Например, численность *Neisseria* в мокроте бывших курильщиков составила 5,39%, что аналогично показателю у здоровых некурящих (4,49%) и достоверно выше, чем у текущих курильщиков (Рисунок 107). По сравнению со здоровыми некурящими и здоровыми бывшими курильщиками, у которых наблюдалась высокая численность *Neisseria*, здоровые курильщики демонстрировали очень низкую численность этой бактерии (Рисунок 107). Эти данные указывают на то, что некоторые автохтонные популяции микробиома легких чувствительны к воздействию табачного дыма, но могут восстанавливаться со временем после прекращения курения. Прокариотический состав мокроты пациентов с РЛ был схож между курильщиками и некурящими, за несколькими исключениями. *Neisseria* была достоверно менее распространенной у курильщиков по сравнению с некурящими (Рисунок 107), аналогично наблюдениям у здоровых лиц.

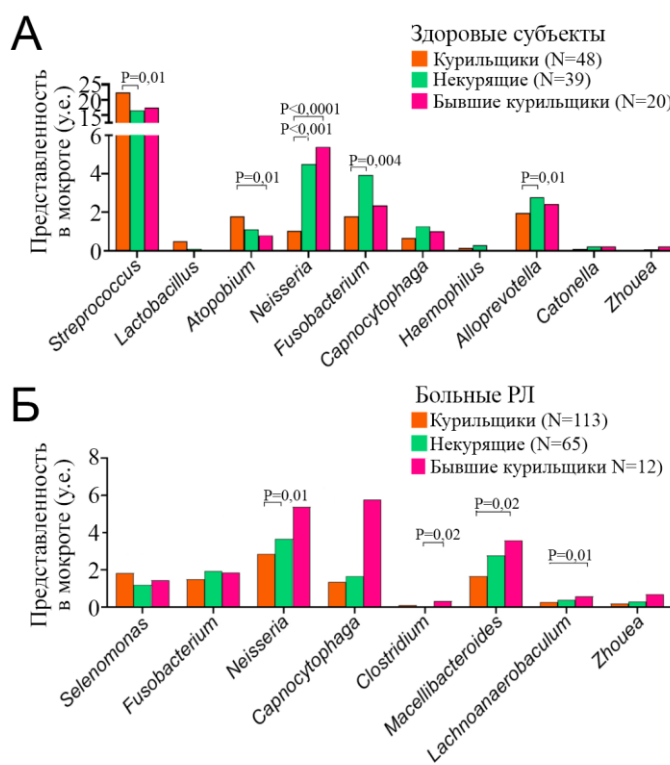


Рисунок 107 – Ключевые бактериальные роды, различающиеся среди здоровых субъектов (А) и больных РЛ (Б)

Вышеупомянутое снижение *Neisseria* наблюдалось как у пациентов с аденокарциномой, так и у пациентов с плоскоклеточной карциномой. Более того, различия в *Neisseria* в основном затрагивали курильщиков на поздних стадиях (III–IV) РЛ по сравнению с некурящими пациентами (таблица 12).

Таблица 12 – Представленность рода *Neisseria* у больных РЛ по результатам секвенирования

РЛ стадии I-II		P
Курильщики, N=51	Некурящие, N=29	
2,69	3,67	0,15
РЛ стадии III-IV		P
Курильщики, N=59	Некурящие, N=33	
2,86	4,24	0,02

Микробиом нижних дыхательных путей пациентов с РЛ, бросивших курить (N=12), в целом не показывал существенных отличий от такового у курильщиков или некурящих. Заметными исключениями были увеличение родов *Macellibacteroides* и *Lachnoanaerobaculum* в

мокроте бывших курильщиков по сравнению с курящими пациентами с РЛ (Рисунок 107). Эти результаты позволяют предположить, что РЛ оказывает несоизмеримо большее влияние на состав микробиоты нижних дыхательных путей, чем курение само по себе, и что отказ от курения при РЛ может быть недостаточным для восстановления разнообразия микробиома до исходного уровня.

Далее было проведено сравнение респираторной микробиоты у пациентов с РЛ и здоровых субъектов без учета статуса курения. Альфа-разнообразие прокариотических сообществ не различалось между пациентами с РЛ и здоровыми донорами (Рисунок 108 А). Напротив, индекс выравненности Пielу (Рисунок 108 Б) был достоверно выше у здоровых лиц по сравнению с онкологическими пациентами, что позволяет предположить, что нормальный микробиом легкого представляет собой сбалансированную экосистему без чрезмерного доминирования какого-либо одного вида. Кроме того, анализ бета-разнообразия выявил значимые композиционные различия в респираторном микробиоме между пациентами с РЛ и здоровыми донорами (Рисунок 108 В). Таким образом, РЛ ассоциирован с конкретными структурами микробных сообществ, потенциально отражая опухоль-опосредованные экологические нарушения или специфичные для опухолевого микроокружения взаимодействия хозяина и микробиома.

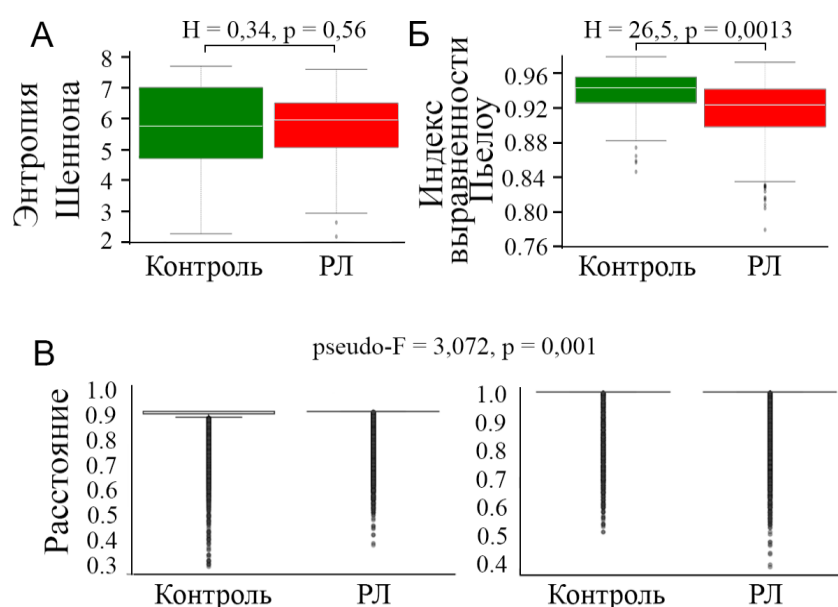


Рисунок 108 – Оценка разнообразия бактериальных сообществ в исследуемых группах без учета статуса курения. А) Энтропия Шеннона. Б) Индекс выравненности Пielу. В) Бета-разнообразие

Численность бактерий, принадлежащих к доминирующим типам (Firmicutes, Bacteroidetes и Proteobacteria), достоверно не отличалась между пациентами с РЛ и здоровыми субъектами. При этом менее распространенные филумы Actinobacteria, Fusobacteria, TM7, Spirochaetes, и SR1 были достоверно снижены в микробиоме мокроты онкологических пациентов по сравнению со здоровыми лицами (Рисунок 109).

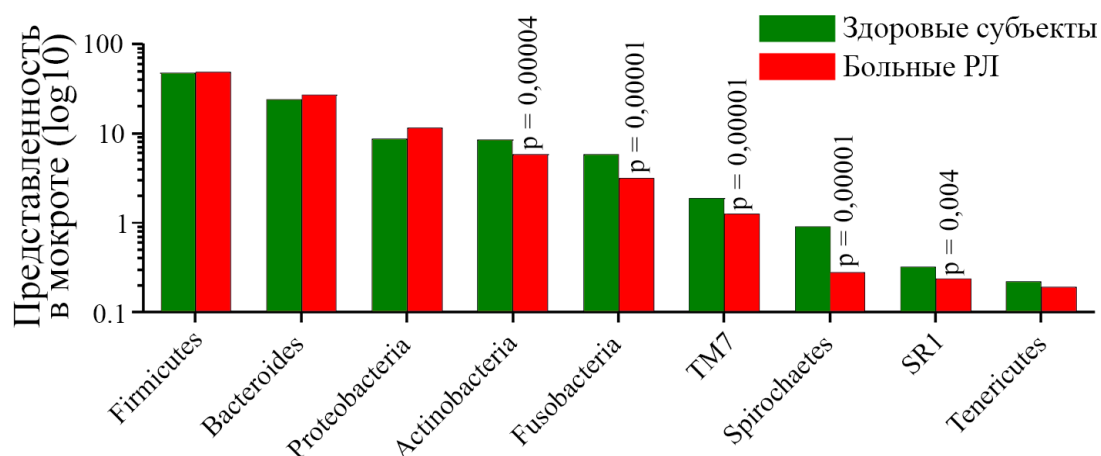


Рисунок 109 – Анализ распространенности бактериальных типов в мокроте исследуемых групп.

Для углубленного изучения изменений микробиома, ассоциированных с РЛ независимо от статуса курения был использован метод LEfSe. Путем интеграции проверки статистической значимости с оценкой размера эффекта, данный подход выявил значимое обогащение специфичных прокариотических таксонов в нижних дыхательных путях пациентов с РЛ по сравнению со здоровыми субъектами (Рисунок 110, Рисунок 111), включая представителей типа Proteobacteria; классов Bacilli, Gammaproteobacteria и Flavobacteriia; отрядов Lactobacillales, Pasteurellales, Bacillales и других (Рисунок 110).

Напротив, в мокроте здоровых лиц доминировали представители менее распространенных бактериальных таксонов, включая Clostridia, Coriobacteria, Alphaproteobacteria и другие (Рисунок 110). В совокупности эти данные подчеркивают существенную трансформацию микробиома легких при РЛ независимо от воздействия табака.

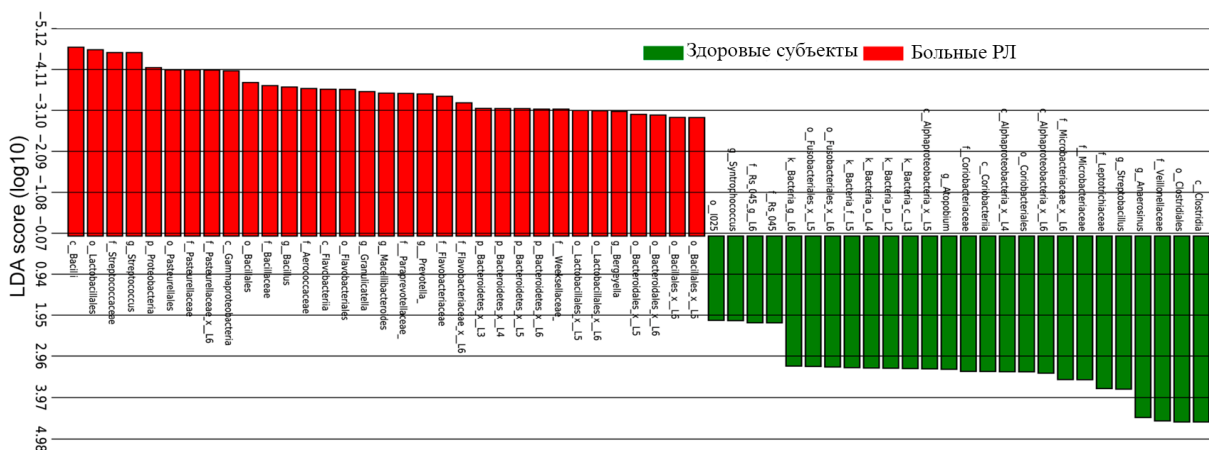


Рисунок 110 – LEfSe анализ различий состава микробиома нижних дыхательных путей у здоровых доноров (N=107) и пациентов с РЛ (N=190), независимо от статуса курения

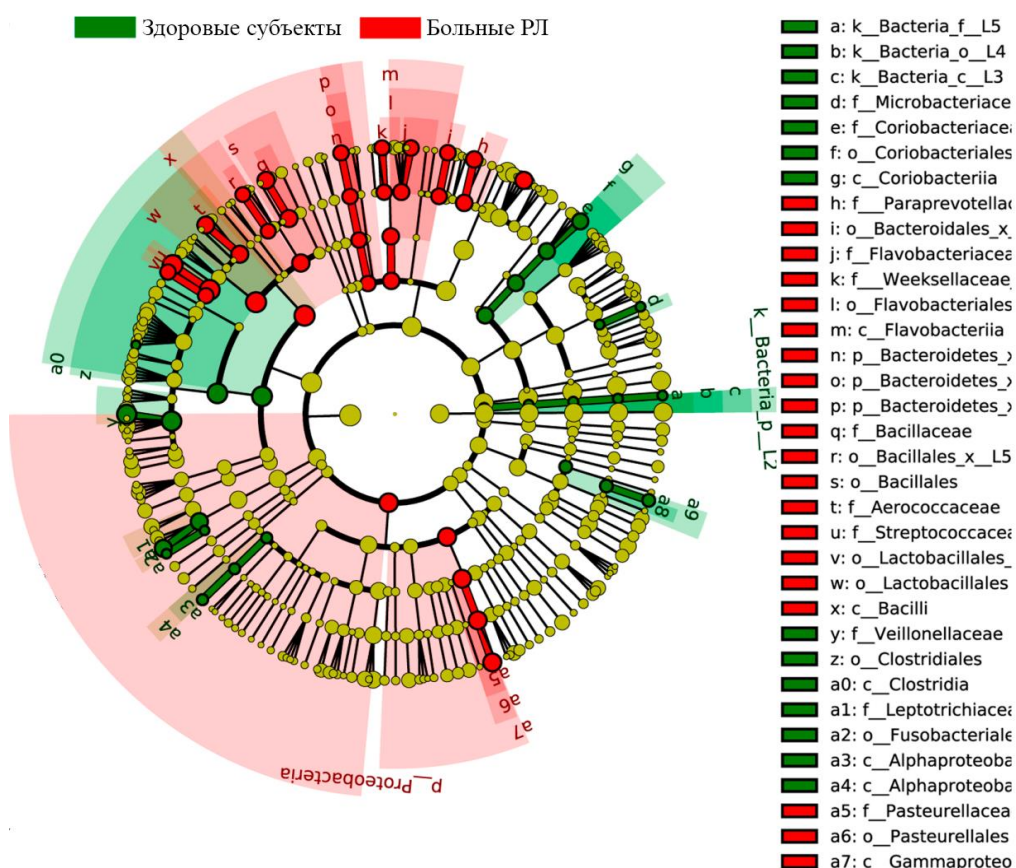


Рисунок 111 – Кладограмма, показывающая эволюционные взаимоотношения между различными бактериальными популяциями в микробиоме нижних дыхательных путей здоровых доноров (N=107) и пациентов с РЛ (N=190), независимо от статуса курения

На следующем этапе было оценено, как воздействие табака формирует микробиоту нижних дыхательных путей у здоровых лиц и больных с РЛ. Не было обнаружено достоверных различий в альфа-разнообразии между курящими пациентами с РЛ и здоровыми курильщиками

(Рисунок 112 А), что указывает на сопоставимое общее микробное разнообразие в пределах индивидуальных респираторных ниш. Однако анализ бета-разнообразия выявил выраженные композиционные различия между исследуемыми группами (Рисунок 112 Б), позволяя предположить, что РЛ ассоциирован со структурной реорганизацией микробиома, а не с изменениями общего разнообразия. Анализ LEfSe выявил основные различия в составе микробиома нижних дыхательных путей курящих пациентов с РЛ по сравнению со здоровыми курильщиками. В частности, нижние дыхательные пути курильщиков с РЛ были обогащены бактериями, принадлежащими к классам Flavobacteriia, Gammaproteobacteria и Bacilli; отрядам Flavobacteriales, Pasteurellales, Bacillales, Lactobacillales и другим. В противоположность этому, у здоровых курильщиков наблюдалось преобладание прокариот из классов Alphaproteobacteria и Coriobacteria; отрядов Clostridiales, Coriobacteriales, Fusobacteriales и других (Рисунок 112 В).

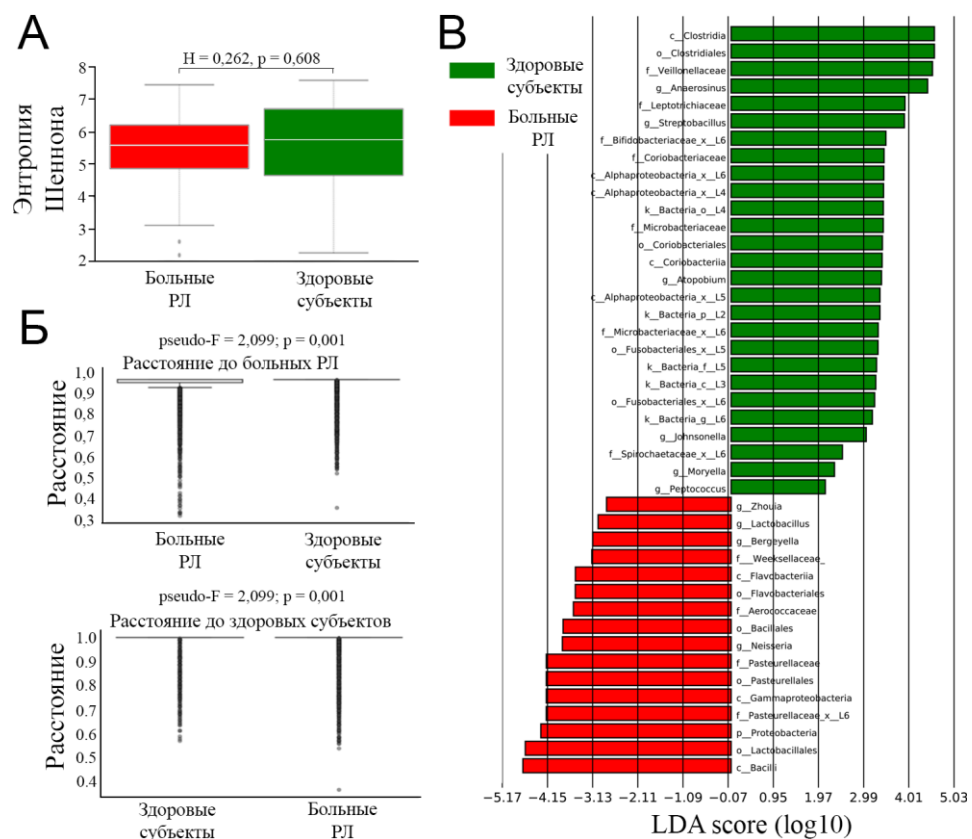


Рисунок 112 – Анализ микробиомного состава у курящих здоровых субъектов и курящих больных РЛ методом LEfSe. А) Энтропия Шеннона. Б) Бета-разнообразие. В) LEfSe анализ

Исследование микробиома бывших курильщиков с РЛ и здоровых бывших курильщиков не выявлено различий альфа- (Рисунок 113 А) и бета-разнообразия (Рисунок 113 Б). Анализ методом LEfSe обнаружил значительное увеличение численности бактерий типа Bacteroidetes, класса Flavobacteriia, порядков Flavobacteriales и Lactobacillales, семейств Bacillaceae,

Flavobacteriaceae, Clostridiales, Leptotrichiaceae в дыхательных путях пациентов с РЛ, в то время как микробиом здоровых бывших курильщиков был обогащен семейством Veillonellaceae и родом *Anaerosinus* (Рисунок 113 В).

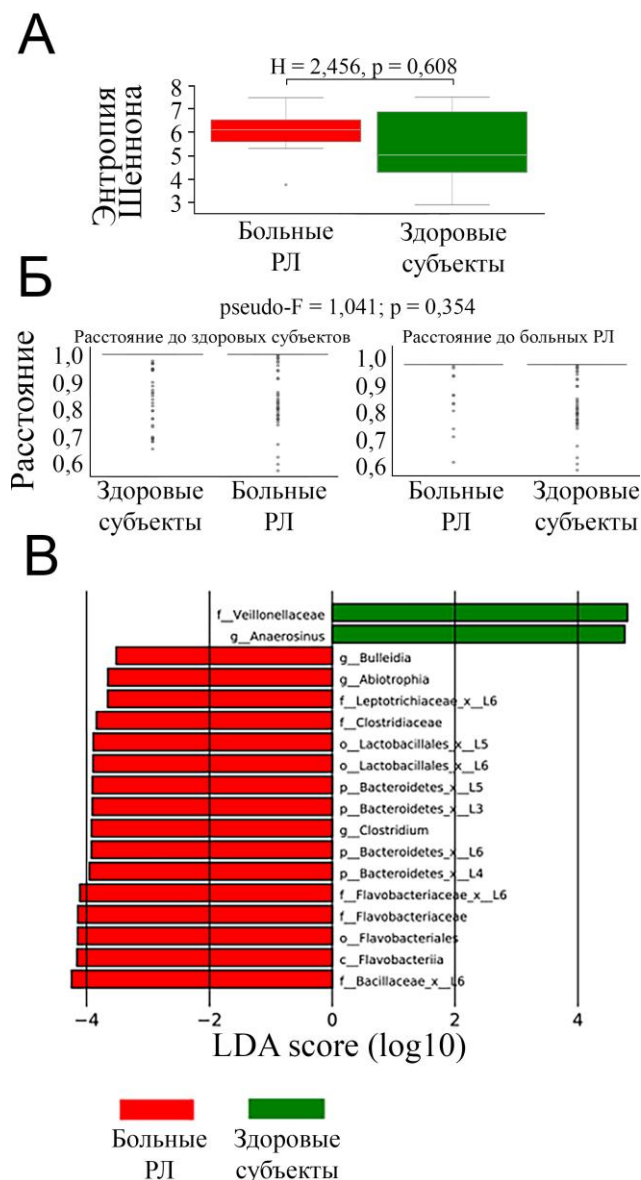


Рисунок 113 – Анализ микробиомного состава у здоровых бывших курильщиков и бывших курильщиков с РЛ методом LEfSe. А) Энтропия Шеннона. Б) Бета-разнообразие. В) LEfSe анализ

При анализе корреляции между кумулятивным стажем курения (пачка-лет) и численностью микробиома дыхательных путей методом ранговой корреляции Спирмена у пациентов с РЛ выявлена лишь одна значимая положительная корреляция, связь между интенсивностью курения и повышенной численностью рода *Selenomonas* (Рисунок 114). При этом микробиом здоровых курильщиков демонстрировал исключительно отрицательные

корреляции: повышенный стаж курения ассоциировался со снижением представленности *Campylobacter*, *Lachnoanaerobaculum* и *Peptostreptococcus* (Рисунок 114). Противоположные закономерности в группах онкобольных и здоровых указывают на дифференциальный ответ определенных бактериальных таксонов на курение при наличии опухоли, отражая измененный иммунный ландшафт, микроокружение ЗНО или опухоль-опосредованные изменения в селективном давлении на микробное сообщество.

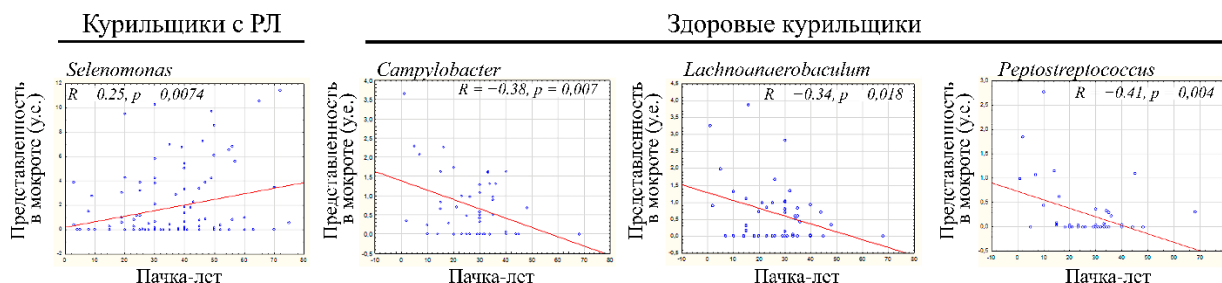


Рисунок 114 – Корреляционный анализ Спирмена между интенсивностью курения и представленностью некоторых родов бактерий, в нижних дыхательных путях исследуемых лиц

Суммируя результаты, полученные в этом разделе, была построена карта прокариотических сигнатур нижних дыхательных путей здоровых лиц и больных РЛ в зависимости от статуса курения (Рисунок 115).

Дополнительно была проанализирована связь микробиома нижних дыхательных путей с соматическими повреждениями хромосом у больных РЛ [258]. Присутствие некоторых бактериальных родов и типов в мокроте больных РЛ прямо коррелирует с высокой частотой хромосомных aberrаций и микроядер в соматических клетках, что может указывать на генотоксические свойства и допускает их канцерогенный потенциал [258]. Наконец, был проведен спаренный анализ микробиоты стула и мокроты у пациентов с КРР, который выявил наличие определенных прокариотических сигнатур, связанных с развитием КРР [259].

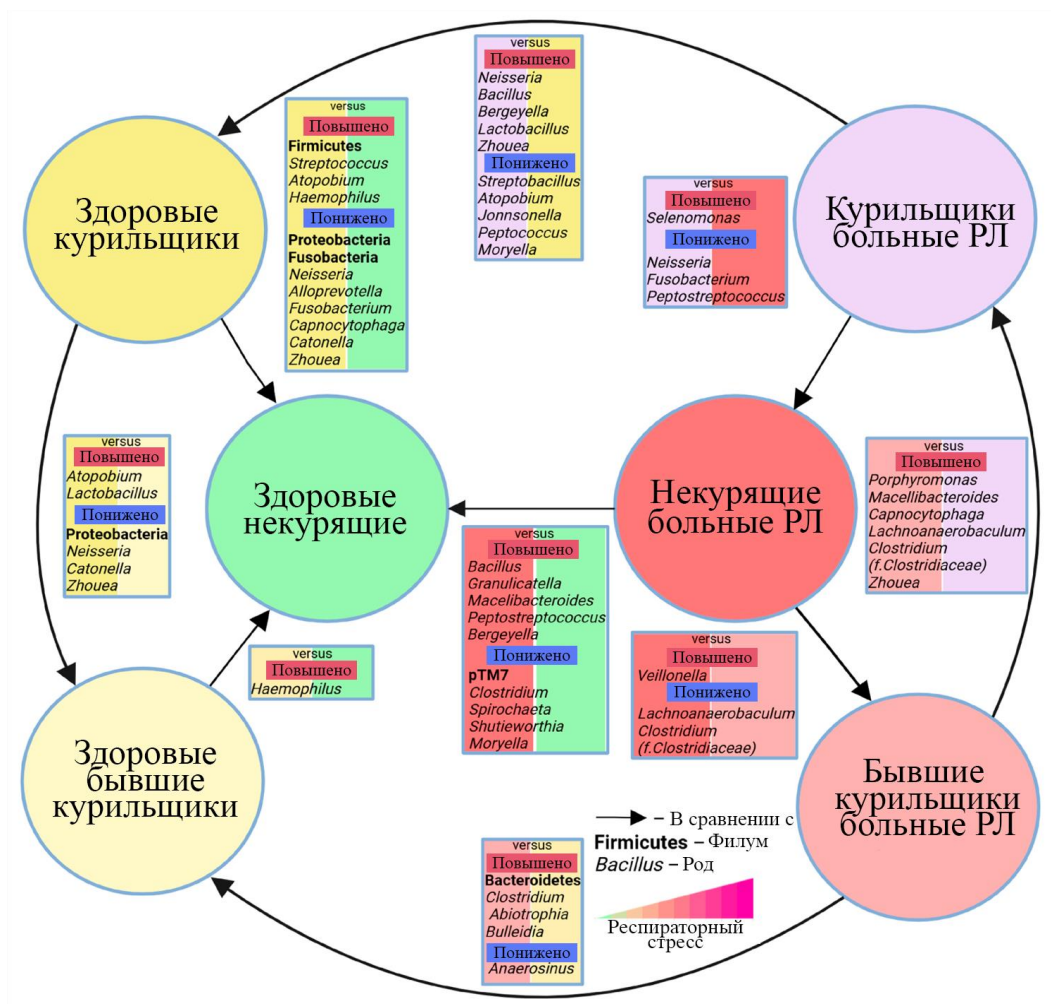


Рисунок 115 – Микробиомные сигнатуры нижних дыхательных путей у здоровых субъектов и больных РЛ в зависимости от статуса курения

Резюме

В данной главе исследовались особенности опухолевого микробиома больных РЛ, исследованного на основании образцов мокроты. По итогам главы можно сформулировать следующие выводы:

- 1) Качественный и количественный состав микробиома опухолевого микроокружения при РЛ отличается от такового у здоровых субъектов. Определены микробиомные сигнатуры РЛ и нормальной микрофлоры легкого;
- 2) Курение оказывает выраженное влияние на микробиомный состав здоровых лиц, снижая разнообразие бактериальных сообществ;
- 3) В отличие от здоровых лиц, микробиота мокроты курящих пациентов с РЛ имеет сниженное альфа-разнообразие по сравнению как с некурящими пациентами, так и с бывшими курильщиками, что предполагает ослабленную микробную экосистему у субъектов, испытывающих респираторный дистресс;

- 4) РЛ оказывает несоизмеримо большее влияние на состав микробиоты нижних дыхательных путей, чем курение само по себе, и что отказ от курения при РЛ может быть недостаточным для восстановления разнообразия микробиома до исходного уровня.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опухолевое микроокружение представляет собой сложную систему, в которой тесно переплетены между собой несколько компонентов: а) опухолевые клетки, б) нормальные неиммунные клетки–резиденты пораженного органа (эндотелиальные клетки, астроциты), в) нормальные иммунные клетки, которые могут быть как резидентами (клетки Купфера, микроглия) так и нерезидентами (моноциты/макрофаги, Т-клетки), г) белковые структурные компоненты ВКМ (например, коллагены, протеогликаны), д) небелковые структурные компоненты ВКМ (например, гиалуроновая кислота), и е) микробные сообщества.

В настоящем диссертационном исследовании была предпринята попытка раскрыть молекулярные и иммунологические аспекты влияния опухолевого микроокружения на рост и развитие первичных и метастатических опухолей. Стоит отметить, что из-за широты поставленной задачи проведенное исследование может показаться несколько фрагментированным. Однако в действительности оно разделено на три логических компонента: i) исследования ВКМ опухоли (глава 3), ii) исследования иммунного опухолевого микроокружения, включая все основные типы иммунных клеток (глава 4), и iii) исследования микробиома опухоли на основе данных, полученных из мокроты больных с РЛ (глава 5). Разнообразие нозологий, локализаций и модельных систем является серьезным ограничением данной работы, однако автор попытался провести максимально глубокое и концептуально новое исследование для разработки новых методов лечения и приблизить победу над этой группой заболеваний.

В разделах 3.1 и 3.2 проводился анализ ВКМ солидных опухолей и его ремоделирования под воздействием лучевой терапии. В частности, был исследован ВКМ печеночных метастазов клеточной линии MC38 в сравнении с интактной печенью без патологий. Для достижения этой цели был применен подход на основе масс-спектрометрии. Однако выделение и очистка ВКМ сопряжены с рядом трудностей. Во-первых, белки матрикса характеризуются высокой молекулярной массой, что существенно затрудняет их денатурацию и солюбилизацию. Во-вторых, лизис клеток при экстракции ВКМ приводит к высвобождению внутриклеточных компонентов во внеклеточное пространство, вызывая контаминацию нуклеиновыми кислотами и белками с высоким сродством к некоторым компонентам матрикса. В-третьих, длительные и трудоемкие протоколы экстракции способствуют вымыванию и потере белков ВКМ, искажая результаты анализа. Все указанные проблемы были преодолены в нашей оптимизированной схеме, включающей мягкую обработку детергентами с последующим щадящим биохимическим обогащением.

В настоящем исследовании было идентифицировано несколько дифференциально экспрессируемых белков между печеночными метастазами MC38 и нормальной тканью печени мыши (раздел 3.1) Значимо сниженные белки ВКМ, вероятно, представляют компоненты ВКМ специфичные для тканей печени, однако наибольший интерес вызывают сверхэкспрессируемые белки, некоторые из которых ранее ассоциированы с развитием и прогрессией колоректального рака, включая версикан, остеонектин, галектины и белки семейства S100 [260–262].

Последующий анализ (раздел 3.2) выявил значительную перестройку ВКМ при облучении подкожной модели КРР. Количество идентифицированных белков ВКМ увеличилось с 45 в контроле до 87 после облучения, при этом 11 из 12 наиболее повышенных белков относились к структурным компонентам матрикса. Это указывает на то, что основной вклад в радиационно–индуцированные изменения ВКМ вносили именно структурные элементы, тогда как доля регуляторных белков в ответе была минимальной. Иными словами, воздействие гамма–облучения преимущественно изменяет архитектурные свойства ВКМ, а не его регуляторные или модифицирующие компоненты. Наибольший вклад в изменение ВКМ наблюдался среди гликопротеинов, где 78% проанализированных белков данной категории повысили свой уровень экспрессии после облучения, в сравнении с контрольной группой.

Обнаруженные в результате анализа дифференциально представленные белки в опухолевой ткани после радиационного воздействия играют важную роль в патогенезе КРР. Так, фибриллин-1 (FBN1), показавший наиболее значительное увеличение экспрессии (в 632 раза), является ключевым гликопротеином, участвующим в формировании микрофибрилл и подавлении активности TGF- β сигналинга [263]. Пониженная экспрессия FBN1 была связана с благоприятным прогнозом у онкобольных [264]. Обнаруженная сверхпредставленность белка ФБН1, вероятно, представляет собой компенсаторный ответ на радиационное повреждение, направленный на контроль над TGF- β и восстановление ВКМ, что согласуется с его широко известной ролью в фиброзном ответе на повреждение в разных органах [265].

Поскольку ключевым драйвером депонирования и ремоделирования ВКМ в солидных опухолях выступают опухоль-ассоциированные фибробласты, на следующем этапе (раздел 3.3) была предпринята попытка таргетировать молекулярные пути, активируемые в этих стромальных клетках. Было установлено, что двойное нацеливание на ключевые пути в клетках ПАПЖ (YAP1) и фибробластах (COX-2) усилило терапевтический ответ на гемцитабин. Предложенный подход имеет принципиально иной механизм действия по сравнению с недавними данными об улучшении химиотерапевтического ответа при двойном ингибировании YAP1/COX-2 в клетках КРР и рака мочевого пузыря [266, 267]. В клетках КРР или рака мочевого пузыря сверхэкспрессия YAP1 индуцирует активацию COX-2 внутри самих раковых клеток,

запуская механизмы резистентности, которые блокируются таргетированием YAP1/COX-2 исключительно в опухолевых клетках. В ПАПЖ же стресс активирует сигнальные пути YAP1 и COX-2 через взаимодействие раковых клеток с фибробластами, что требует комбинированного ингибирования YAP1 в раковых клетках и COX-2 в фибробластах для достижения эффекта. Кроме того, стресс-индуцированная ось YAP1/COX-2 представляет адаптивный ответ, поскольку двойное ингибирование YAP1/COX-2 без гемцитабина не влияло на выживаемость при ПАПЖ (Рисунок 17). Ингибирование исключительно YAP1 или COX-2 также не сенсibilizировало ПАПЖ к гемцитабину, что может указывать на тот факт, что нацеливание исключительно на опухолевые клетки или фибробласты недостаточен для достижения эффекта. Это частично объясняет неудачи предыдущих КИ, ориентированных только на раковые клетки или строму. Таким образом, комбинированное нацеливание на симбиотическую связь между раковыми клетками и фибробластами может обеспечить устойчивую противоопухолевую эффективность при поздних стадиях ПАПЖ и других агрессивных ЗНО. После подтверждения эффективности в проспективных испытаниях данная терапевтическая стратегия может быть внедрена для лечения ПАПЖ. Учитывая хорошую переносимость в доклинических моделях, высокую биодоступность, и низкую токсичность ингибиторов YAP и COX-2 (например, PRIX или Цел), можно предположить, что подобный подход может быть полезен онкобольным с высокой токсичностью при ИИКТ, аутоиммунными реакциями, или не отвечающим на стандартные схемы лечения, такие как наб-паклитаксел+гемцитабин и FOLFIRINOX [268].

В исследовании была предпринята попытка выявить механизм, посредством которого комбинированное нацеливание на YAP и COX-2 разрушает симбиотическую связь между клетками ПАПЖ и стромой, тем самым усиливая ответ на гемцитабин. Для этого изучали динамику взаимодействия опухолевых клеток ПАПЖ с клетками местного микроокружения. Секвенирование РНК единичных клеток выявило глобальное влияние комбинированной терапии на строму и иммунное микроокружение. Было экспериментально показано снижение числа фибробластов и достоверные изменения в количестве Т-клеточных популяций. Роль этих изменений в эффективности терапии требует дальнейшего исследования. Также было выявлено уменьшение популяций воспалительных и миофибробластных фибробластов при комбинированной терапии по сравнению с монотерапией гемцитабином (Рисунок 21). Это может быть обусловлено ингибированием YAP1, поскольку специфический нокаут YAP1 в поджелудочной железе мышей линии КРС достоверно снижал число α SMA+-фибробластов (маркер миофибробластных фибробластов) при ПАПЖ [269]. Более глубокое понимание механизмов нарушения взаимодействия между раковыми клетками и фибробластами повысит клинический потенциал стратегии.

Учитывая проанализированную роль фибробластов в ремоделировании ВКМ, на следующем этапе исследования (раздел 3.4) была проведена оценка вклада самих злокачественных клеток в ВКМ микроокружения. Первым значимым результатом стало обнаружение экспрессии цепей ламинина сосудистой базальной мембраны клетками КРР. В экспериментальных метастазах были идентифицированы транскрипты человеческих генов *LAMA5*, *LAMB1* и *LAMC1*, что было подтверждалось иммуногистохимическим анализом, который показал экспрессию белка *LAMA5* человека в данных опухолях. Кроме того, экспрессия *LAMA5* в печеночных метастазах коррелировала с повышенной плотностью сосудов, что устанавливает связь между экспрессией этих цепей ламинина и ангиогенезом. Поскольку клетки кишечного эпителия в норме не экспрессируют ламинины сосудистой базальной мембраны, полученные данные указывают на специфическую продукцию этих цепей как на механизм, посредством которого клетки КРР стимулируют ангиогенез. Хотя полученные данные не исключают возможность дополнительного вклада ламинина 511 со стороны эндотелиальных, периваскулярных клеток или фибробластов, выраженное влияние на морфологию и функцию сосудов при ингибировании экспрессии *LAMA5* именно в клетках КРР свидетельствует о критической важности отложения ламинина 511, продуцируемого самой опухолевой клеткой, для ангиогенеза. Опухолевая сосудистая сеть обычно характеризуется избыточным ветвлением, извитостью и неспособностью обеспечить адекватное оксигенирование микроокружения [270], что может способствовать прогрессии заболевания. Действительно, в ряде случаев гипоксия, возникающая вследствие неэффективной васкуляризации, стимулирует инвазию опухолевых клеток [271]. В исследовании было показано, что нокдаун гена *LAMA5* в клетках КРР приводил к замедлению роста метастазов печени. Необходимы дальнейшие исследования для определения клинических условий, в которых модуляция экспрессии опухолевого ламинина может принести терапевтическую пользу. Также важно убедиться, что ингибирование *LAMA5* не приведет к развитию терапевтической резистентности, как это происходит при ингибировании ФЭРС в контексте метастазов в печень [272].

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 [273]. Вместе с тем, пониженные уровни *LAMA5* наблюдались у пациентов с раком молочной железы, аденокарциномой легкого и раком простаты [273]. Кроме того, высокая экспрессия *LAMA5* имела положительную корреляцию с маркерами активации Т-клеток, так же как и маркерами презентации антигена [273].

Для исследования стимулов, вызывающих экспрессию *LAMA5* в клетках КРР, была проанализирована роль инфильтрирующих иммунных клеток, поскольку ранее они были идентифицированы как триггеры ангиогенеза в печеночных метастазах КРР [233], а также являются ключевыми регуляторами отложения опухолевого ВКМ [274]. Было выявлено обогащение различных миелоидных клеток в опухолях с высоким уровнем экспрессии ламинина 511, в то время как сигнатуры адаптивных иммунных клеток не увеличивались. Опухоли, инфильтрированные миелоидными клетками, как правило имеют неблагоприятный прогноз [275]. Кондиционированная среда миелоидных клеток, выделенных из микроокружения печеночных метастазов, содержащая широкий спектр воспалительных цитокинов, стимулировала экспрессию гена *LAMA5* в клетках КРР. Особый интерес представлял TNF, поскольку он способен индуцировать экспрессию *LAMA5* в клетках крипт кишечника человека [276]. TNF также играет роль в формировании печеночных метастазов, поскольку блокада TNF снижала рост метастазов как при КРР, так и при ПАПЖ [277, 278]. Рост метастазов зависит от ангиогенеза, что служит дополнительным подтверждением полученных результатов. В проведенных экспериментах эффект кондиционированной среды миелоидных клеток на экспрессию *LAMA5* в клетках КРР был воспроизведен с использованием рекомбинантного TNF. Однако остается открытым вопрос, могут ли другие факторы, продуцируемые опухолевыми миелоидными клетками, аналогично стимулировать экспрессию *LAMA5*. Полученные данные раскрывают механизм, посредством которого инфильтрирующие миелоидные клетки через активацию сигнального пути NF-κB посредством TNF индуцируют экспрессию *LAMA5* в опухолевых клетках для стимуляции ангиогенеза.

Таким образом, в диссертационном исследовании была установлена связь между воспалением, ангиогенезом, и отложением белков ВКМ, что ставит регуляцию экспрессии ламинина в центр вышеуказанных процессов.

На заключительном этапе работ по изучению опухолевого ВКМ (раздел 3.5), был проведен анализ различий в экспрессии генов ВКМ в опухолях и нормальных тканях с целью выявления ключевых компонентов ВКМ, определяющих прогноз заболевания. Была определена универсальная достоверно повышенная экспрессия девяти генов ВКМ в различных типах ЗНО, включающая гены *Col11a1*, *SPP1*, *MFAP2*, *Col10a1*, *Col1a1*, *BGN*, *COMP*, *AGRN* и *MXRA5*. Уровень экспрессии 9-генной сигнатуры определял течение заболевания и прогноз в широком спектре нозологий.

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 [279]. *SPP1* (остеопонтин) - многофункциональный

белок ВКМ, участвующий в ремоделировании кости, воспалении, заживлении ран и ангиогенезе [280]. MFAP2 (микрофибрилл-ассоциированный белок 2) - значимый компонент эластических микрофибрилл, регулирующий активность TGF- β и костного морфогенетического белка (BMP) в сосудах, легких и связках [281]. Col10a1 (альфа-1 цепь коллагена X типа) - сетчатый коллаген, экспрессируемый исключительно гипертрофическими хондроцитами и важный для эндохондрального остеогенеза и минерализации ВКМ [282]. BGN (бигликан) - протеогликан, связывающий ростовые факторы, такие как TGF- β и BMP, участвующий в костном ремоделировании, воспалении и сборке коллагеновых фибрилл [283]. COMP (матриксный олигомерный белок хряща) - гликопротеин, стабилизирующий ВКМ хряща, сухожилий и связок путем связывания коллагенов и протеогликанов [284]. AGRN (агрин) - протеогликан гепарансульфат, необходимый для агрегации ацетилхолиновых рецепторов в нервно-мышечном синапсе и участвующий также в развитии почек, ангиогенезе и синаптической пластичности [285]. 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 [286]. 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.

Ген *Col11a1* ранее связывали с прогрессией рака [279, 287, 288] и отмечали его экспрессию в стромальных клетках рака [288, 289] и опухолевых клетках на поздних стадиях EMT, где он способствует миграции и инвазии [290, 291]. Экспрессия гена *OSP* также описана в солидных опухолях [292] и индуцируется онкогенными сигнальными путями, включая Hedgehog, Wnt/ β -катенин и NF- κ B. *OSP* также экспрессируется опухоль-ассоциированными макрофагами и фибробластами, где была показана связь с ангиогенезом [293] и каскадом метастазирования [294].

Продукты генов некоторых компонентов сигнатуры недостаточно изучены в контексте ЗНО. Тем не менее, многие из них связаны с функциями, определяющими прогрессию заболевания. Например, бигликан (продукт гена *BGN*) взаимодействует с Toll-подобными рецепторами на поверхности макрофагов, стимулируя синтез TNF и CCL2 [295, 296]; оба этих цитокина имеют важное значение для рака [297, 298]. Экспрессия генов *BGN* и *MXRA5* стимулируется активностью TGF- β [299, 300], ключевого фактора неблагоприятного стромального ответа во многих типах ЗНО [301]. Кроме того, продукт гена *COMP* связывается с

TGF- β , тем самым усиливая его биологическую активность [302]. Таким образом, эти элементы ВКМ ассоциированы с прогрессией рака, а их комбинация может служить полезным биомаркером для прогнозирования.

Следующей научной задачей стало раскрытие роли отдельных популяций иммунных клеток микроокружения опухоли развитии ЗНО. В разделе 4.1 настоящего исследования было выявлено, что привлечение макрофагов в очаг опухоли после облучения является одним из факторов, ограничивающих развитие противоопухолевого иммунитета. Удаление макрофагов при лечении α M-CSF достоверно замедляло рост опухоли после радиотерапии за счет усиления адаптивного иммунитета.

В использованных моделях *in vitro* и *in vivo* выработка M-CSF повышалась при облучении опухолевых клеток и опухолей. Белок M-CSF действует через рецептор M-CSFR, и является необходимым звеном для дифференцировки, рекрутирования и, выживания макрофагов, происходящих из незрелых моноцитов [303–305]. Важно отметить, что зависимость макрофагов от M-CSF делает блокаду молекулярного пути M-CSF/M-CSFR перспективным терапевтическим подходом. В настоящее время проводятся многочисленные КИ соответствующих препаратов [306].

Влияние облучения как на рекрутирование макрофагов, так и на их функциональное состояние зависит от экспериментальной модели, дозы и временной точки. Ряд работ сообщает об усилении рекрутирования макрофагов [307–309], тогда как другие исследования не выявляют значимых изменений [310, 311]. В целом показано, что в мышинных опухолях число макрофагов увеличивается уже через 24 часов после облучения, достигает максимума через 1–2 недели и затем постепенно возвращается к исходному уровню [308, 312, 313]. Кроме того, в настоящей работе выявлено значимое увеличение числа макрофагов в течение нескольких дней после облучения, совпадающее с повышением уровня α M-CSF. Уменьшение количества макрофагов со временем указывает на ослабление первоначального сигнала к рекрутированию. Помимо количественных изменений, облучение способно модифицировать экспрессию генов и функции макрофагов. Например было показано, что через сутки после облучения в дозе 5 Гр в опухолевых макрофагах активируются как провоспалительные, так и иммуносупрессивные транскрипционные программы [313].

В проведенных экспериментах α M-CSF снижало количество опухоль-ассоциированных макрофагов приблизительно в два раза. Остается неясным, отражает ли это слабую эффективность α CSF как агента, наличие альтернативных механизмов рекрутирования или существование субпопуляции макрофагов, устойчивой к M-CSF-опосредованной деплеции. Иммуносупрессивная роль инфильтрирующих макрофагов была обнаружена при их деплеции с

помощью α M-CSF. Несмотря на то что α M-CSF не действует непосредственно на Т-клетки, уменьшение числа макрофагов сопровождалось значимым увеличением Т-клеточной инфильтрации. У мышей с опухолями MC38 на фоне α M-CSF отмечалось примерно двукратное увеличение количества CD8⁺ Т-клеток. В целом, увеличение инфильтрации Т-клеток после блокады M-CSF/M-CSFR наблюдается во многих моделях, однако редко приводит к торможению роста опухоли без дополнительных вмешательств [312, 314–317]. В одной работе лечение α M-CSF в комбинации с ИИКТ достоверно ингибировало опухолевый рост в ортотопической модели ПАПЖ *in vivo* [317]. Похожий подход был использован в сочетании с ингибиторами индоламин-2,3-диоксигеназы [316]. Кроме того, блокада M-CSFR улучшала инфильтрацию и активность CD8⁺ Т-клеток после адоптивной Т-клеточной терапии [315]. В этих работах общим является вывод о том, что усиление Т-клеточного ответа обусловлено снижением числа супрессорных макрофагов, однако молекулярные механизмы остаются неопределенными. Примечательно, что в настоящем исследовании противоопухолевая активность не наблюдалась при применении одного лишь α M-CSF без сочетания с облучением.

Была проверена гипотеза о том, что облучение улучшает прайминг Т-клеток и тем самым объясняет его синергию с α M-CSF. Было показано увеличение экспрессии MHC-I в опухолевых клетках в ответ на облучение. Эти результаты согласуются с клиническими наблюдениями противоопухолевого эффекта вне поля облучения (т.н. абскопального эффекта). Ряд исследований показал прайминг Т-клеток, опосредованный радиотерапией, хотя во многих случаях использовались экзогенные пептиды (например, овальбумин) [318–321]. Кроме того, показано увеличение количества и разнообразия клонов Т-клеточных рецепторов в ответ на облучение [322]. Таким образом, лучевая терапия оказывала иммуностимулирующее действие за счет усиления прайминга антиген-специфичных Т-клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что облучение может инициировать адаптивный иммунный ответ, который, однако, уравнивается индукцией иммуносупрессивных макрофагов и тем самым ограничивает эффективную эрадикацию злокачественных клеток.

Таким образом, показано, что адаптивный иммунитет, индуцируемый облучением, ограничивается рекрутированием макрофагов с выраженной M2-подобной поляризацией и иммуносупрессивными свойствами. Деpletion макрофагов частично уменьшала иммуносупрессию после облучения.

Одним из ключевых этапов в противоопухолевом иммунном ответе является активация иммуногенного представления опухолевых антигенов. Критическую роль в кросс-презентации антигенов для активации Т-клеток играют дендритные клетки, которые были детально изучены в разделе 4.3 диссертационного исследования. Было показано, что широко распространенная

пищевая добавка витамин Е активирует антиген-специфический иммунный ответ и усиливает эффективность ИИКТ. Механизм его действия заключается в усилении презентации антигенов дендритными клетками.

Жирорастворимый витамин Е необходим для нормальной функции многих органов [323]. Его потенциальное противораковое действие изучается десятилетиями, а результаты остаются противоречивыми [324, 325]. Ранние доклинические работы указывали на противоопухолевую активность витамина Е [326, 327], однако крупномасштабные КИ не выявили значимого эффекта [327–329]. Результаты диссертационного исследования проливают свет на одну из возможных причин этой неэффективности. Было установлено, что 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.

При этом в комбинации с терапиями, которые индуцируют высвобождение антигенов (например, раковые вакцины или иммуногенные химиотерапевтические агенты) и обогащают опухоль инфильтрирующими дендритными клетками, витамин Е способен существенно усиливать противоопухолевый иммунитет и повышать эффективность ИИКТ. Таким образом, максимальная эффективность достигается при кооперации трех механизмов противоопухолевого иммунитета: i) высвобождения опухолевых антигенов, ii) усиления их презентации дендритными клетками и iii) активации Т-клеточного адаптивного иммунного ответа. Для подтверждения этой гипотезы необходимы рандомизированные КИ с контролем дозировок витамина Е и минимизацией внешних факторов для проспективной оценки его эффективности в комбинации с ИИКТ или другими видами иммуностимулирующей терапии.

На основе полученных данных можно предположить, что комбинация витамина Е с другими методами лечения, может стать новой стратегией усиления различных видов иммунотерапии ЗНО. Многие подходы, такие как иммуногенная химиотерапия, лучевая терапия или некоторые таргетные препараты, вызывают иммуногенную гибель клеток, которая для развития полноценного ответа зависит от функций дендритных клеток по «обучению» цитотоксических Т-лимфоцитов [330]. Аналогичным образом, опухолевые вакцины, высвобождающие опухолевые антигены, нуждаются в дендритных клетках для формирования эффективного Т-клеточного иммунитета [176]. Активация дендритных клеток с помощью

витамина Е и усиление их способности обрабатывать и представлять антигены Т-клеткам может привести к более эффективному иммунному ответу и повысить результативность этих методов лечения.

Таким образом, витамин Е в форме пищевой добавки усиливает противоопухолевый иммунитет и эффективность ИИКТ преимущественно за счет активации дендритных клеток, даже с учетом других потенциальных противоопухолевых эффектов витамина Е [323, 331]. Результаты диссертационного исследования создают предпосылки для КИ комбинированной терапии, объединяющей витамин Е с методами, высвобождающими антигены (вакцины, иммуногенная химиотерапия), в качестве перспективного и эффективного направления в лечении ЗНО.

В разделе 4.4 было установлено, что нейтрофилы стимулируют ангиогенез в печеночных метастазах, тем самым ускоряя прогрессирование опухоли. Было экспериментально подтверждено, что экспрессия нейтрофилами FGF-2 приводит к формированию дезорганизованной сосудистой сети в метастазах и усугубляет гипоксию в опухолевой ткани. Элиминация нейтрофилов после инициации метастатического процесса снижала экспрессию FGF-2, подавляя ангиогенез и рост метастазов. У пациентов с печеночными метастазами ангиогенный фенотип формируется уже на момент диагностики, что указывает на необходимость ангиогенеза для прогрессирования заболевания. Таким образом, терапевтические стратегии, нацеленные на ангиогенные механизмы при печеночных метастазах, обладают значительным клиническим потенциалом.

Известно, что нейтрофилы приобретают проопухолевые свойства под влиянием факторов опухолевого микроокружения, таких как TGF- β [332]. Для опухоли-ассоциированных нейтрофилов также характерна повышенная экспрессия иммуносупрессивных факторов. Вместе с тем, их функциональная пластичность проявляется и в противоопухолевых эффектах: так, кондиционированные опухолью нейтрофилы могут стимулировать иммунный ответ на ранних стадиях РЛ [333], ингибировать закрепление опухолевых клеток в предметастатической нише легких [334], но при этом способствовать метастатическому росту при РМЖ посредством синтеза лейкотриенов [335]. Нейтрофилы, экспрессирующие хемокиновый рецептор CXCR2, играют ключевую роль в инициации печеночных метастазов [336], способствуя привлечению проопухолевых фиброцитов или удержанию опухолевых клеток в синусоидах печени.

В проведенных экспериментах *in vivo* было показано, что нейтрофилы активно инфильтрируют печеночные метастазы, а их деплеция достоверно снижала как рост метастатических колоний, так и депонирование FGF-2. Хотя вклад опухоли-ассоциированных нейтрофилов в пул ВКМ–депонированного FGF-2 не является единственным, именно они

выступали основным источником этого фактора как на уровне мРНК, так и на уровне белка, в отличие от опухолевых клеток с минимальной или отсутствующей экспрессии FGF-2. Опухоли мышей с удаленными нейтрофилами характеризовались низким уровнем FGF-2. Кроме того, нейтрофилы, выделенные из метастазов, экспрессировали гепараназу – фермент, высвобождающий FGF-2 из гликозаминогликанов ВКМ [337]. Таким образом, помимо прямой секреции FGF-2, опухоль-ассоциированные нейтрофилы усиливают его биоактивность.

Несмотря на то, что VEGF является ключевым стимулятором ангиогенеза при КРР [338], не все пациенты с метастазами отвечают на терапию бевацизумабом, что свидетельствует о возможности альтернативных механизмов ангиогенеза. Неотомые исследователи объясняют резистентность к бевацизумабу активностью Gr1+–клеток в опухолевом микроокружении [339]. Кроме того, показана роль FGF-2 в рецидиве глиобластомы после неудачной блокады VEGF [340]. Работы других авторов показали, что CD11b+/Gr1+ спленоциты способны экспрессировать FGF-2 *in vitro* в условиях кондиционирования опухолевой средой [338]. Полученные в этом диссертационном исследовании данные впервые выявили экспрессию FGF-2 именно нейтрофилами в моделях *in vivo*. Это подчеркивает потенциальную значимость нацеливания на FGF-2 при печеночных метастазах, особенно у пациентов с резистентностью к анти-VEGF-терапии.

Ингибирование FGF-2 моноклональным антителом GalF2 приводило к снижению общей сосудистой плотности и изменению морфологии сосудов. В частности, уменьшалось количество точек ветвления и степень опухолевой гипоксии, что свидетельствует об улучшении перфузии. Хотя нормализация сосудов может показаться парадоксальным в контексте подавления ангиогенеза, этот феномен описан в литературе [341] и, подобно эффектам ингибирования VEGF [342] или плацентарного фактора роста [343], связан с замедлением роста опухоли. В данном диссертационном исследовании подобная нормализация была впервые связана с ингибированием FGF-2 из нейтрофилов. Улучшение перфузии, в свою очередь, может повысить эффективность химиотерапии [344], поэтому роль ингибирования FGF-2 как сенсibiliзирующего агента при неоперабельных метастазах печени (где химиотерапия может обеспечить понижение стадии) требует дополнительных исследований.

Несмотря на доказанную роль FGF-2 в ангиогенезе печеночных метастазов, молекулярные механизмы этого феномена остаются не до конца изученными. Благодаря плеiotропности FGF-2 возможны альтернативные эффекты, не связанные непосредственно с ангиогенезом или функцией иммунных клеток. Нейтрофилы экспрессируют рецептор FGFR2, при этом его ингибирование снижает FGF-2-опосредованный хемотаксис [345]. В проведенных

экспериментах нейтрофильная инфильтрация не изменялась на фоне применения GalF2, однако нельзя исключать изменения их функционального статуса.

Ограничением проведенного исследования является тот факт, что метастазы моделировались методом интраселезеночной инъекции. В этой модели не учитывается процесс формирования предметастатической ниши и влияние первичной опухоли. Однако данные факторы имеют меньшую значимость, поскольку основной целью исследования было изучение роста уже развившихся макрометастазов.

Таким образом, продукция FGF-2 опухоль-ассоциированными нейтрофилами представляет собой новый значимый механизм ангиогенеза в печеночных метастазах. Полученные результаты обосновывают целесообразность дальнейших исследований, направленных на уточнение роли ингибирования FGF-2 в нормализации опухолевой васкуляризации и на оценку его потенциала для улучшения существующих терапевтических стратегий.

В разделе 4.5 была изучена возможность терапевтически активировать противоопухолевый Т-клеточный ответ в церебральных метастазах. Известно, что экспрессия CDK5 локализована в ЦНС. Данная работа установила, что опухолевые клетки церебральных метастазов под влиянием астроцитов экспрессируют CDK5 на более высоком уровне, чем первичные опухоли РМЖ. Кроме того, было показано, что CDK5 в клетках церебральных метастазов регулирует гены, вовлеченные в нейронную дифференциацию и созревание, что согласуется с недавним исследованием, описавшим нейроноподобную метапрограмму в раковых клетках метастазов мозга [346]. Можно предположить, что активация нейроноподобных программ может способствовать адаптации опухолевых клеток с гиперэкспрессией CDK5 к развитию церебральных метастазов, при этом коэволюция между опухолевыми клетками и астроцитами может регулировать этот процесс.

Опытным путем было доказано, что опосредованная астроцитами гиперэкспрессия CDK5 в злокачественных клетках церебральных метастазов приводит к снижению экспрессии МНС-I и уклонению от адаптивного иммунитета благодаря подавлению молекулярного пути *Irf2bp1/STAT1/NLRC5*. Это согласуется с опубликованными данными о взаимодействиях между астроцитами и метастатическими опухолевыми клетками [347]. Так, раковые клетки церебральных метастазов продуцируют белок рилин (англ. Reelin) для привлечения астроцитов, которые секретируют нейрональные факторы выживания, способствующие росту опухоли [348]. В другом исследовании было показано, что внеклеточные везикулы астроцитов доставляют микроРНК в клетки церебральных метастазов, подавляя гомолог фосфатазы и тензина (PTEN) и усиливая развитие опухоли [349]. Кроме того, реактивные STAT3⁺ астроциты способствуют

колонизации мозга раковыми клетками, ограничивают эффективность CD8⁺ Т-клеток и увеличивают популяцию CD74⁺Iba1⁺ микроглии/макрофагов [350]. Наконец, гранулоциты, инфильтрирующие метастазы мозга, индуцируют провоспалительную активацию астроцитов посредством липокалина 2, тем самым облегчая рост метастазов [86]. В этом диссертационном исследовании астроциты, «обученные» опухолью, повышали экспрессию CDK5 в раковых клетках, в то время как наивные астроциты оказывали противоположный эффект, что подчеркивает функциональные различия между наивными и «обученными» астроцитами.

Комплекс МНС-I играет ключевую роль в иммунном ответе за счет презентации антигенов CD8⁺ Т-клеткам [351]. На ранних стадиях канцерогенеза раковые клетки имеют разные уровни МНС-I, но опосредованное Т-клетками иммуноредактирование уничтожает клетки с высокой экспрессией комплекса, отбирая клоны с низкой/отсутствующей экспрессией МНС-I, которые известны слабой иммуногенностью [351] и агрессивным ростом [352]. В данной работе было показано, что церебральные метастазы могут уклоняться от иммунного распознавания путем подавления МНС-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 [353], что может обеспечить дополнительную терапевтическую выгоду. Однако росковитин имеет свои ограничения, включая короткий период полувыведения в мозге [354] и частичное ингибирование других CDK [355]. 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 [356]. 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 [74]. 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.

В заключительном разделе диссертационного исследования (Глава 5) была проведена первая комплексная характеристика микробиоты дыхательных путей в российской популяции, включающая сравнение здоровых лиц и пациентов с РЛ с учетом статуса курения. Российская популяция может определять уникальный профиль микробиоты посредством нескольких факторов: высокой распространенности специфических табачных изделий (включая местные смеси), воздействия окружающей среды (таких как экстремальные сезонные климатические колебания и особенности загрязнения воздуха в крупных городах), а также популяционно-специфических факторов образа жизни, включая пищевые привычки и особенности применения антибиотиков.

Полученные результаты свидетельствуют о выраженном влиянии табакокурения на состав и разнообразие микробиоты легкого. У здоровых лиц курение ассоциировалось с увеличением численности *Streptococcus* (тип Firmicutes) и снижением доли Proteobacteria, Fusobacteria, а также родов *Fusobacterium*, *Alloprevotella*, *Capnocytophaga*, *Zhouea* и *Neisseria*. Примечательно, что микробиота бывших курильщиков больше напоминала таковую у никогда не куривших субъектов, чем у активных курильщиков. Эти данные согласуются с результатами предыдущего исследования [357], где описаны аналогичные сдвиги в микробиоте орофарингеальных образцов у курильщиков, хотя и с некоторыми отличиями (например, тенденцией к увеличению *Megasphaera*, *Veillonella*, *Actinomyces* и *Atopobium*), не подтвержденными в нашем исследовании. Кроме того, повышение уровня *Streptococcus* и снижение *Neisseria* ранее отмечены в анализе микробиоты ротовой полости у взрослых американцев [358]. Аналогичное повышение *Streptococcus* и *Fusobacterium* при снижении *Porphyromonas*, *Neisseria* и *Gemella* в орофарингеальных образцах курильщиков, наблюдалось в многоцентровом когортном исследовании микробиоты верхних и нижних дыхательных путей [359]. Эти сдвиги, вероятно, отражают эффект гипоксии в дыхательных путях курильщиков, благоприятствующий факультативным анаэробам (*Streptococcus*), но неблагоприятный для аэробов (*Neisseria*).

В диссертационном исследовании мокрота здоровых курильщиков характеризовалась выраженным снижением численности *Neisseria* по сравнению с никогда не курившими субъектами и бывшими курильщиками. Увеличение стажа и интенсивности курения коррелировало со снижением численности родов *Campylobacter*, *Lachnoanaerobaculum* и *Peptostreptococcus* у здоровых курильщиков. Данные о микробиоте мокроты у здоровых курильщиков и некурящих ограничены единичными публикациями. Например, исследование на корейских близнецах выявило влияние курения на состав микробиоты мокроты: с ростом

интенсивности курения возрастала численность *Veillonella* и *Megasphaera*, а численность *Haemophilus* снижалась [360].

У пациентов с РЛ различия в разнообразии микробиоты между курильщиками, бывшими курильщиками и лицами, никогда не курившими, были минимальными. Это предполагает, что факторы, связанные с опухолью, доминируют над влиянием статуса курения в формировании микробных сообществ. Вероятно, системные воспалительные и иммуномодулирующие эффекты ЗНО оказывают более глубокое воздействие на респираторную микробиоту, чем изменения, обусловленные исключительно курением. Указанный феномен согласуется с недавними данными о том, что ЗНО формируют особую микросреду, кардинально меняющую взаимодействие между хозяином и микробами в различных анатомических компартментах. Тем не менее, обилие *Neisseria* оставалось стабильно сниженным у курильщиков, особенно на поздних стадиях заболевания (III–IV). Лишь некоторые таксоны, такие как *Neisseria*, сохраняют значимую ассоциацию с курением даже у пациентов с РЛ. Отсутствие существенных различий в составе микробиоты нижних дыхательных путей между курящими и некурящими пациентами с РЛ подтверждается и в других исследованиях [361].

Сравнительный анализ микробиоты мокроты у пациентов с РЛ и здоровых доноров независимо от статуса курения выявил характерные сигнатуры. Класс *Flavobacteriia*, порядки *Bacillales* и *Pasteurellales* были обогащены в нижних дыхательных путях пациентов с РЛ, в то время как *Alphaproteobacteria*, семейства *Coriobacteriaceae* и *Microbacteriaceae* были снижены. Курение–специфичные различия включали увеличение *Gammaproteobacteria* и *Lactobacillales* у курящих пациентов с РЛ и снижение *Fusobacteriales*, *Clostridiales*, *Veillonellaceae* и *Leptotrichiaceae*. Важно отметить, что повышенные уровни *Streptococcus* в дыхательных путях пациентов с РЛ отмечены в предыдущих работах [362], при этом данный род рассматривался как потенциальный биомаркер [363]; однако в нашем исследовании *Streptococcus* не был выявлен как специфичный для РЛ после поправки на статус курения.

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 ($\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 1$), 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 α M-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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ANOVA – дисперсионный анализ

ARG-1 – Аргиназа-1

CAR-T – Химерные антиген–рецепторные Т-клетки

CCL2 – Хемокин (C–C мотива) лиганд 2

CD – Кластер дифференцировки

CDK – Циклин–зависимая киназа

COX-2 – Циклооксигеназа-2

CSF – Колониестимулирующий фактор

CXCR2 – Рецептор 2 хемокинов C-X-C

EMT – Эндотелиально–мезенхимальный переход

ERK1/2 – Внеклеточно–регулируемые киназы 1 и 2

FBN1 – Фибриллин-1

FGF-2 – Фактор роста фибробластов 2

FIZZ-1 – Белок воспалительной зоны-1

GAT – Глутамат–аспартатный транспортер

GFAP – Глиальный фибриллярный кислый белок

GLT-1 – Глутаматный транспортер 1

GM-CSF – Гранулоцитарно–макрофагальный колониестимулирующий фактор

GSEA – анализ обогащения генных наборов

GZMB – Гранзим Б

HLA-DR – Человеческий лейкоцитарный антиген-DR

IgG – Иммуноглобулин G

IRF2BP1 – Белок-1, связывающий регуляторный фактор интерферона 2

IRF-8 – Регуляторный фактор интерферона–8

LAMA5 – Ламинин альфа-5

LEfSe – Линейный дискриминантный анализ размера эффекта

LFQ – безметочная количественная оценка

MHC-I – Главный комплекс гистосовместимости класса I

MMP – Матриксные металлопротеиназы

NF-κB – Ядерный фактор каппа бета

NLRC5 – NOD-подобный рецептор C5

OSP – Остопонтин

PD-1 – Рецептор программируемой клеточной смерти 1
 PD-L1 – Лиганд запрограммированной клеточной смерти 1
 PTEN – Гомолог фосфатазы и тензина
 SDF-1 – Стромальный клеточный фактор–1
 SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле
 SILAC – стабильно–изотопное мечение аминокислот при культивировании в клеточной культуре
 STAT1 – Трансдьюсер сигнала и активатор транскрипции 1
 TGF- β – Трансформирующий фактор роста β
 TGM-2 – Трансглутаминаза–2
 TLR4 – Toll-подобный рецептор 4
 TNC – Тенасцин–С
 TNF – Фактор некроза опухоли
 VEGF – Фактор роста эндотелия сосудов
 VEGFR1 – Рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов
 YAP1 – Yes-ассоциированный белок 1
 α SMA – Альфа-гладкомышечный актин
 АЛТ – Аланинаминотрансфераза
 АНОО ВО – Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования
 АСТ – Аспартатаминотрансфераза
 БСА – Бычий сывороточный альбумин
 ВКМ – Внеклеточный матрикс
 ГБМ – Глиобластома
 Гем – Гемцитабин
 ГЦК – Гепатоцеллюлярная карцинома
 ГЭ – Гематоксилин-эозин
 ГЭБ – Гематоэнцефалический барьер
 ДМСО – Диметилсульфоксид
 ЗКП – Звездчатые клетки печени
 ЗНО – Злокачественное новообразование
 ИИКТ – Ингибиторы иммунных контрольных точек
 КИ – Клинические испытания
 КРР – Колоректальный рак
 КФА – Киназа фокальной адгезии
 МО – Микроорганизм

МСКЛ – Миелоидные супрессорные клетки

МЯ – Микроядра

ОТЕ – Операционные таксономические единицы

ПАПЖ – Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы

ПМЯ–МСКЛ – Полиморфноядерные миелоидные супрессорные клетки

ПРІХ – Протопорфирин ІХ

РЛ – Рак легкого

РМЖ – Рак молочной железы

РМЖ-ММ – Метастазы в мозг рака молочной железы

РФК – Реактивные формы кислорода

ТБСТ – Tris-буферный солевой раствор с 0,05% твина-20

ФСБ – Фосфатно-солевой буфер

ХН – Хромосомная нестабильность

ХОБЛ – Хроническая обструктивная болезнь легких

Цел – Целекоксиб

ЦНС – Центральная нервная система

ЦОК – Циркулирующие опухолевые клетки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray F. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Soerjomataram I., Jemal A. // *CA: a cancer journal for clinicians* – 2024. – Т. 74 – № 3 – С.229–263.
2. Kleeff J. Pancreatic cancer / Kleeff J., Korc M., Apte M., La Vecchia C., Johnson C.D., Biankin A.V., Neale R.E., Tempero M., Tuveson D.A., Hruban R.H., Neoptolemos J.P. // *Nature Reviews. Disease Primers* – 2016. – Т. 2 – С.16022.
3. Gerstberger S. Metastasis / Gerstberger S., Jiang Q., Ganesh K. // *Cell* – 2023. – Т. 186 – № 8 – С.1564–1579.
4. Galfrascoli E. Risk/benefit profile of bevacizumab in metastatic colon cancer: a systematic review and meta-analysis / Galfrascoli E., Piva S., Cinquini M., Rossi A., La Verde N., Bramati A., Moretti A., Manazza A., Damia G., Torri V., Muserra G., Farina G., Garassino M.C., ORION Collaborative Group // *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* – 2011. – Т. 43 – № 4 – С.286–294.
5. Siegel R.L. Cancer statistics, 2026 / Siegel R.L., Kratzer T.B., Wagle N.S., Sung H., Jemal A. // *CA: a cancer journal for clinicians* – 2026. – Т. 76 – № 1 – С.e70043.
6. Visser K.E. de The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth / Visser K.E. de, Joyce J.A. // *Cancer Cell* – 2023. – Т. 41 – № 3 – С.374–403.
7. Yuan S. Beyond genetics: driving cancer with the tumour microenvironment behind the wheel / Yuan S., Almagro J., Fuchs E. // *Nature Reviews. Cancer* – 2024. – Т. 24 – № 4 – С.274–286.
8. Dijke P. ten Extracellular control of TGFβ signalling in vascular development and disease / Dijke P. ten, Arthur H.M. // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* – 2007. – Т. 8 – № 11 – С.857–869.
9. Wang X. TGF-β, EMT, and resistance to anti-cancer treatment / Wang X., Eichhorn P.J.A., Thiery J.P. // *Seminars in Cancer Biology* – 2023. – Т. 97 – С.1–11.
10. Cooper J. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance / Cooper J., Giancotti F.G. // *Cancer Cell* – 2019. – Т. 35 – № 3 – С.347–367.
11. St Paul M. The Roles of CD8+ T Cell Subsets in Antitumor Immunity / St Paul M., Ohashi P.S. // *Trends in Cell Biology* – 2020. – Т. 30 – № 9 – С.695–704.
12. Knochelmann H.M. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity / Knochelmann H.M., Dwyer C.J., Bailey S.R., Amaya S.M., Elston D.M., Mazza-McCrann J.M., Paulos C.M. // *Cellular & Molecular Immunology* – 2018. – Т. 15 – № 5 – С.458–469.
13. Qian F. High tumor-infiltrating FoxP3+ T cells predict poor survival in estrogen receptor-positive breast cancer: A meta-analysis / Qian F., Qingping Y., Linqun W., Xiaojin H., Rongshou W., Shanshan R., Wenjun L., Yong H., Enliang L. // *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* – 2017. – Т. 43 – № 7 – С.1258–1264.
14. Hansen M. The role of dendritic cells in cancer / Hansen M., Andersen M.H. // *Seminars in Immunopathology* – 2017. – Т. 39 – № 3 – С.307–316.

15. Jia H. Cancer associated fibroblasts in cancer development and therapy / Jia H., Chen X., Zhang L., Chen M. // *Journal of Hematology & Oncology* – 2025. – T. 18 – № 1 – C.36.
16. Battaglia T.W. A pan-cancer analysis of the microbiome in metastatic cancer / Battaglia T.W., Mimpfen I.L., Traets J.J.H., Hoeck A. van, Zevenrijn L.J., Geurts B.S., Wit G.F. de, Noë M., Hofland I., Vos J.L., Cornelissen S., Alkemade M., Broeks A., Zuur C.L., Cuppen E., Wessels L., Haar J. van de, Voest E. // *Cell* – 2024. – T. 187 – № 9 – C.2324- 2335.e19.
17. Baruch E.N. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients / Baruch E.N., Youngster I., Ben-Betzalel G., Ortenberg R., Lahat A., Katz L., Adler K., Dick-Necula D., Raskin S., Bloch N., Rotin D., Anafi L., Avivi C., Melnichenko J., Steinberg-Silman Y., Mamtani R., Harati H., Asher N., Shapira-Frommer R., Brosh-Nissimov T., Eshet Y., Ben-Simon S., Ziv O., Khan M.A.W., Amit M., Ajami N.J., Barshack I., Schachter J., Wargo J.A., Koren O., Markel G., Boursi B. // *Science (New York, N.Y.)* – 2021. – T. 371 – № 6529 – C.602–609.
18. Teixeira da Silva J.A. Issues and challenges to reproducibility of cancer research: a commentary / Teixeira da Silva J.A. // *Future Oncology (London, England)* – 2022. – T. 18 – № 12 – C.1417–1422.
19. Kim D. Redundant trials can be prevented, if the EU clinical trial regulation is applied duly / Kim D., Hasford J. // *BMC medical ethics* – 2020. – T. 21 – № 1 – C.107.
20. Ioannidis J.P.A. The Mass Production of Redundant, Misleading, and Conflicted Systematic Reviews and Meta-analyses / Ioannidis J.P.A. // *The Milbank Quarterly* – 2016. – T. 94 – № 3 – C.485–514.
21. Jia Y. Effect of redundant clinical trials from mainland China evaluating statins in patients with coronary artery disease: cross sectional study / Jia Y., Wen J., Qureshi R., Ehrhardt S., Celentano D.D., Wei X., Rosman L., Wen Y., Robinson K.A. // *BMJ (Clinical research ed.)* – 2021. – T. 372 – C.n48.
22. DeVita V.T. A history of cancer chemotherapy / DeVita V.T., Chu E. // *Cancer Research* – 2008. – T. 68 – № 21 – C.8643–8653.
23. Abshire D. The Evolution of Radiation Therapy in Treating Cancer / Abshire D., Lang M.K. // *Seminars in Oncology Nursing* – 2018. – T. 34 – № 2 – C.151–157.
24. Haslam A. Estimation of the Percentage of US Patients With Cancer Who Are Eligible for and Respond to Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Drugs / Haslam A., Prasad V. // *JAMA network open* – 2019. – T. 2 – № 5 – C.e192535.
25. Choi G. Price and Prejudice? The Value of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy / Choi G., Shin G., Bae S. // *International Journal of Environmental Research and Public Health* – 2022. – T. 19 – № 19 – C.12366.
26. Kurtovic-Kozaric A. Lack of Access to Targeted Cancer Treatment Modalities in the Developing World in the Era of Precision Medicine: Real-Life Lessons From Bosnia / Kurtovic-Kozaric A., Vranic S., Kurtovic S., Hasic A., Kozaric M., Granov N., Ceric T. // *Journal of Global Oncology* – 2018. – T. 4 – C.1–5.
27. Bhullar K.S. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions / Bhullar K.S., Lagarón N.O., McGowan E.M., Parmar I., Jha A., Hubbard B.P., Rupasinghe H.P.V. // *Molecular Cancer* – 2018. – T. 17 – № 1 – C.48.

28. Tanda E.T. Current State of Target Treatment in BRAF Mutated Melanoma / Tanda E.T., Vanni I., Boutros A., Andreotti V., Bruno W., Ghiorzo P., Spagnolo F. // *Frontiers in Molecular Biosciences* – 2020. – T. 7 – C.154.
29. Bédouelle E. Should Targeted Therapy Be Continued in BRAF-Mutant Melanoma Patients after Complete Remission? / Bédouelle E., Nguyen J.M., Varey E., Khammari A., Dreno B. // *Dermatology (Basel, Switzerland)* – 2022. – T. 238 – № 3 – C.517–526.
30. Mason S. Evaluating complementary medicine: methodological challenges of randomised controlled trials / Mason S., Tovey P., Long A.F. // *BMJ (Clinical research ed.)* – 2002. – T. 325 – № 7368 – C.832–834.
31. Ropers H.-H. Single gene disorders come into focus - again / Ropers H.-H. // *Dialogues in Clinical Neuroscience* – 2010. – T. 12 – № 1 – C.95–102.
32. Shi C. Multifactorial Diseases of the Heart, Kidneys, Lungs, and Liver and Incident Cancer: Epidemiology and Shared Mechanisms / Shi C., Wit S. de, Učambarlić E., Markousis-Mavrogenis G., Screever E.M., Meijers W.C., Boer R.A. de, Aboumsallem J.P. // *Cancers* – 2023. – T. 15 – № 3 – C.729.
33. Kesić S. Systems biology, emergence and antireductionism / Kesić S. // *Saudi Journal of Biological Sciences* – 2016. – T. 23 – № 5 – C.584–591.
34. Freeman J. Towards a definition of holism / Freeman J. // *The British Journal of General Practice: The Journal of the Royal College of General Practitioners* – 2005. – T. 55 – № 511 – C.154–155.
35. Lim B. Advancing Cancer Research and Medicine with Single-Cell Genomics / Lim B., Lin Y., Navin N. // *Cancer Cell* – 2020. – T. 37 – № 4 – C.456–470.
36. Wang R. Single-cell genomic and transcriptomic landscapes of primary and metastatic colorectal cancer tumors / Wang R., Li J., Zhou X., Mao Y., Wang W., Gao S., Wang W., Gao Y., Chen K., Yu S., Wu X., Wen L., Ge H., Fu W., Tang F. // *Genome Medicine* – 2022. – T. 14 – № 1 – C.93.
37. Scott E.C. Trends in the approval of cancer therapies by the FDA in the twenty-first century / Scott E.C., Baines A.C., Gong Y., Moore R., Pamuk G.E., Saber H., Subedee A., Thompson M.D., Xiao W., Pazdur R., Rao V.A., Schneider J., Beaver J.A. // *Nature Reviews. Drug Discovery* – 2023. – T. 22 – № 8 – C.625–640.
38. Siegel R.L. Cancer statistics, 2023 / Siegel R.L., Miller K.D., Wagle N.S., Jemal A. // *CA: a cancer journal for clinicians* – 2023. – T. 73 – № 1 – C.17–48.
39. Sung H. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. // *CA: a cancer journal for clinicians* – 2021. – T. 71 – № 3 – C.209–249.
40. Goyal R. Progress in the field of noninvasive diagnostics for colorectal cancer: a systematic review for the accuracy of blood-based biomarkers for detection of advanced pre-cancerous lesions / Goyal R., Wassie M.M., Winter J.M., Lathlean T.J., Young G.P., Symonds E.L. // *Expert Review of Molecular Diagnostics* – 2023. – T. 23 – № 12 – C.1233–1250.

41. Lin M.J. Cancer vaccines: the next immunotherapy frontier / Lin M.J., Svensson-Arvelund J., Lubitz G.S., Marabelle A., Melero I., Brown B.D., Brody J.D. // *Nature Cancer* – 2022. – Т. 3 – № 8 – C.911–926.
42. Park M. Papers and patents are becoming less disruptive over time / Park M., Leahey E., Funk R.J. // *Nature* – 2023. – Т. 613 – № 7942 – C.138–144.
43. Lin A. Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials / Lin A., Giuliano C.J., Palladino A., John K.M., Abramowicz C., Yuan M.L., Sausville E.L., Lukow D.A., Liu L., Chait A.R., Galluzzo Z.C., Tucker C., Sheltzer J.M. // *Science Translational Medicine* – 2019. – Т. 11 – № 509 – C.eaaw8412.
44. Foulkes I. Cancer Grand Challenges: Embarking on a New Era of Discovery / Foulkes I., Sharpless N.E. // *Cancer Discovery* – 2021. – Т. 11 – № 1 – C.23–27.
45. Harris E. Cancer Moonshot Plan Announced / Harris E. // *JAMA* – 2023. – Т. 329 – № 17 – C.1443.
46. Mavrogenis A.F. The good, the bad and the rude peer-review / Mavrogenis A.F., Quaile A., Scarlat M.M. // *International Orthopaedics* – 2020. – Т. 44 – № 3 – C.413–415.
47. Barroga E. Innovative Strategies for Peer Review / Barroga E. // *Journal of Korean Medical Science* – 2020. – Т. 35 – № 20 – C.e138.
48. Nature will publish peer review reports as a trial // *Nature* – 2020. – Т. 578 – № 7793 – C.8.
49. Logunov D.Y. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia / Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L., Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group // *Lancet (London, England)* – 2021. – Т. 397 – № 10275 – C.671–681.
50. Oda Y. Immunogenicity and safety of a booster dose of a self-amplifying RNA COVID-19 vaccine (ARCT-154) versus BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: a double-blind, multicentre, randomised, controlled, phase 3, non-inferiority trial / Oda Y., Kumagai Y., Kanai M., Iwama Y., Okura I., Minamida T., Yagi Y., Kurosawa T., Greener B., Zhang Y., Walson J.L. // *The Lancet. Infectious Diseases* – 2024. – Т. 24 – № 4 – C.351–360.
51. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году. / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024.– 262с.
52. Шахзадова А.О. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / Шахзадова А.О., Старинский В.В., Лисичникова И.В. // *Сибирский онкологический журнал* – 2023. – Т. 22 – № 5 – С.5–13.

53. Braithwaite D. Cancer and aging: A call to action / Braithwaite D., Anton S., Mohile S., DeGregori J., Gillis N., Zhou D., Bloodworth S., Pahor M., Licht J. // *Aging and Cancer* – 2022. – Т. 3 – № 2 – С.87–94.
54. Линник С.А. Стоимость лекарственного лечения пациентов с онкологическими заболеваниями в амбулаторных условиях, рассчитанная на основании стандартов медицинской помощи / Линник С.А., Туменко Е.Е. // *Менеджер здравоохранения* – 2024. – № 9 – С.44–51.
55. Линник С.А. Стратегия органов управления здравоохранением субъектов Российской Федерации по льготному лекарственному обеспечению пациентов со злокачественными новообразованиями / Линник С.А. // *Общественное здоровье и здравоохранение* – 2023. – № 1 (76) – С.32–36.
56. Гопиенко И.А. Воспроизведённые лекарственные препараты в онкологии / Гопиенко И.А., Ушкалова Е.А., Зырянов С.К. // *Качественная Клиническая Практика* – 2019. – № 4 – С.15–22.
57. Ganesh K. Targeting metastatic cancer / Ganesh K., Massagué J. // *Nature Medicine* – 2021. – Т. 27 – № 1 – С.34–44.
58. Hanahan D. Hallmarks of cancer: the next generation / Hanahan D., Weinberg R.A. // *Cell* – 2011. – Т. 144 – № 5 – С.646–674.
59. Massagué J. Metastasis Initiating Cells and Ecosystems / Massagué J., Ganesh K. // *Cancer discovery* – 2021. – Т. 11 – № 4 – С.971–994.
60. Lambert A.W. Emerging Biological Principles of Metastasis / Lambert A.W., Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. // *Cell* – 2017. – Т. 168 – № 4 – С.670–691.
61. Turajlic S. Metastasis as an evolutionary process / Turajlic S., Swanton C. // *Science (New York, N.Y.)* – 2016. – Т. 352 – № 6282 – С.169–175.
62. Gerstberger S. Metastasis / Gerstberger S., Jiang Q., Ganesh K. // *Cell* – 2023. – Т. 186 – № 8 – С.1564–1579.
63. Leong S.P. Cancer metastasis through the lymphatic versus blood vessels / Leong S.P., Witte M.H. // *Clinical & Experimental Metastasis* – 2024. – Т. 41 – № 4 – С.387–402.
64. Follain G. Fluids and their mechanics in tumour transit: shaping metastasis / Follain G., Herrmann D., Harlepp S., Hyenne V., Osmani N., Warren S.C., Timpson P., Goetz J.G. // *Nature Reviews. Cancer* – 2020. – Т. 20 – № 2 – С.107–124.
65. Massagué J. Metastatic colonization by circulating tumour cells / Massagué J., Obenauf A.C. // *Nature* – 2016. – Т. 529 – № 7586 – С.298–306.
66. Yuzhalin A.E. Brain Metastasis Organotropism / Yuzhalin A.E., Yu D. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* – 2020. – Т. 10 – № 5 – С.a037242.
67. Kaplan R.N. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche / Kaplan R.N., Riba R.D., Zacharoulis S., Bramley A.H., Vincent L., Costa C., MacDonald D.D., Jin D.K., Shido K., Kerns S.A., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port J.L., Altorki N., Port E.R., Ruggero D., Shmelkov S.V., Jensen K.K., Rafii S., Lyden D. // *Nature* – 2005. – Т. 438 – № 7069 – С.820–827.

68. Summers M.A. Cancer Cell Dormancy in Metastasis / Summers M.A., McDonald M.M., Croucher P.I. // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine – 2020. – T. 10 – № 4 – C.a037556.
69. Dai J. Astrocytic laminin-211 drives disseminated breast tumor cell dormancy in brain / Dai J., Cimino P.J., Gouin K.H., Grzelak C.A., Barrett A., Lim A.R., Long A., Weaver S., Saldin L.T., Uzamere A., Schulte V., Clegg N., Pisarsky L., Lyden D., Bissell M.J., Knott S., Welm A.L., Bielas J.H., Hansen K.C., Winkler F., Holland E.C., Ghajar C.M. // Nature Cancer – 2022. – T. 3 – № 1 – C.25–42.
70. Garrido F. Generation of MHC class I diversity in primary tumors and selection of the malignant phenotype / Garrido F., Romero I., Aptsiauri N., Garcia-Lora A.M. // International Journal of Cancer – 2016. – T. 138 – № 2 – C.271–280.
71. Carey L.A. Central nervous system metastases in women after multimodality therapy for high risk breast cancer / Carey L.A., Ewend M.G., Metzger R., Sawyer L., Dees E.C., Sartor C.I., Moore D.T., Graham M.L. // Breast Cancer Research and Treatment – 2004. – T. 88 – № 3 – C.273–280.
72. Osella-Abate S. Risk factors related to late metastases in 1,372 melanoma patients disease free more than 10 years / Osella-Abate S., Ribero S., Sanlorenzo M., Maule M.M., Richiardi L., Merletti F., Tomasini C., Marra E., Macripò G., Fierro M.T., Quagliano P. // International Journal of Cancer – 2015. – T. 136 – № 10 – C.2453–2457.
73. Recasens A. Targeting Cancer Cell Dormancy / Recasens A., Munoz L. // Trends in Pharmacological Sciences – 2019. – T. 40 – № 2 – C.128–141.
74. Brastianos P.K. Palbociclib demonstrates intracranial activity in progressive brain metastases harboring cyclin-dependent kinase pathway alterations / Brastianos P.K., Kim A.E., Wang N., Lee E.Q., Ligibel J., Cohen J.V., Chukwueke U.N., Mahar M., Oh K., White M.D., Shih H.A., Forst D., Gainor J.F., Heist R.S., Gerstner E.R., Batchelor T.T., Lawrence D., Ryan D.P., Iafrate A.J., Giobbie-Hurder A., Santagata S., Carter S.L., Cahill D.P., Sullivan R.J. // Nature Cancer – 2021. – T. 2 – № 5 – C.498–502.
75. Johnston S.R.D. Abemaciclib Combined With Endocrine Therapy for the Adjuvant Treatment of HR+, HER2-, Node-Positive, High-Risk, Early Breast Cancer (monarchE) / Johnston S.R.D., Harbeck N., Hegg R., Toi M., Martin M., Shao Z.M., Zhang Q.Y., Martinez Rodriguez J.L., Campone M., Hamilton E., Sohn J., Guarneri V., Okada M., Boyle F., Neven P., Cortés J., Huober J., Wardley A., Tolaney S.M., Cicin I., Smith I.C., Frenzel M., Headley D., Wei R., San Antonio B., Hulstijn M., Cox J., O'Shaughnessy J., Rastogi P., monarchE Committee Members and Investigators // Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology – 2020. – T. 38 – № 34 – C.3987–3998.
76. Creasy J.M. Actual 10-year survival after hepatic resection of colorectal liver metastases: what factors preclude cure? / Creasy J.M., Sadot E., Koerkamp B.G., Chou J.F., Gonen M., Kemeny N.E., Balachandran V.P., Kingham T.P., DeMatteo R.P., Allen P.J., Blumgart L.H., Jarnagin W.R., D'Angelica M.I. // Surgery – 2018. – T. 163 – № 6 – C.1238–1244.
77. Clark M.E. Liver-directed therapies in metastatic colorectal cancer / Clark M.E., Smith R.R. // Journal of Gastrointestinal Oncology – 2014. – T. 5 – № 5 – C.374–387.
78. Gomez D.R. Local Consolidative Therapy Vs. Maintenance Therapy or Observation for Patients With Oligometastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: Long-Term Results of a Multi-Institutional, Phase II, Randomized Study / Gomez D.R., Tang C., Zhang J., Blumenschein G.R., Hernandez M., Lee J.J.,

Ye R., Palma D.A., Louie A.V., Camidge D.R., Doebele R.C., Skoulidis F., Gaspar L.E., Welsh J.W., Gibbons D.L., Karam J.A., Kavanagh B.D., Tsao A.S., Sepesi B., Swisher S.G., Heymach J.V. // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* – 2019. – T. 37 – № 18 – C.1558–1565.

79. Parker C. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer / Parker C., Nilsson S., Heinrich D., Helle S.I., O'Sullivan J.M., Fosså S.D., Chodacki A., Wiechno P., Logue J., Seke M., Widmark A., Johannessen D.C., Hoskin P., Bottomley D., James N.D., Solberg A., Syndikus I., Kliment J., Wedel S., Boehmer S., Dall'Oglio M., Franzén L., Coleman R., Vogelzang N.J., O'Bryan-Tear C.G., Staudacher K., Garcia-Vargas J., Shan M., Bruland Ø.S., Sartor O., ALSYMPCA Investigators // *The New England Journal of Medicine* – 2013. – T. 369 – № 3 – C.213–223.

80. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Adjuvant bisphosphonate treatment in early breast cancer: meta-analyses of individual patient data from randomised trials / Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). // *Lancet (London, England)* – 2015. – T. 386 – № 10001 – C.1353–1361.

81. Lin X. Treatment of Brain Metastases / Lin X., DeAngelis L.M. // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* – 2015. – T. 33 – № 30 – C.3475–3484.

82. Aupérin A. Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation Overview Collaborative Group / Aupérin A., Arriagada R., Pignon J.P., Le Péchoux C., Gregor A., Stephens R.J., Kristjansen P.E., Johnson B.E., Ueoka H., Wagner H., Aisner J. // *The New England Journal of Medicine* – 1999. – T. 341 – № 7 – C.476–484.

83. Ai L. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond / Ai L., Xu A., Xu J. // *Advances in Experimental Medicine and Biology* – 2020. – T. 1248 – C.33–59.

84. Maacha S. Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance / Maacha S., Bhat A.A., Jimenez L., Raza A., Haris M., Uddin S., Grivel J.-C. // *Molecular Cancer* – 2019. – T. 18 – № 1 – C.55.

85. Bhat A.A. Cytokine- and chemokine-induced inflammatory colorectal tumor microenvironment: Emerging avenue for targeted therapy / Bhat A.A., Nisar S., Singh M., Ashraf B., Masoodi T., Prasad C.P., Sharma A., Maacha S., Karedath T., Hashem S., Yasin S.B., Bagga P., Reddy R., Frennaux M.P., Uddin S., Dhawan P., Haris M., Macha M.A. // *Cancer Communications (London, England)* – 2022. – T. 42 – № 8 – C.689–715.

86. Adler O. Reciprocal interactions between innate immune cells and astrocytes facilitate neuroinflammation and brain metastasis via lipocalin-2 / Adler O., Zait Y., Cohen N., Blazquez R., Doron H., Monteran L., Scharff Y., Shami T., Mundhe D., Glehr G., Kanner A.A., Horn S., Yahalom V., Haferkamp S., Hutchinson J.A., Bleckmann A., Nahary L., Benhar I., Yust Katz S., Pukrop T., Erez N. // *Nature Cancer* – 2023. – T. 4 – № 3 – C.401–418.

87. Kirschenbaum D. Time-resolved single-cell transcriptomics defines immune trajectories in glioblastoma / Kirschenbaum D., Xie K., Ingelfinger F., Katzenelenbogen Y., Abadie K., Look T., Sheban F., Phan T.S., Li B., Zwicky P., Yofe I., David E., Mazuz K., Hou J., Chen Y., Shaim H., Shanley M., Becker S., Qian J., Colonna M., Ginhoux F., Rezvani K., Theis F.J., Yosef N., Weiss T., Weiner A., Amit I. // *Cell* – 2024. – T. 187 – № 1 – C.149- 165.e23.

88. Kumari S. Combinatorial therapy in tumor microenvironment: Where do we stand? / Kumari S., Advani D., Sharma S., Ambasta R.K., Kumar P. // *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer* – 2021. – T. 1876 – № 2 – C.188585.
89. Lam K.C. Microbiota triggers STING-type I IFN-dependent monocyte reprogramming of the tumor microenvironment / Lam K.C., Araya R.E., Huang A., Chen Q., Di Modica M., Rodrigues R.R., Lopès A., Johnson S.B., Schwarz B., Bohrsen E., Cogdill A.P., Bosio C.M., Wargo J.A., Lee M.P., Goldszmid R.S. // *Cell* – 2021. – T. 184 – № 21 – C.5338- 5356.e21.
90. Chen S. Hypoxia-driven tumor stromal remodeling and immunosuppressive microenvironment in scirrhous HCC / Chen S., Liao C., Hu H., Liao J., Chen Z., Li S., Zeng X., Peng B., Shen S., Li D., Li S., Lai J., Peng S., Xie Y., Kuang M. // *Hepatology (Baltimore, Md.)* – 2024. – T. 79 – № 4 – C.780–797.
91. Glabman R.A. Cancer-Associated Fibroblasts: Tumorigenicity and Targeting for Cancer Therapy / Glabman R.A., Choyke P.L., Sato N. // *Cancers* – 2022. – T. 14 – № 16 – C.3906.
92. Özdemir B.C. Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival / Özdemir B.C., Pentcheva-Hoang T., Carstens J.L., Zheng X., Wu C.-C., Simpson T.R., Laklai H., Sugimoto H., Kahlert C., Novitskiy S.V., De Jesus-Acosta A., Sharma P., Heidari P., Mahmood U., Chin L., Moses H.L., Weaver V.M., Maitra A., Allison J.P., LeBleu V.S., Kalluri R. // *Cancer Cell* – 2015. – T. 28 – № 6 – C.831–833.
93. Khan F. Macrophages and microglia in glioblastoma: heterogeneity, plasticity, and therapy / Khan F., Pang L., Dunterman M., Lesniak M.S., Heimberger A.B., Chen P. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2023. – T. 133 – № 1 – C.e163446.
94. Li C. T7 peptide-decorated exosome-based nanocarrier system for delivery of Galectin-9 siRNA to stimulate macrophage repolarization in glioblastoma / Li C., Guan N., Liu F. // *Journal of Neuro-Oncology* – 2023. – T. 162 – № 1 – C.93–108.
95. Xiao Y. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer / Xiao Y., Yu D. // *Pharmacology & Therapeutics* – 2021. – T. 221 – C.107753.
96. Cai L. Targeting LAG-3, TIM-3, and TIGIT for cancer immunotherapy / Cai L., Li Y., Tan J., Xu L., Li Y. // *Journal of Hematology & Oncology* – 2023. – T. 16 – № 1 – C.101.
97. Galassi C. The hallmarks of cancer immune evasion / Galassi C., Chan T.A., Vitale I., Galluzzi L. // *Cancer Cell* – 2024. – T. 42 – № 11 – C.1825–1863.
98. Naba A. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices / Naba A., Clauser K.R., Hoersch S., Liu H., Carr S.A., Hynes R.O. // *Molecular & cellular proteomics: MCP* – 2012. – T. 11 – № 4 – C.M111.014647.
99. Hynes R.O. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions / Hynes R.O., Naba A. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* – 2012. – T. 4 – № 1 – C.a004903.
100. Vogel V. Unraveling the Mechanobiology of Extracellular Matrix / Vogel V. // *Annual Review of Physiology* – 2018. – T. 80 – C.353–387.

101. Krishnaswamy V.R. Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds / Krishnaswamy V.R., Mintz D., Sagi I. // *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* – 2017. – T. 1864 – № 11 Pt B – C.2220–2227.
102. Luo H. Cancer-associated fibroblasts: a multifaceted driver of breast cancer progression / Luo H., Tu G., Liu Z., Liu M. // *Cancer Letters* – 2015. – T. 361 – № 2 – C.155–163.
103. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer / Kalluri R. // *Nature Reviews. Cancer* – 2016. – T. 16 – № 9 – C.582–598.
104. Wang X. Cancer-associated fibroblast-derived Lumican promotes gastric cancer progression via the integrin β 1-FAK signaling pathway / Wang X., Zhou Q., Yu Z., Wu X., Chen X., Li J., Li C., Yan M., Zhu Z., Liu B., Su L. // *International Journal of Cancer* – 2017. – T. 141 – № 5 – C.998–1010.
105. McLean G.W. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity / McLean G.W., Carragher N.O., Avizienyte E., Evans J., Brunton V.G., Frame M.C. // *Nature Reviews. Cancer* – 2005. – T. 5 – № 7 – C.505–515.
106. Amofa D. Hypoxia promotes primitive glycosaminoglycan-rich extracellular matrix composition in developing heart valves / Amofa D., Hulin A., Nakada Y., Sadek H.A., Yutzey K.E. // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* – 2017. – T. 313 – № 6 – C.H1143–H1154.
107. Horsman M.R. The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy / Horsman M.R., Overgaard J. // *Journal of Radiation Research* – 2016. – T. 57, Suppl 1 – C.i90–i98.
108. Sangaletti S. Mesenchymal Transition of High-Grade Breast Carcinomas Depends on Extracellular Matrix Control of Myeloid Suppressor Cell Activity / Sangaletti S., Tripodo C., Santangelo A., Castioni N., Portararo P., Gulino A., Botti L., Parenza M., Cappetti B., Orlandi R., Tagliabue E., Chiodoni C., Colombo M.P. // *Cell Reports* – 2016. – T. 17 – № 1 – C.233–248.
109. Salmon H. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors / Salmon H., Franciszkiewicz K., Damotte D., Dieu-Nosjean M.-C., Validire P., Trautmann A., Mami-Chouaib F., Donnadieu E. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2012. – T. 122 – № 3 – C.899–910.
110. Fang M. Collagen as a double-edged sword in tumor progression / Fang M., Yuan J., Peng C., Li Y. // *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* – 2014. – T. 35 – № 4 – C.2871–2882.
111. Simpson L.O. Basement membranes and biological thixotropy: a new hypothesis / Simpson L.O. // *Pathology* – 1980. – T. 12 – № 3 – C.377–389.
112. Reid S.E. Tumor matrix stiffness promotes metastatic cancer cell interaction with the endothelium / Reid S.E., Kay E.J., Neilson L.J., Henze A.-T., Serneels J., McGhee E.J., Dhayade S., Nixon C., Mackey J.B., Santi A., Swaminathan K., Athineos D., Papalazarou V., Patella F., Román-Fernández Á., ElMaghloob Y., Hernandez-Fernaund J.R., Adams R.H., Ismail S., Bryant D.M., Salmeron-Sanchez M., Machesky L.M., Carlin L.M., Blyth K., Mazzone M., Zanivan S. // *The EMBO journal* – 2017. – T. 36 – № 16 – C.2373–2389.
113. Pickup M.W. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer / Pickup M.W., Mouw J.K., Weaver V.M. // *EMBO reports* – 2014. – T. 15 – № 12 – C.1243–1253.

114. Considine J.M. Identification of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Extracellular Matrix Signatures from In-Depth Proteomic Profiling that Correlate with Lymphocyte Infiltration / Considine J.M., Pally D., O'Brien S.A., Egan J.N., Feng D., Pignatelli J., Kashyap A., Sharma N.S., Naba A. // *Cancer Research Communications* – 2026. – T. 6 – № 6 – C.1319–1335.
115. Ha S.Y. The prognostic significance of cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma / Ha S.Y., Yeo S.-Y., Xuan Y., Kim S.-H. // *PloS One* – 2014. – T. 9 – № 6 – C.e99955.
116. Rhim A.D. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma / Rhim A.D., Oberstein P.E., Thomas D.H., Mirek E.T., Palermo C.F., Sastra S.A., Dekleva E.N., Saunders T., Becerra C.P., Tattersall I.W., Westphalen C.B., Kitajewski J., Fernandez-Barrena M.G., Fernandez-Zapico M.E., Iacobuzio-Donahue C., Olive K.P., Stanger B.Z. // *Cancer Cell* – 2014. – T. 25 – № 6 – C.735–747.
117. Pourfarhangi K.E. ECM Cross-Linking Regulates Invadopodia Dynamics / Pourfarhangi K.E., Bergman A., Gligorijevic B. // *Biophysical Journal* – 2018. – T. 114 – № 6 – C.1455–1466.
118. Page-McCaw A. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling / Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* – 2007. – T. 8 – № 3 – C.221–233.
119. Yang B. Matrix metalloproteinase-9 overexpression is closely related to poor prognosis in patients with colon cancer / Yang B., Tang F., Zhang B., Zhao Y., Feng J., Rao Z. // *World Journal of Surgical Oncology* – 2014. – T. 12 – C.24.
120. Ren F. Overexpression of MMP Family Members Functions as Prognostic Biomarker for Breast Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis / Ren F., Tang R., Zhang X., Madushi W.M., Luo D., Dang Y., Li Z., Wei K., Chen G. // *PloS One* – 2015. – T. 10 – № 8 – C.e0135544.
121. Vincent T.L. FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer / Vincent T.L., McLean C.J., Full L.E., Peston D., Saklatvala J. // *Osteoarthritis and Cartilage* – 2007. – T. 15 – № 7 – C.752–763.
122. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship / Hinz B. // *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* – 2015. – T. 47 – C.54–65.
123. Liu J. TGF- β blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma by normalizing the tumor stroma / Liu J., Liao S., Diop-Frimpong B., Chen W., Goel S., Naxerova K., Ancukiewicz M., Boucher Y., Jain R.K., Xu L. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2012. – T. 109 – № 41 – C.16618–16623.
124. Fons P. Tumor vasculature is regulated by FGF/FGFR signaling-mediated angiogenesis and bone marrow-derived cell recruitment: this mechanism is inhibited by SSR128129E, the first allosteric antagonist of FGFRs / Fons P., Gueguen-Dorbes G., Herault J.-P., Geronimi F., Tuyaret J., Frédérique D., Schaeffer P., Volle-Challier C., Herbert J.-M., Bono F. // *Journal of Cellular Physiology* – 2015. – T. 230 – № 1 – C.43–51.
125. Gordon-Weeks A.N. Neutrophils promote hepatic metastasis growth through fibroblast growth factor 2-dependent angiogenesis in mice / 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. // *Hepatology (Baltimore, Md.)* – 2017. – T. 65 – № 6 – C.1920–1935.

126. Lu P. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease / Lu P., Takai K., Weaver V.M., Werb Z. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* – 2011. – T. 3 – № 12 – C.a005058.
127. Paszek M.J. Tensional homeostasis and the malignant phenotype / Paszek M.J., Zahir N., Johnson K.R., Lakins J.N., Rozenberg G.I., Gefen A., Reinhart-King C.A., Margulies S.S., Dembo M., Boettiger D., Hammer D.A., Weaver V.M. // *Cancer Cell* – 2005. – T. 8 – № 3 – C.241–254.
128. Richter P. IICS de novo glycosylated fibronectin as a marker for invasiveness in urothelial carcinoma of the urinary bladder (UBC) / Richter P., Junker K., Franz M., Berndt A., Geyer C., Gajda M., Kosmehl H., Berndt A., Wunderlich H. // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* – 2008. – T. 134 – № 10 – C.1059–1065.
129. Yuzhalin A.E. Colorectal cancer liver metastatic growth depends on PAD4-driven citrullination of the extracellular matrix / Yuzhalin A.E., Gordon-Weeks A.N., Tognoli M.L., Jones K., Markelc B., Konietzny R., Fischer R., Muth A., O'Neill E., Thompson P.R., Venables P.J., Kessler B.M., Lim S.Y., Muschel R.J. // *Nature Communications* – 2018. – T. 9 – № 1 – C.4783.
130. Guido C. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF- β drives tumor growth: connecting TGF- β signaling with «Warburg-like» cancer metabolism and L-lactate production / Guido C., Whitaker-Menezes D., Capparelli C., Balliet R., Lin Z., Pestell R.G., Howell A., Aquila S., Andò S., Martinez-Outschoorn U., Sotgia F., Lisanti M.P. // *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* – 2012. – T. 11 – № 16 – C.3019–3035.
131. Rieder F. The gut microbiome in intestinal fibrosis: environmental protector or provocateur? / Rieder F. // *Science Translational Medicine* – 2013. – T. 5 – № 190 – C.190ps10.
132. Garrett W.S. Cancer and the microbiota / Garrett W.S. // *Science (New York, N.Y.)* – 2015. – T. 348 – № 6230 – C.80–86.
133. Ricard-Blum S. Proteases decode the extracellular matrix cryptome / Ricard-Blum S., Vallet S.D. // *Biochimie* – 2016. – T. 122 – C.300–313.
134. Ricard-Blum S. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans / Ricard-Blum S., Ballut L. // *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* – 2011. – T. 16 – № 2 – C.674–697.
135. Boosani C.S. Proteolytically Derived Endogenous Angiointerceptors Originating from the Extracellular Matrix / Boosani C.S., Sudhakar Y.A. // *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* – 2011. – T. 4 – № 12 – C.1551–1577.
136. Monboisse J.C. Matrikines from basement membrane collagens: a new anti-cancer strategy / Monboisse J.C., Oudart J.B., Ramont L., Brassart-Pasco S., Maquart F.X. // *Biochimica Et Biophysica Acta* – 2014. – T. 1840 – № 8 – C.2589–2598.
137. Wang J. [Results of randomized, multicenter, double-blind phase III trial of rh-endostatin (YH-16) in treatment of advanced non-small cell lung cancer patients] / Wang J., Sun Y., Liu Y., Yu Q., Zhang Y., Li K., Zhu Y., Zhou Q., Hou M., Guan Z., Li W., Zhuang W., Wang D., Liang H., Qin F., Lu H., Liu X., Sun H., Zhang Y., Wang J., Luo S., Yang R., Tu Y., Wang X., Song S., Zhou J., You L., Wang J., Yao C. // *Zhongguo Fei Ai Za Zhi = Chinese Journal of Lung Cancer* – 2005. – T. 8 – № 4 – C.283–290.
138. Zhao J. A pilot study of combination intraperitoneal recombinant human endostatin and chemotherapy for refractory malignant ascites secondary to ovarian cancer / Zhao J., Chen X., Zhang

- A., Xu F., Hu M., Xie C., Xue S. // *Medical Oncology* (Northwood, London, England) – 2014. – T. 31 – № 4 – C.930.
139. Hellerbrand C. Hepatic stellate cells--the pericytes in the liver / Hellerbrand C. // *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* – 2013. – T. 465 – № 6 – C.775–778.
140. Enzan H. Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells / Enzan H., Himeno H., Hiroi M., Kiyoku H., Saibara T., Onishi S. // *Microscopy Research and Technique* – 1997. – T. 39 – № 4 – C.336–349.
141. Hendriks H.F. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver / Hendriks H.F., Verhoofstad W.A., Brouwer A., Leeuw A.M. de, Knook D.L. // *Experimental Cell Research* – 1985. – T. 160 – № 1 – C.138–149.
142. Bataller R. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells / Bataller R., Ginès P., Nicolás J.M., Görbig M.N., Garcia-Ramallo E., Gasull X., Bosch J., Arroyo V., Rodés J. // *Gastroenterology* – 2000. – T. 118 – № 6 – C.1149–1156.
143. Pinzani M. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells / Pinzani M., Milani S., De Franco R., Grappone C., Caligiuri A., Gentilini A., Tosti-Guerra C., Maggi M., Failli P., Ruocco C., Gentilini P. // *Gastroenterology* – 1996. – T. 110 – № 2 – C.534–548.
144. Kordes C. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells / Kordes C., Sawitza I., Müller-Marbach A., Ale-Agha N., Keitel V., Klonowski-Stumpe H., Häussinger D. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2007. – T. 352 – № 2 – C.410–417.
145. Niki T. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells / Niki T., Pekny M., Hellemans K., Bleser P.D., Berg K.V., Vaeyens F., Quartier E., Schuit F., Geerts A. // *Hepatology* (Baltimore, Md.) – 1999. – T. 29 – № 2 – C.520–527.
146. Yang L. Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers / Yang L., Jung Y., Omenetti A., Witek R.P., Choi S., Vandongen H.M., Huang J., Alpini G.D., Diehl A.M. // *Stem Cells* (Dayton, Ohio) – 2008. – T. 26 – № 8 – C.2104–2113.
147. Sawitza I. The niche of stellate cells within rat liver / Sawitza I., Kordes C., Reister S., Häussinger D. // *Hepatology* (Baltimore, Md.) – 2009. – T. 50 – № 5 – C.1617–1624.
148. Iredale J.P. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors / Iredale J.P., Benyon R.C., Pickering J., McCullen M., Northrop M., Pawley S., Hovell C., Arthur M.J. // *The Journal of Clinical Investigation* – 1998. – T. 102 – № 3 – C.538–549.
149. Vidal-Vanaclocha F. The prometastatic microenvironment of the liver / Vidal-Vanaclocha F. // *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society* – 2008. – T. 1 – № 1 – C.113–129.
150. Amann T. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma / Amann T., Bataille F., Spruss T., Mühlbauer M., Gäbele E., Schölmerich J., Kiefer P., Bosserhoff A.-K., Hellerbrand C. // *Cancer Science* – 2009. – T. 100 – № 4 – C.646–653.

151. Okabe H. Hepatic stellate cells accelerate the malignant behavior of cholangiocarcinoma cells / Okabe H., Beppu T., Hayashi H., Ishiko T., Masuda T., Otao R., Horlad H., Jono H., Ueda M., Shinriki S., Ando Y., Baba H. // *Annals of Surgical Oncology* – 2011. – T. 18 – № 4 – C.1175–1184.
152. Ju M.-J. Peritumoral activated hepatic stellate cells predict poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma after curative resection / Ju M.-J., Qiu S.-J., Fan J., Xiao Y.-S., Gao Q., Zhou J., Li Y.-W., Tang Z.-Y. // *American Journal of Clinical Pathology* – 2009. – T. 131 – № 4 – C.498–510.
153. Shimizu S. In vivo and in vitro interactions between human colon carcinoma cells and hepatic stellate cells / Shimizu S., Yamada N., Sawada T., Ikeda K., Kawada N., Seki S., Kaneda K., Hirakawa K. // *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* – 2000. – T. 91 – № 12 – C.1285–1295.
154. Matsusue R. Hepatic stellate cells promote liver metastasis of colon cancer cells by the action of SDF-1/CXCR4 axis / Matsusue R., Kubo H., Hisamori S., Okoshi K., Takagi H., Hida K., Nakano K., Itami A., Kawada K., Nagayama S., Sakai Y. // *Annals of Surgical Oncology* – 2009. – T. 16 – № 9 – C.2645–2653.
155. Levental K.R. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling / Levental K.R., Yu H., Kass L., Lakins J.N., Egeblad M., Erler J.T., Fong S.F.T., Csiszar K., Giaccia A., Weninger W., Yamauchi M., Gasser D.L., Weaver V.M. // *Cell* – 2009. – T. 139 – № 5 – C.891–906.
156. Musso O. In situ detection of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) and the metalloproteinase inhibitor TIMP2 transcripts in human primary hepatocellular carcinoma and in liver metastasis / Musso O., Théret N., Campion J.P., Turlin B., Milani S., Grappone C., Clément B. // *Journal of Hepatology* – 1997. – T. 26 – № 3 – C.593–605.
157. Brooks P.C. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3 / Brooks P.C., Strömblad S., Sanders L.C., Schalscha T.L. von, Aimes R.T., Stetler-Stevenson W.G., Quigley J.P., Cheresch D.A. // *Cell* – 1996. – T. 85 – № 5 – C.683–693.
158. Lo A. Tumor-Promoting Desmoplasia Is Disrupted by Depleting FAP-Expressing Stromal Cells / Lo A., Wang L.-C.S., Scholler J., Monslow J., Avery D., Newick K., O'Brien S., Evans R.A., Bajor D.J., Clendenin C., Durham A.C., Buza E.L., Vonderheide R.H., June C.H., Albelda S.M., Puré E. // *Cancer Research* – 2015. – T. 75 – № 14 – C.2800–2810.
159. Zhang Y. Depletion of FAP+ cells reduces immunosuppressive cells and improves metabolism and functions CD8+T cells within tumors / Zhang Y., Ertl H.C.J. // *Oncotarget* – 2016. – T. 7 – № 17 – C.23282–23299.
160. Narra K. Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer / Narra K., Mullins S.R., Lee H.-O., Strzemkowski-Brun B., Magalong K., Christiansen V.J., McKee P.A., Egleston B., Cohen S.J., Weiner L.M., Meropol N.J., Cheng J.D. // *Cancer Biology & Therapy* – 2007. – T. 6 – № 11 – C.1691–1699.
161. Kieffer Y. Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer / Kieffer Y., Hocine H.R., Gentric G., Pelon F., Bernard C., Bourachot B., Lameiras S., Albergante L., Bonneau C., Guyard A., Tarte K., Zinovyev A., Baulande S., Zalcmán G., Vincent-Salomon A., Mechta-Grigoriou F. // *Cancer Discovery* – 2020. – T. 10 – № 9 – C.1330–1351.

162. Allen N.J. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions / Allen N.J., Eroglu C. // *Neuron* – 2017. – T. 96 – № 3 – C.697–708.
163. Gorina Y.V. Astrocyte Activation Markers / Gorina Y.V., Salmina A.B., Erofeev A.I., Gerasimov E.I., Bolshakova A.V., Balaban P.M., Bezprozvanny I.B., Vlasova O.L. // *Biochemistry. Biokhimiia* – 2022. – T. 87 – № 9 – C.851–870.
164. Matusova Z. Reactive astrogliosis in the era of single-cell transcriptomics / Matusova Z., Hol E.M., Pekny M., Kubista M., Valihrach L. // *Frontiers in Cellular Neuroscience* – 2023. – T. 17 – C.1173200.
165. Wirsching H.-G. Glioblastoma / Wirsching H.-G., Galanis E., Weller M. // *Handbook of Clinical Neurology* – 2016. – T. 134 – C.381–397.
166. Le Rhun E. Molecular targeted therapy of glioblastoma / Le Rhun E., Preusser M., Roth P., Reardon D.A., Bent M. van den, Wen P., Reifenberger G., Weller M. // *Cancer Treatment Reviews* – 2019. – T. 80 – C.101896.
167. Zhang J. Macrophage phenotype-switching in cancer / Zhang J., Zhou X., Hao H. // *European Journal of Pharmacology* – 2022. – T. 931 – C.175229.
168. Mantovani A. Macrophage diversity in cancer dissemination and metastasis / Mantovani A., Marchesi F., Di Mitri D., Garlanda C. // *Cellular & Molecular Immunology* – 2024. – T. 21 – № 11 – C.1201–1214.
169. Chu X. Decoding the spatiotemporal heterogeneity of tumor-associated macrophages / Chu X., Tian Y., Lv C. // *Molecular Cancer* – 2024. – T. 23 – № 1 – C.150.
170. Hedrick C.C. Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted / Hedrick C.C., Malanchi I. // *Nature Reviews. Immunology* – 2022. – T. 22 – № 3 – C.173–187.
171. Palucka K. Cancer immunotherapy via dendritic cells / Palucka K., Banchereau J. // *Nature Reviews. Cancer* – 2012. – T. 12 – № 4 – C.265–277.
172. Shan F. Therapeutic targeting of regulatory T cells in cancer / Shan F., Somasundaram A., Bruno T.C., Workman C.J., Vignali D.A.A. // *Trends in Cancer* – 2022. – T. 8 – № 11 – C.944–961.
173. Engelhard V. B cells and cancer / Engelhard V., Conejo-Garcia J.R., Ahmed R., Nelson B.H., Willard-Gallo K., Bruno T.C., Fridman W.H. // *Cancer Cell* – 2021. – T. 39 – № 10 – C.1293–1296.
174. Cantoni C. Human NK cells and cancer / Cantoni C., Falco M., Vitale M., Pietra G., Munari E., Pende D., Mingari M.C., Sileri S., Moretta L. // *Oncoimmunology* – 2024. – T. 13 – № 1 – C.2378520.
175. Chiaro J. Development of mesothelioma-specific oncolytic immunotherapy enabled by immunopeptidomics of murine and human mesothelioma tumors / Chiaro J., Antignani G., Feola S., Feodoroff M., Martins B., Cojoc H., Russo S., Fucciello M., Hamdan F., Ferrari V., Ciampi D., Ilonen I., Räsänen J., Mäyränpää M., Partanen J., Koskela S., Honkanen J., Halonen J., Kuryk L., Rescigno M., Grönholm M., Branca R.M., Lehtiö J., Cerullo V. // *Nature Communications* – 2023. – T. 14 – № 1 – C.7056.

176. Lang F. Identification of neoantigens for individualized therapeutic cancer vaccines / Lang F., Schrörs B., Löwer M., Türeci Ö., Sahin U. // *Nature Reviews. Drug Discovery* – 2022. – T. 21 – № 4 – C.261–282.
177. Yuan X. Vitamin E Enhances Cancer Immunotherapy by Reinvigorating Dendritic Cells via Targeting Checkpoint SHP1 / 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. // *Cancer Discovery* – 2022. – T. 12 – № 7 – C.1742–1759.
178. Blum J.S. Pathways of antigen processing / Blum J.S., Wearsch P.A., Cresswell P. // *Annual Review of Immunology* – 2013. – T. 31 – C.443–473.
179. Schumacher T.N. Neoantigens in cancer immunotherapy / Schumacher T.N., Schreiber R.D. // *Science (New York, N.Y.)* – 2015. – T. 348 – № 6230 – C.69–74.
180. Garrido F. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy / Garrido F., Aptsiauri N., Doorduijn E.M., Garcia Lora A.M., Hall T. van // *Current Opinion in Immunology* – 2016. – T. 39 – C.44–51.
181. Burr M.L. An Evolutionarily Conserved Function of Polycomb Silences the MHC Class I Antigen Presentation Pathway and Enables Immune Evasion in Cancer / Burr M.L., Sparbier C.E., Chan K.L., Chan Y.-C., Kersbergen A., Lam E.Y.N., Azidis-Yates E., Vassiliadis D., Bell C.C., Gilan O., Jackson S., Tan L., Wong S.Q., Hollizeck S., Michalak E.M., Siddle H.V., McCabe M.T., Prinjha R.K., Guerra G.R., Solomon B.J., Sandhu S., Dawson S.-J., Beavis P.A., Tothill R.W., Cullinane C., Lehner P.J., Sutherland K.D., Dawson M.A. // *Cancer Cell* – 2019. – T. 36 – № 4 – C.385- 401.e8.
182. Fan F. A Dual PI3K/HDAC Inhibitor Induces Immunogenic Ferroptosis to Potentiate Cancer Immune Checkpoint Therapy / Fan F., Liu P., Bao R., Chen J., Zhou M., Mo Z., Ma Y., Liu H., Zhou Y., Cai X., Qian C., Liu X. // *Cancer Research* – 2021. – T. 81 – № 24 – C.6233–6245.
183. Mari L. microRNA 125a Regulates MHC-I Expression on Esophageal Adenocarcinoma Cells, Associated With Suppression of Antitumor Immune Response and Poor Outcomes of Patients / Mari L., Hoefnagel S.J.M., Zito D., Meent M. van de, Endert P. van, Calpe S., Sancho Serra M.D.C., Heemskerk M.H.M., Laarhoven H.W.M. van, Hulshof M.C.C.M., Gisbertz S.S., Medema J.P., Berge Henegouwen M.I. van, Meijer S.L., Bergman J.J.G.H.M., Milano F., Krishnadath K.K. // *Gastroenterology* – 2018. – T. 155 – № 3 – C.784–798.
184. Sun X. Targeted demethylation and activation of NLRC5 augment cancer immunogenicity through MHC class I / Sun X., Watanabe T., Oda Y., Shen W., Ahmad A., Ouda R., Figueiredo P. de, Kitamura H., Tanaka S., Kobayashi K.S. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2024. – T. 121 – № 6 – C.e2310821121.
185. Kim Y. Immune Checkpoint Blockade Augments Changes Within Oncolytic Virus-induced Cancer MHC-I Peptidome, Creating Novel Antitumor CD8 T Cell Reactivities / Kim Y., Konda P., Murphy J.P., Paulo J.A., Gygi S.P., Gujar S. // *Molecular & cellular proteomics: MCP* – 2022. – T. 21 – № 2 – C.100182.
186. Murphy J.P. Therapy-Induced MHC I Ligands Shape Neo-Antitumor CD8 T Cell Responses during Oncolytic Virus-Based Cancer Immunotherapy / Murphy J.P., Kim Y., Clements D.R., Konda P., Schuster H., Kowalewski D.J., Paulo J.A., Cohen A.M., Stevanovic S., Gygi S.P., Gujar S. // *Journal of Proteome Research* – 2019. – T. 18 – № 6 – C.2666–2675.

187. Garzia L. Astrocytes are enablers of brain metastases / Garzia L. // *Nature Cell Biology* – 2024. – T. 26 – № 10 – C.1632–1633.
188. Boire A. Brain metastasis / Boire A., Brastianos P.K., Garzia L., Valiente M. // *Nature Reviews. Cancer* – 2020. – T. 20 – № 1 – C.4–11.
189. Friedl P. CD4⁺ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion / Friedl P., Entschladen F., Conrad C., Niggemann B., Zänker K.S. // *European Journal of Immunology* – 1998. – T. 28 – № 8 – C.2331–2343.
190. Hallmann R. The regulation of immune cell trafficking by the extracellular matrix / Hallmann R., Zhang X., Di Russo J., Li L., Song J., Hannocks M.-J., Sorokin L. // *Current Opinion in Cell Biology* – 2015. – T. 36 – C.54–61.
191. Wolf K. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force / Wolf K., Te Lindert M., Krause M., Alexander S., Te Riet J., Willis A.L., Hoffman R.M., Figdor C.G., Weiss S.J., Friedl P. // *The Journal of Cell Biology* – 2013. – T. 201 – № 7 – C.1069–1084.
192. Lämmermann T. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing / Lämmermann T., Bader B.L., Monkley S.J., Worbs T., Wedlich-Söldner R., Hirsch K., Keller M., Förster R., Critchley D.R., Fässler R., Sixt M. // *Nature* – 2008. – T. 453 – № 7191 – C.51–55.
193. Sadjadi Z. Migration of Cytotoxic T Lymphocytes in 3D Collagen Matrices / Sadjadi Z., Zhao R., Hoth M., Qu B., Rieger H. // *Biophysical Journal* – 2020. – T. 119 – № 11 – C.2141–2152.
194. Pruitt H.C. Collagen fiber structure guides 3D motility of cytotoxic T lymphocytes / Pruitt H.C., Lewis D., Ciccaglione M., Connor S., Smith Q., Hickey J.W., Schneck J.P., Gerecht S. // *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* – 2020. – T. 85–86 – C.147–159.
195. Bajénoff M. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes / Bajénoff M., Egen J.G., Koo L.Y., Laugier J.P., Brau F., Glaichenhaus N., Germain R.N. // *Immunity* – 2006. – T. 25 – № 6 – C.989–1001.
196. Boissonnas A. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor / Boissonnas A., Fetler L., Zeelenberg I.S., Hugues S., Amigorena S. // *The Journal of Experimental Medicine* – 2007. – T. 204 – № 2 – C.345–356.
197. Huleihel L. Macrophage phenotype in response to ECM bioscaffolds / Huleihel L., Dziki J.L., Bartolacci J.G., Rausch T., Scarritt M.E., Cramer M.C., Vorobyov T., LoPresti S.T., Swineheart I.T., White L.J., Brown B.N., Badylak S.F. // *Seminars in Immunology* – 2017. – T. 29 – C.2–13.
198. Dziki J.L. Solubilized extracellular matrix bioscaffolds derived from diverse source tissues differentially influence macrophage phenotype / Dziki J.L., Wang D.S., Pineda C., Sicari B.M., Rausch T., Badylak S.F. // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* – 2017. – T. 105 – № 1 – C.138–147.
199. Sicari B.M. The promotion of a constructive macrophage phenotype by solubilized extracellular matrix / Sicari B.M., Dziki J.L., Siu B.F., Medberry C.J., Dearth C.L., Badylak S.F. // *Biomaterials* – 2014. – T. 35 – № 30 – C.8605–8612.

200. He C. ADM Scaffolds Generate a Pro-regenerative Microenvironment During Full-Thickness Cutaneous Wound Healing Through M2 Macrophage Polarization via Lamtor1 / He C., Yang Z., Jin Y., Qi X., Chu J., Deng X. // *Frontiers in Physiology* – 2018. – T. 9 – C.657.
201. Kuczek D.E. Collagen density regulates the activity of tumor-infiltrating T cells / Kuczek D.E., Larsen A.M.H., Thorseth M.-L., Carretta M., Kalvisa A., Siersbæk M.S., Simões A.M.C., Roslind A., Engelholm L.H., Noessner E., Donia M., Svane I.M., Straten P.T., Grøntved L., Madsen D.H. // *Journal for Immunotherapy of Cancer* – 2019. – T. 7 – № 1 – C.68.
202. Hope C. Versican-Derived Matrikines Regulate Batf3-Dendritic Cell Differentiation and Promote T Cell Infiltration in Colorectal Cancer / Hope C., Emmerich P.B., Papadas A., Pagenkopf A., Matkowskyj K.A., Van De Hey D.R., Payne S.N., Clipson L., Callander N.S., Hematti P., Miyamoto S., Johnson M.G., Deming D.A., Asimakopoulos F. // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* – 2017. – T. 199 – № 5 – C.1933–1941.
203. Papadas A. Versican in the Tumor Microenvironment / Papadas A., Asimakopoulos F. // *Advances in Experimental Medicine and Biology* – 2020. – T. 1272 – C.55–72.
204. Castello L.M. Osteopontin at the Crossroads of Inflammation and Tumor Progression / Castello L.M., Raineri D., Salmi L., Clemente N., Vaschetto R., Quaglia M., Garzaro M., Gentili S., Navalesi P., Cantaluppi V., Dianzani U., Aspesi A., Chiocchetti A. // *Mediators of Inflammation* – 2017. – T. 2017 – C.4049098.
205. Yuzhalin A.E. A core matrisome gene signature predicts cancer outcome / Yuzhalin A.E., Urbonas T., Silva M.A., Muschel R.J., Gordon-Weeks A.N. // *British Journal of Cancer* – 2018. – T. 118 – № 3 – C.435–440.
206. Klement J.D. An osteopontin/CD44 immune checkpoint controls CD8+ T cell activation and tumor immune evasion / Klement J.D., Paschall A.V., Redd P.S., Ibrahim M.L., Lu C., Yang D., Celis E., Abrams S.I., Ozato K., Liu K. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2018. – T. 128 – № 12 – C.5549–5560.
207. Jachetti E. Tenascin-C Protects Cancer Stem-like Cells from Immune Surveillance by Arresting T-cell Activation / Jachetti E., Caputo S., Mazzoleni S., Brambillasca C.S., Parigi S.M., Grioni M., Piras I.S., Restuccia U., Calcinotto A., Freschi M., Bachi A., Galli R., Bellone M. // *Cancer Research* – 2015. – T. 75 – № 10 – C.2095–2108.
208. Mirzaei R. Brain tumor-initiating cells export tenascin-C associated with exosomes to suppress T cell activity / Mirzaei R., Sarkar S., Dzikowski L., Rawji K.S., Khan L., Faissner A., Bose P., Yong V.W. // *Oncoimmunology* – 2018. – T. 7 – № 10 – C.e1478647.
209. Wang W. Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack / Wang W., Guo H., Geng J., Zheng X., Wei H., Sun R., Tian Z. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2014. – T. 289 – № 48 – C.33311–33319.
210. Golden-Mason L. Galectin-9 functionally impairs natural killer cells in humans and mice / Golden-Mason L., McMahan R.H., Strong M., Reisdorph R., Mahaffey S., Palmer B.E., Cheng L., Kulesza C., Hirashima M., Niki T., Rosen H.R. // *Journal of Virology* – 2013. – T. 87 – № 9 – C.4835–4845.
211. Yang L. The critical role of tumor microbiome in cancer immunotherapy / Yang L., Wang Q., He L., Sun X. // *Cancer Biology & Therapy* – 2024. – T. 25 – № 1 – C.2301801.

212. Richards J. Microbiome-mediated immune modulation in tumor microenvironment / Richards J., Davis E.L., Shakila L., Narayanan J., Aggarwal S., Mishra A., Venkata K.K.M., Walther B.K., Dominic A. // *International Review of Cell and Molecular Biology* – 2025. – T. 394 – C.107–145.
213. Elkrif A. The gut microbiome as a target in cancer immunotherapy: opportunities and challenges for drug development / Elkrif A., Pidgeon R., Maleki Vareki S., Messaoudene M., Castagner B., Routy B. // *Nature Reviews. Drug Discovery* – 2025. – T. 24 – № 9 – C.685–704.
214. Herrera-Quintana L. Breast Cancer: Extracellular Matrix and Microbiome Interactions / Herrera-Quintana L., Vázquez-Lorente H., Plaza-Díaz J. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2024. – T. 25 – № 13 – C.7226.
215. Chen Y. The Role of The Tumor Microbiome in Tumor Development and Its Treatment / Chen Y., Wu F.-H., Wu P.-Q., Xing H.-Y., Ma T. // *Frontiers in Immunology* – 2022. – T. 13 – C.935846.
216. Suraya R. Microbiome as a Target for Cancer Therapy / Suraya R., Nagano T., Kobayashi K., Nishimura Y. // *Integrative Cancer Therapies* – 2020. – T. 19 – C.1534735420920721.
217. Henke E. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy / Henke E., Nandigama R., Ergün S. // *Frontiers in Molecular Biosciences* – 2019. – T. 6 – C.160.
218. Zhang M. Extracellular matrix stiffness: mechanisms in tumor progression and therapeutic potential in cancer / Zhang M., Zhang B. // *Experimental Hematology & Oncology* – 2025. – T. 14 – № 1 – C.54.
219. Gordon-Weeks A. Cancer Extracellular Matrix Proteins Regulate Tumour Immunity / Gordon-Weeks A., Yuzhalin A.E. // *Cancers* – 2020. – T. 12 – № 11 – C.3331.
220. Lin N.Y.-T. Microbiota-driven antitumour immunity mediated by dendritic cell migration / Lin N.Y.-T., Fukuoka S., Koyama S., Motooka D., Turlousse D.M., Shigeno Y., Matsumoto Y., Yamano H., Murotomi K., Tamaki H., Irie T., Sugiyama E., Kumagai S., Itahashi K., Tanegashima T., Fujimaki K., Ito S., Shindo M., Tsuji T., Wake H., Watanabe K., Maeda Y., Enokida T., Tahara M., Yamashita R., Fujisawa T., Nomura M., Kawazoe A., Goto K., Doi T., Shitara K., Mano H., Sekiguchi Y., Nakamura S., Benno Y., Nishikawa H. // *Nature* – 2025. – T. 644 – № 8078 – C.1058–1068.
221. Ciernikova S. Tumor microbiome - an integral part of the tumor microenvironment / Ciernikova S., Sevcikova A., Stevurkova V., Mego M. // *Frontiers in Oncology* – 2022. – T. 12 – C.1063100.
222. Zhang C. Intracarotid Cancer Cell Injection to Produce Mouse Models of Brain Metastasis / Zhang C., Lowery F.J., Yu D. // *Journal of Visualized Experiments: JoVE* – 2017. – № 120 – C.55085.
223. Sagiv J.Y. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer / Sagiv J.Y., Michaeli J., Assi S., Mishalian I., Kisos H., Levy L., Damti P., Lumbroso D., Polyansky L., Sionov R.V., Ariel A., Hovav A.-H., Henke E., Fridlender Z.G., Granot Z. // *Cell Reports* – 2015. – T. 10 – № 4 – C.562–573.
224. Storey J.D. Statistical significance for genomewide studies / Storey J.D., Tibshirani R. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2003. – T. 100 – № 16 – C.9440–9445.
225. Heberle H. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams / Heberle H., Meirelles G.V., Silva F.R. da, Telles G.P., Minghim R. // *BMC bioinformatics* – 2015. – T. 16 – № 1 – C.169.

226. Li Q. Jetset: selecting the optimal microarray probe set to represent a gene / Li Q., Birkbak N.J., Györfy B., Szallasi Z., Eklund A.C. // BMC bioinformatics – 2011. – T. 12 – C.474.
227. Varešlija D. Transcriptome Characterization of Matched Primary Breast and Brain Metastatic Tumors to Detect Novel Actionable Targets / Varešlija D., Friedigkeit N., Fagan A., Purcell S., Cosgrove N., O'Halloran P.J., Ward E., Cocchiglia S., Hartmaier R., Castro C.A., Zhu L., Tseng G.C., Lucas P.C., Puhalla S.L., Brufsky A.M., Hamilton R.L., Mathew A., Leone J.P., Basudan A., Hudson L., Dwyer R., Das S., O'Connor D.P., Buckley P.G., Farrell M., Hill A.D.K., Oesterreich S., Lee A.V., Young L.S. // Journal of the National Cancer Institute – 2019. – T. 111 – № 4 – C.388–398.
228. Rebelo R. Fibroblasts in pancreatic cancer: molecular and clinical perspectives / Rebelo R., Xavier C.P.R., Giovannetti E., Vasconcelos M.H. // Trends in Molecular Medicine – 2023. – T. 29 – № 6 – C.439–453.
229. Shalaby S.M. The interplay between COX-2, chemotherapeutic drugs, and chemoresistance in colon cancer / Shalaby S.M., Shawky S.A., Ashour H., Sarhan W. // Scientific Reports – 2025. – T. 15 – № 1 – C.15837.
230. Liu-Chittenden Y. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD–YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP / Liu-Chittenden Y., Huang B., Shim J.S., Chen Q., Lee S.-J., Anders R.A., Liu J.O., Pan D. // Genes & Development – 2012. – T. 26 – № 12 – C.1300–1305.
231. Amanda B. The Hippo Signaling Pathway, Reactive Oxygen Species Production, and Oxidative Stress: A Two-Way Traffic Regulation / Amanda B., Pragasta R., Cakrasana H., Mustika A., Faizah Z., Oceandy D. // Cells – 2024. – T. 13 – № 22 – C.1868.
232. Tsukamoto S. Podoplanin Expression in Early-Stage Colorectal Cancer-Associated Fibroblasts and Its Utility as a Diagnostic Marker for Colorectal Lesions / Tsukamoto S., Kodama T., Nishio M., Shigeoka M., Itoh T., Yokozaki H., Koma Y.-I. // Cells – 2024. – T. 13 – № 20 – C.1682.
233. Zhao L. Recruitment of a myeloid cell subset (CD11b/Gr1 mid) via CCL2/CCR2 promotes the development of colorectal cancer liver metastasis / Zhao L., Lim S.Y., Gordon-Weeks A.N., Tapmeier T.T., Im J.H., Cao Y., Beech J., Allen D., Smart S., Muschel R.J. // Hepatology (Baltimore, Md.) – 2013. – T. 57 – № 2 – C.829–839.
234. Bindea G. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer / Bindea G., Mlecnik B., Tosolini M., Kirilovsky A., Waldner M., Obenauf A.C., Angell H., Fredriksen T., Lafontaine L., Berger A., Bruneval P., Fridman W.H., Becker C., Pagès F., Speicher M.R., Trajanoski Z., Galon J. // Immunity – 2013. – T. 39 – № 4 – C.782–795.
235. Luo M. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases / Luo M., Zhao F., Cheng H., Su M., Wang Y. // Frontiers in Immunology – 2024. – T. 15 – C.1352946.
236. Mandula J.K. Jagged2 targeting in lung cancer activates anti-tumor immunity via Notch-induced functional reprogramming of tumor-associated macrophages / Mandula J.K., Sierra-Mondragon R.A., Jimenez R.V., Chang D., Mohamed E., Chang S., Vazquez-Martinez J.A., Cao Y., Anadon C.M., Lee S.B., Das S., Rocha-Munguba L., Pham V.M., Li R., Tarhini A.A., Furqan M., Dalton W., Churchman M., Moran-Segura C.M., Nguyen J., Perez B., Kojetin D.J., Obermayer A., Yu X., Chen A., Shaw T.I., Conejo-Garcia J.R., Rodriguez P.C. // Immunity – 2024. – T. 57 – № 5 – C.1124- 1140.e9.
237. Cubillos-Ruiz J.R. ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis / Cubillos-Ruiz J.R., Silberman P.C., Rutkowski M.R., Chopra S., Perales-

- Puchalt A., Song M., Zhang S., Bettigole S.E., Gupta D., Holcomb K., Ellenson L.H., Caputo T., Lee A.-H., Conejo-Garcia J.R., Glimcher L.H. // *Cell* – 2015. – T. 161 – № 7 – C.1527–1538.
238. Wculek S.K. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy / Wculek S.K., Cueto F.J., Mujal A.M., Melero I., Krummel M.F., Sancho D. // *Nature Reviews. Immunology* – 2020. – T. 20 – № 1 – C.7–24.
239. Kantor E.D. Trends in Dietary Supplement Use Among US Adults From 1999-2012 / Kantor E.D., Rehm C.D., Du M., White E., Giovannucci E.L. // *JAMA* – 2016. – T. 316 – № 14 – C.1464–1474.
240. Du M. Dietary Supplement Use among Adult Cancer Survivors in the United States / Du M., Luo H., Blumberg J.B., Rogers G., Chen F., Ruan M., Shan Z., Biever E., Zhang F.F. // *The Journal of Nutrition* – 2020. – T. 150 – № 6 – C.1499–1508.
241. Tajan M. Dietary Approaches to Cancer Therapy / Tajan M., Vousden K.H. // *Cancer Cell* – 2020. – T. 37 – № 6 – C.767–785.
242. Jordan S. Dietary Intake Regulates the Circulating Inflammatory Monocyte Pool / Jordan S., Tung N., Casanova-Acebes M., Chang C., Cantoni C., Zhang D., Wirtz T.H., Naik S., Rose S.A., Brocker C.N., Gainullina A., Hornburg D., Horng S., Maier B.B., Cravedi P., LeRoith D., Gonzalez F.J., Meissner F., Ochando J., Rahman A., Chipuk J.E., Artyomov M.N., Frenette P.S., Piccio L., Berres M.-L., Gallagher E.J., Merad M. // *Cell* – 2019. – T. 178 – № 5 – C.1102- 1114.e17.
243. Nemunaitis J. Vaccines in cancer: GVAX, a GM-CSF gene vaccine / Nemunaitis J. // *Expert Review of Vaccines* – 2005. – T. 4 – № 3 – C.259–274.
244. Koenderman L. Neutrophils in cancer: from biology to therapy / Koenderman L., Vrisekoop N. // *Cellular and Molecular Immunology* – 2025. – T. 22 – № 1 – C.4–23.
245. Hiratsuka S. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis / Hiratsuka S., Watanabe A., Aburatani H., Maru Y. // *Nature Cell Biology* – 2006. – T. 8 – № 12 – C.1369–1375.
246. Massena S. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans / Massena S., Christoffersson G., Vågesjö E., Seignez C., Gustafsson K., Binet F., Herrera Hidalgo C., Giraud A., Lomei J., Weström S., Shibuya M., Claesson-Welsh L., Gerwins P., Welsh M., Kreuger J., Phillipson M. // *Blood* – 2015. – T. 126 – № 17 – C.2016–2026.
247. Wang L. A novel monoclonal antibody to fibroblast growth factor 2 effectively inhibits growth of hepatocellular carcinoma xenografts / Wang L., Park H., Chhim S., Ding Y., Jiang W., Queen C., Kim K.J. // *Molecular Cancer Therapeutics* – 2012. – T. 11 – № 4 – C.864–872.
248. Goel S. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases / Goel S., Duda D.G., Xu L., Munn L.L., Boucher Y., Fukumura D., Jain R.K. // *Physiological Reviews* – 2011. – T. 91 – № 3 – C.1071–1121.
249. Presta M. Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2-induced angiogenesis / Presta M., Andrés G., Leali D., Dell’Era P., Ronca R. // *European Cytokine Network* – 2009. – T. 20 – № 2 – C.39–50.

250. Waleh N.S. Mapping of the vascular endothelial growth factor-producing hypoxic cells in multicellular tumor spheroids using a hypoxia-specific marker / Waleh N.S., Brody M.D., Knapp M.A., Mendonca H.L., Lord E.M., Koch C.J., Laderoute K.R., Sutherland R.M. // *Cancer Research* – 1995. – T. 55 – № 24 – C.6222–6226.
251. Liu J. Effect of CDK4/6 Inhibitors on Tumor Immune Microenvironment / Liu J., Cheng M., Xu J., Liang Y., Yin B., Liang J. // *Immunological Investigations* – 2024. – T. 53 – № 3 – C.437–449.
252. Smyth L.C.D. Redefining CNS immune privilege / Smyth L.C.D., Kipnis J. // *Nature Reviews. Immunology* – 2025. – T. 25 – № 10 – C.766–775.
253. Jin M. PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade in breast cancer: research insights and sensitization strategies / Jin M., Fang J., Peng J., Wang X., Xing P., Jia K., Hu J., Wang D., Ding Y., Wang X., Li W., Chen Z. // *Molecular Cancer* – 2024. – T. 23 – № 1 – C.266.
254. Sexton R.E. Connecting the Human Microbiome and Pancreatic Cancer / Sexton R.E., Uddin M.H., Bannoura S., Khan H.Y., Mzannar Y., Li Y., Aboukameel A., Al-Hallak M.N., Al-Share B., Mohamed A., Nagasaka M., El-Rayes B., Azmi A.S. // *Cancer Metastasis Reviews* – 2022. – T. 41 – № 2 – C.317–331.
255. Ross F.C. The interplay between diet and the gut microbiome: implications for health and disease / Ross F.C., Patangia D., Grimaud G., Lavelle A., Dempsey E.M., Ross R.P., Stanton C. // *Nature Reviews. Microbiology* – 2024. – T. 22 – № 11 – C.671–686.
256. Frati F. The Role of the Microbiome in Asthma: The Gut–Lung Axis / Frati F., Salvatori C., Incorvaia C., Bellucci A., Di Cara G., Marcucci F., Esposito S. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2018. – T. 20 – № 1 – C.123.
257. Tiew P.Y. The current understanding and future directions for sputum microbiome profiling in chronic obstructive pulmonary disease / Tiew P.Y., Mac Aogáin M., Chotirmall S.H. // *Current Opinion in Pulmonary Medicine* – 2022. – T. 28 – № 2 – C.121–133.
258. Druzhinin V.G. Bacterial effectors disrupt host DNA: Linking sputum microbiome profiles to chromosomal aberrations in leukocytes of lung cancer patients and healthy controls / Druzhinin V.G., Baranova E.D., Demenkov P.S., Matskova L.V., Larionov A.V., Zhivotovskiy A.S., Yuzhalin A.E. // *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* – 2026. – T. 911 – C.503928.
259. Druzhinin V.G. Features of the Intestinal and Respiratory Microbiome in Colorectal Cancer Patients in Western Siberia / Druzhinin V.G., Baranova E.D., Demenkov P.S., Zhivotovskiy A.S., Matskova L.V., Larionov A.V., Avdeev K.S., Yuzhalin A.E. // *Microorganisms* – 2026. – T. 14 – № 7 – C.1392.
260. Tai I.T. Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy / Tai I.T., Dai M., Owen D.A., Chen L.B. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2005. – T. 115 – № 6 – C.1492–1502.
261. Chida S. Stromal VCAN expression as a potential prognostic biomarker for disease recurrence in stage II–III colon cancer / Chida S., Okayama H., Noda M., Saito K., Nakajima T., Aoto K., Hayase S., Momma T., Ohki S., Kono K., Takenoshita S. // *Carcinogenesis* – 2016. – T. 37 – № 9 – C.878–887.
262. Komatsu K. Increased expression of S100A6 (Calcylin), a calcium-binding protein of the S100 family, in human colorectal adenocarcinomas / Komatsu K., Andoh A., Ishiguro S., Suzuki N., Hunai H., Kobune-Fujiwara Y., Kameyama M., Miyoshi J., Akedo H., Nakamura H. // *Clinical Cancer*

Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research – 2000. – T. 6 – № 1 – C.172–177.

263. Li L. The extracellular matrix glycoprotein fibrillin-1 in health and disease / Li L., Huang J., Liu Y. // *Frontiers in Cell and Developmental Biology* – 2023. – T. 11 – C.1302285.

264. Lu J. Identification of key genes regulating colorectal cancer stem cell characteristics by bioinformatics analysis / Lu J., Zhang H., Gu X., Liu Y., Zhao C., Wang X. // *Medicine* – 2025. – T. 104 – № 22 – C.e40910.

265. Jakubowska D. Influence of the Nucleo-Shuttling of the ATM Protein on the Response of Skin Fibroblasts from Marfan Syndrome to Ionizing Radiation / Jakubowska D., Al-Choboq J., Sonzogni L., Bourguignon M., Slonina D., Foray N. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2024. – T. 25 – № 22 – C.12313.

266. Li W. YAP transcriptionally regulates COX-2 expression and GCCSystm-4 (G-4), a dual YAP/COX-2 inhibitor, overcomes drug resistance in colorectal cancer / Li W., Cao Y., Xu J., Wang Y., Li W., Wang Q., Hu Z., Hao Y., Hu L., Sun Y., Xu G., Ao G. // *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* – 2017. – T. 36 – № 1 – C.144.

267. Ooki A. YAP1 and COX2 Coordinately Regulate Urothelial Cancer Stem-like Cells / Ooki A., Del Carmen Rodriguez Pena M., Marchionni L., Dinalankara W., Begum A., Hahn N.M., VandenBussche C.J., Rasheed Z.A., Mao S., Netto G.J., Sidransky D., Hoque M.O. // *Cancer Research* – 2018. – T. 78 – № 1 – C.168–181.

268. Young A. The Balancing Act between Cancer Immunity and Autoimmunity in Response to Immunotherapy / Young A., Quandt Z., Bluestone J.A. // *Cancer Immunology Research* – 2018. – T. 6 – № 12 – C.1445–1452.

269. Zhang W. Downstream of mutant KRAS, the transcription regulator YAP is essential for neoplastic progression to pancreatic ductal adenocarcinoma / Zhang W., Nandakumar N., Shi Y., Manzano M., Smith A., Graham G., Gupta S., Vietsch E.E., Laughlin S.Z., Wadhwa M., Chetram M., Joshi M., Wang F., Kallakury B., Toretsky J., Wellstein A., Yi C. // *Science Signaling* – 2014. – T. 7 – № 324 – C.ra42.

270. Ziyad S. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis / Ziyad S., Iruela-Arispe M.L. // *Genes & Cancer* – 2011. – T. 2 – № 12 – C.1085–1096.

271. Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression / Vaupel P. // *The Oncologist* – 2004. – T. 9 Suppl 5 – C.10–17.

272. Rahbari N.N. Anti-VEGF therapy induces ECM remodeling and mechanical barriers to therapy in colorectal cancer liver metastases / Rahbari N.N., Kedrin D., Incio J., Liu H., Ho W.W., Nia H.T., Edrich C.M., Jung K., Daubriac J., Chen I., Heishi T., Martin J.D., Huang Y., Maimon N., Reissfelder C., Weitz J., Boucher Y., Clark J.W., Grodzinsky A.J., Duda D.G., Jain R.K., Fukumura D. // *Science Translational Medicine* – 2016. – T. 8 – № 360 – C.360ra135.

273. Zhang X. The role of LAMA5 in breast cancer progression and its potential in immunotherapy / Zhang X., Yan H., Bie L., Xu Z., Yao X., Li Z., He C., Xiang Z., Jiang X. // *Discover Oncology* – 2025. – T. 16 – C.1387.

274. Bonnans C. Remodelling the extracellular matrix in development and disease / Bonnans C., Chou J., Werb Z. // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* – 2014. – T. 15 – № 12 – C.786–801.

275. Gentles A.J. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers / Gentles A.J., Newman A.M., Liu C.L., Bratman S.V., Feng W., Kim D., Nair V.S., Xu Y., Khuong A., Hoang C.D., Diehn M., West R.B., Plevritis S.K., Alizadeh A.A. // *Nature Medicine* – 2015. – T. 21 – № 8 – C.938–945.
276. Francoeur C. Proinflammatory cytokines TNF-alpha and IFN-gamma alter laminin expression under an apoptosis-independent mechanism in human intestinal epithelial cells / Francoeur C., Escaffit F., Vachon P.H., Beaulieu J.-F. // *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* – 2004. – T. 287 – № 3 – C.G592-598.
277. Egberts J.-H. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis / Egberts J.-H., Cloosters V., Noack A., Schniewind B., Thon L., Klose S., Kettler B., Forstner C. von, Kneitz C., Tepel J., Adam D., Wajant H., Kalthoff H., Trauzold A. // *Cancer Research* – 2008. – T. 68 – № 5 – C.1443–1450.
278. Jiao S.-F. Inhibition of tumor necrosis factor alpha reduces the outgrowth of hepatic micrometastasis of colorectal tumors in a mouse model of liver ischemia-reperfusion injury / Jiao S.-F., Sun K., Chen X.-J., Zhao X., Cai N., Liu Y.-J., Xu L.-M., Kong X.-M., Wei L.-X. // *Journal of Biomedical Science* – 2014. – T. 21 – № 1 – C.1.
279. Fischer H. COL11A1 in FAP polyps and in sporadic colorectal tumors / Fischer H., Salahshor S., Stenling R., Björk J., Lindmark G., Iselius L., Rubio C., Lindblom A. // *BMC cancer* – 2001. – T. 1 – C.17.
280. Zhao Y. Osteopontin/SPP1: a potential mediator between immune cells and vascular calcification / Zhao Y., Huang Z., Gao L., Ma H., Chang R. // *Frontiers in Immunology* – 2024. – T. 15 – C.1395596.
281. Xu W. The role of microfibrillar-associated protein 2 in cancer / Xu W., Wang M., Bai Y., Chen Y., Ma X., Yang Z., Zhao L., Li Y. // *Frontiers in Oncology* – 2022. – T. 12 – C.1002036.
282. Yi Q. Oncogenic mechanisms of COL10A1 in cancer and clinical challenges (Review) / Yi Q., Zhu G., Zhu W., Wang J., Ouyang X., Yang K., Zhong J. // *Oncology Reports* – 2024. – T. 52 – № 6 – C.162.
283. Kram V. Biglycan in the Skeleton / Kram V., Shainer R., Jani P., Meester J.A.N., Loeys B., Young M.F. // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* – 2020. – T. 68 – № 11 – C.747–762.
284. Smith M.M. COMP Is a Biomarker of Cartilage Destruction, Extracellular Matrix and Vascular Remodeling and Tissue Repair / Smith M.M., Melrose J. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2025. – T. 26 – № 18 – C.9182.
285. Smith M.A. Agrin in the CNS: a protein in search of a function? / Smith M.A., Hilgenberg L.G.W. // *Neuroreport* – 2002. – T. 13 – № 12 – C.1485–1495.
286. Sun J.-Z. MXRA5 Is a Novel Immune-Related Biomarker That Predicts Poor Prognosis in Glioma / Sun J.-Z., Zhang J.-H., Li J.-B., Yuan F., Tong L.-Q., Wang X.-Y., Chen L.-L., Fan X.-G., Zhang Y.-M., Ren X., Zhang C., Yu S.-P., Yang X.-J. // *Disease Markers* – 2021. – T. 2021 – C.6680883.
287. Cheon D.-J. A collagen-remodeling gene signature regulated by TGF- β signaling is associated with metastasis and poor survival in serous ovarian cancer / Cheon D.-J., Tong Y., Sim M.-S., Dering

- J., Berel D., Cui X., Lester J., Beach J.A., Tighiouart M., Walts A.E., Karlan B.Y., Orsulic S. // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* – 2014. – T. 20 – № 3 – C.711–723.
288. Jia D. A COL11A1-correlated pan-cancer gene signature of activated fibroblasts for the prioritization of therapeutic targets / Jia D., Liu Z., Deng N., Tan T.Z., Huang R.Y.-J., Taylor-Harding B., Cheon D.-J., Lawrenson K., Wiedemeyer W.R., Walts A.E., Karlan B.Y., Orsulic S. // *Cancer Letters* – 2016. – T. 382 – № 2 – C.203–214.
289. Galván J.A. Validation of COL11A1/procollagen 11A1 expression in TGF- β 1-activated immortalised human mesenchymal cells and in stromal cells of human colon adenocarcinoma / Galván J.A., García-Martínez J., Vázquez-Villa F., García-Ocaña M., García-Pravia C., Menéndez-Rodríguez P., González-del Rey C., Barneo-Serra L., Toyos J.R. de los // *BMC cancer* – 2014. – T. 14 – C.867.
290. Sok J.C. Collagen type XI α 1 facilitates head and neck squamous cell cancer growth and invasion / Sok J.C., Lee J.A., Dasari S., Joyce S., Contrucci S.C., Egloff A.M., Trevelline B.K., Joshi R., Kumari N., Grandis J.R., Thomas S.M. // *British Journal of Cancer* – 2013. – T. 109 – № 12 – C.3049–3056.
291. Wu Y.-H. COL11A1 promotes tumor progression and predicts poor clinical outcome in ovarian cancer / Wu Y.-H., Chang T.-H., Huang Y.-F., Huang H.-D., Chou C.-Y. // *Oncogene* – 2014. – T. 33 – № 26 – C.3432–3440.
292. Shevde L.A. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer / Shevde L.A., Samant R.S. // *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* – 2014. – T. 37 – C.131–141.
293. Kale S. Osteopontin signaling upregulates cyclooxygenase-2 expression in tumor-associated macrophages leading to enhanced angiogenesis and melanoma growth via α 9 β 1 integrin / Kale S., Raja R., Thorat D., Soundararajan G., Patil T.V., Kundu G.C. // *Oncogene* – 2014. – T. 33 – № 18 – C.2295–2306.
294. Mi Z. Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis / Mi Z., Bhattacharya S.D., Kim V.M., Guo H., Talbot L.J., Kuo P.C. // *Carcinogenesis* – 2011. – T. 32 – № 4 – C.477–487.
295. Schaefer L. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages / Schaefer L., Babelova A., Kiss E., Hausser H.-J., Baliova M., Krzyzankova M., Marsche G., Young M.F., Mihalik D., Götte M., Malle E., Schaefer R.M., Gröne H.-J. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2005. – T. 115 – № 8 – C.2223–2233.
296. Moreth K. The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis / Moreth K., Brodbeck R., Babelova A., Gretz N., Spieker T., Zeng-Brouwers J., Pfeilschifter J., Young M.F., Schaefer R.M., Schaefer L. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2010. – T. 120 – № 12 – C.4251–4272.
297. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer / Balkwill F. // *Cancer Metastasis Reviews* – 2006. – T. 25 – № 3 – C.409–416.
298. Lim S.Y. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis / Lim S.Y., Yuzhalin A.E., Gordon-Weeks A.N., Muschel R.J. // *Oncotarget* – 2016. – T. 7 – № 19 – C.28697–28710.

299. Heegaard A.-M. Transforming growth factor beta stimulation of biglycan gene expression is potentially mediated by sp1 binding factors / Heegaard A.-M., Xie Z., Young M.F., Nielsen K.L. // *Journal of Cellular Biochemistry* – 2004. – T. 93 – № 3 – C.463–475.
300. Poveda J. MXRA5 is a TGF- β 1-regulated human protein with anti-inflammatory and anti-fibrotic properties / Poveda J., Sanz A.B., Fernandez-Fernandez B., Carrasco S., Ruiz-Ortega M., Cannata-Ortiz P., Ortiz A., Sanchez-Niño M.D. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine* – 2017. – T. 21 – № 1 – C.154–164.
301. Pickup M. The roles of TGF β in the tumour microenvironment / Pickup M., Novitskiy S., Moses H.L. // *Nature Reviews. Cancer* – 2013. – T. 13 – № 11 – C.788–799.
302. Haudenschild D.R. Enhanced activity of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) bound to cartilage oligomeric matrix protein / Haudenschild D.R., Hong E., Yik J.H.N., Chromy B., Mörgelin M., Snow K.D., Acharya C., Takada Y., Di Cesare P.E. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2011. – T. 286 – № 50 – C.43250–43258.
303. Wittrant Y. PDGF up-regulates CSF-1 gene transcription in ameloblast-like cells / Wittrant Y., Bhandari B.S., Abboud H., Benson N., Woodruff K., MacDougall M., Abboud-Werner S. // *Journal of Dental Research* – 2008. – T. 87 – № 1 – C.33–38.
304. Harrington M. Transcriptional regulation of the mouse CSF-1 gene / Harrington M., Konicek B.W., Xia X.L., Song A. // *Molecular Reproduction and Development* – 1997. – T. 46 – № 1 – C.39–44.
305. Song Z. Nuclear actin is involved in the regulation of CSF1 gene transcription in a chromatin required, BRG1 independent manner / Song Z., Wang M., Wang X., Pan X., Liu W., Hao S., Zeng X. // *Journal of Cellular Biochemistry* – 2007. – T. 102 – № 2 – C.403–411.
306. Ries C.H. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy / Ries C.H., Cannarile M.A., Hoves S., Benz J., Wartha K., Runza V., Rey-Giraud F., Pradel L.P., Feuerhake F., Klamann I., Jones T., Jucknischke U., Scheiblich S., Kaluza K., Gorr I.H., Walz A., Abiraj K., Cassier P.A., Sica A., Gomez-Roca C., Visser K.E. de, Italiano A., Le Tourneau C., Delord J.-P., Levitsky H., Blay J.-Y., Rüttinger D. // *Cancer Cell* – 2014. – T. 25 – № 6 – C.846–859.
307. Kozin S.V. Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor regrowth after local irradiation / Kozin S.V., Kamoun W.S., Huang Y., Dawson M.R., Jain R.K., Duda D.G. // *Cancer Research* – 2010. – T. 70 – № 14 – C.5679–5685.
308. Crittenden M.R. Expression of NF- κ B p50 in tumor stroma limits the control of tumors by radiation therapy / Crittenden M.R., Cottam B., Savage T., Nguyen C., Newell P., Gough M.J. // *PloS One* – 2012. – T. 7 – № 6 – C.e39295.
309. Xu J. CSF1R signaling blockade stanches tumor-infiltrating myeloid cells and improves the efficacy of radiotherapy in prostate cancer / Xu J., Escamilla J., Mok S., David J., Priceman S., West B., Bollag G., McBride W., Wu L. // *Cancer Research* – 2013. – T. 73 – № 9 – C.2782–2794.
310. Zaleska K. Tumour-infiltrating CD11b⁺ myelomonocytes and response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinoma (hSCC) xenografts / Zaleska K., Bruechner K., Baumann M., Zips D., Yaromina A. // *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* – 2011. – T. 101 – № 1 – C.80–85.

311. Deng L. Radiation and anti-PD-L1 antibody combinatorial therapy induces T cell-mediated depletion of myeloid-derived suppressor cells and tumor regression / Deng L., Liang H., Burnette B., Weichselbaum R.R., Fu Y.-X. // *Oncoimmunology* – 2014. – T. 3 – C.e28499.
312. Seifert L. Radiation Therapy Induces Macrophages to Suppress T-Cell Responses Against Pancreatic Tumors in Mice / Seifert L., Werba G., Tiwari S., Gao Ly N.N., Nguy S., Alothman S., Alqunaibit D., Avanzi A., Daley D., Barilla R., Tippens D., Torres-Hernandez A., Hundeyin M., Mani V.R., Hajdu C., Pellicciotta I., Oh P., Du K., Miller G. // *Gastroenterology* – 2016. – T. 150 – № 7 – C.1659- 1672.e5.
313. Shiao S.L. TH2-Polarized CD4(+) T Cells and Macrophages Limit Efficacy of Radiotherapy / Shiao S.L., Ruffell B., DeNardo D.G., Faddegon B.A., Park C.C., Coussens L.M. // *Cancer Immunology Research* – 2015. – T. 3 – № 5 – C.518–525.
314. Strachan D.C. CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing infiltration by CD8+ T cells / Strachan D.C., Ruffell B., Oei Y., Bissell M.J., Coussens L.M., Pryer N., Daniel D. // *Oncoimmunology* – 2013. – T. 2 – № 12 – C.e26968.
315. Mok S. Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy / Mok S., Koya R.C., Tsui C., Xu J., Robert L., Wu L., Graeber T., West B.L., Bollag G., Ribas A. // *Cancer Research* – 2014. – T. 74 – № 1 – C.153–161.
316. Holmgaard R.B. Targeting myeloid-derived suppressor cells with colony stimulating factor-1 receptor blockade can reverse immune resistance to immunotherapy in indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing tumors / Holmgaard R.B., Zamarin D., Lesokhin A., Merghoub T., Wolchok J.D. // *EBioMedicine* – 2016. – T. 6 – C.50–58.
317. Zhu Y. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models / Zhu Y., Knolhoff B.L., Meyer M.A., Nywening T.M., West B.L., Luo J., Wang-Gillam A., Goedegebuure S.P., Linehan D.C., DeNardo D.G. // *Cancer Research* – 2014. – T. 74 – № 18 – C.5057–5069.
318. Lugade A.A. Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor / Lugade A.A., Moran J.P., Gerber S.A., Rose R.C., Frelinger J.G., Lord E.M. // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* – 2005. – T. 174 – № 12 – C.7516–7523.
319. Lee Y. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment / Lee Y., Auh S.L., Wang Y., Burnette B., Wang Y., Meng Y., Beckett M., Sharma R., Chin R., Tu T., Weichselbaum R.R., Fu Y.-X. // *Blood* – 2009. – T. 114 – № 3 – C.589–595.
320. Schaue D. Maximizing tumor immunity with fractionated radiation / Schaue D., Ratikan J.A., Iwamoto K.S., McBride W.H. // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* – 2012. – T. 83 – № 4 – C.1306–1310.
321. Sharabi A.B. Stereotactic Radiation Therapy Augments Antigen-Specific PD-1-Mediated Antitumor Immune Responses via Cross-Presentation of Tumor Antigen / Sharabi A.B., Nirschl C.J., Kochel C.M., Nirschl T.R., Francica B.J., Velarde E., Deweese T.L., Drake C.G. // *Cancer Immunology Research* – 2015. – T. 3 – № 4 – C.345–355.

322. Rudqvist N.-P. Radiotherapy and CTLA-4 Blockade Shape the TCR Repertoire of Tumor-Infiltrating T Cells / Rudqvist N.-P., Pilonis K.A., Lhuillier C., Wennerberg E., Sidhom J.-W., Emerson R.O., Robins H.S., Schneck J., Formenti S.C., Demaria S. // *Cancer Immunology Research* – 2018. – T. 6 – № 2 – C.139–150.
323. Zingg J.-M. Vitamin E: A Role in Signal Transduction / Zingg J.-M. // *Annual Review of Nutrition* – 2015. – T. 35 – C.135–173.
324. Kristal A.R. Baseline selenium status and effects of selenium and vitamin e supplementation on prostate cancer risk / Kristal A.R., Darke A.K., Morris J.S., Tangen C.M., Goodman P.J., Thompson I.M., Meyskens F.L., Goodman G.E., Minasian L.M., Parnes H.L., Lippman S.M., Klein E.A. // *Journal of the National Cancer Institute* – 2014. – T. 106 – № 3 – C.djt456.
325. Hall K.T. COMT and Alpha-Tocopherol Effects in Cancer Prevention: Gene-Supplement Interactions in Two Randomized Clinical Trials / Hall K.T., Buring J.E., Mukamal K.J., Vinayaga Moorthy M., Wayne P.M., Kaptchuk T.J., Battinelli E.M., Ridker P.M., Sesso H.D., Weinstein S.J., Albanes D., Cook N.R., Chasman D.I. // *Journal of the National Cancer Institute* – 2019. – T. 111 – № 7 – C.684–694.
326. Singh U. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation / Singh U., Devaraj S., Jialal I. // *Annual Review of Nutrition* – 2005. – T. 25 – C.151–174.
327. Lee K.-Y. Vitamin E containing polymer micelles for reducing normal cell cytotoxicity and enhancing chemotherapy efficacy / Lee K.-Y., Chiang Y.-T., Hsu N.-Y., Yang C.-Y., Lo C.-L., Ku C.-A. // *Acta Biomaterialia* – 2015. – T. 24 – C.286–296.
328. Lee I.-M. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial / Lee I.-M., Cook N.R., Gaziano J.M., Gordon D., Ridker P.M., Manson J.E., Hennekens C.H., Buring J.E. // *JAMA* – 2005. – T. 294 – № 1 – C.56–65.
329. Lippman S.M. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) / Lippman S.M., Klein E.A., Goodman P.J., Lucia M.S., Thompson I.M., Ford L.G., Parnes H.L., Minasian L.M., Gaziano J.M., Hartline J.A., Parsons J.K., Bearden J.D., Crawford E.D., Goodman G.E., Claudio J., Winquist E., Cook E.D., Karp D.D., Walther P., Lieber M.M., Kristal A.R., Darke A.K., Arnold K.B., Ganz P.A., Santella R.M., Albanes D., Taylor P.R., Probstfield J.L., Jagpal T.J., Crowley J.J., Meyskens F.L., Baker L.H., Coltman C.A. // *JAMA* – 2009. – T. 301 – № 1 – C.39–51.
330. Galluzzi L. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease / Galluzzi L., Buqué A., Kepp O., Zitvogel L., Kroemer G. // *Nature Reviews. Immunology* – 2017. – T. 17 – № 2 – C.97–111.
331. Jiang Q. Natural Forms of Vitamin E as Effective Agents for Cancer Prevention and Therapy / Jiang Q. // *Advances in Nutrition* – 2017. – T. 8 – № 6 – C.850–867.
332. Fridlender Z.G. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: «N1» versus «N2» TAN / Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S., Albelda S.M. // *Cancer Cell* – 2009. – T. 16 – № 3 – C.183–194.
333. Eruslanov E.B. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer / Eruslanov E.B., Bhojnagarwala P.S., Quatromoni J.G., Stephen T.L., Ranganathan A., Deshpande C., Akimova T., Vachani A., Litzky L., Hancock W.W., Conejo-Garcia J.R., Feldman M.,

Albelda S.M., Singhal S. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2014. – T. 124 – № 12 – C.5466–5480.

334. Granot Z. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung / Granot Z., Henke E., Comen E.A., King T.A., Norton L., Benezra R. // *Cancer Cell* – 2011. – T. 20 – № 3 – C.300–314.

335. Wculek S.K. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells / Wculek S.K., Malanchi I. // *Nature* – 2015. – T. 528 – № 7582 – C.413–417.

336. Steele C.W. CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / Steele C.W., Karim S.A., Leach J.D.G., Bailey P., Upstill-Goddard R., Rishi L., Foth M., Bryson S., McDaid K., Wilson Z., Eberlein C., Candido J.B., Clarke M., Nixon C., Connelly J., Jamieson N., Carter C.R., Balkwill F., Chang D.K., Evans T.R.J., Strathee D., Biankin A.V., Nibbs R.J.B., Barry S.T., Sansom O.J., Morton J.P. // *Cancer Cell* – 2016. – T. 29 – № 6 – C.832–845.

337. Mastio J. Identification of monocyte-like precursors of granulocytes in cancer as a mechanism for accumulation of PMN-MDSCs / Mastio J., Condamine T., Dominguez G., Kossenkova A.V., Donthireddy L., Veglia F., Lin C., Wang F., Fu S., Zhou J., Viatour P., Lavilla-Alonso S., Polo A.T., Tcyganov E.N., Mulligan C., Nam B., Bennett J., Masters G., Guarino M., Kumar A., Nefedova Y., Vonderheide R.H., Languino L.R., Abrams S.I., Gabrilovich D.I. // *The Journal of Experimental Medicine* – 2019. – T. 216 – № 9 – C.2150–2169.

338. Kujawski M. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice / Kujawski M., Kortylewski M., Lee H., Herrmann A., Kay H., Yu H. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2008. – T. 118 – № 10 – C.3367–3377.

339. Shojaei F. Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells / Shojaei F., Wu X., Malik A.K., Zhong C., Baldwin M.E., Schanz S., Fuh G., Gerber H.-P., Ferrara N. // *Nature Biotechnology* – 2007. – T. 25 – № 8 – C.911–920.

340. Batchelor T.T. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients / Batchelor T.T., Sorensen A.G., Tomaso E. di, Zhang W.-T., Duda D.G., Cohen K.S., Kozak K.R., Cahill D.P., Chen P.-J., Zhu M., Ancukiewicz M., Mrugala M.M., Plotkin S., Drappatz J., Louis D.N., Ivy P., Scadden D.T., Benner T., Loeffler J.S., Wen P.Y., Jain R.K. // *Cancer Cell* – 2007. – T. 11 – № 1 – C.83–95.

341. Carmeliet P. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases / Carmeliet P., Jain R.K. // *Nature Reviews. Drug Discovery* – 2011. – T. 10 – № 6 – C.417–427.

342. Tong R.T. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors / Tong R.T., Boucher Y., Kozin S.V., Winkler F., Hicklin D.J., Jain R.K. // *Cancer Research* – 2004. – T. 64 – № 11 – C.3731–3736.

343. Rolny C. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF / Rolny C., Mazzone M., Tugues S., Laoui D., Johansson I., Coulon C., Squadrito M.L., Segura I., Li X., Knevels E., Costa S., Vinckier S., Dresselaer T., Åkerud P., De Mol M., Salomäki H., Phillipson M., Wyns S., Larsson E., Buyschaert

- I., Botling J., Himmelreich U., Van Ginderachter J.A., De Palma M., Dewerchin M., Claesson-Welsh L., Carmeliet P. // *Cancer Cell* – 2011. – T. 19 – № 1 – C.31–44.
344. Monti E. HIF-1 as a target for cancer chemotherapy, chemosensitization and chemoprevention / Monti E., Gariboldi M.B. // *Current Molecular Pharmacology* – 2011. – T. 4 – № 1 – C.62–77.
345. Haddad L.E. Characterization of FGF receptor expression in human neutrophils and their contribution to chemotaxis / Haddad L.E., Khzam L.B., Hajjar F., Merhi Y., Sirois M.G. // *American Journal of Physiology. Cell Physiology* – 2011. – T. 301 – № 5 – C.C1036-1045.
346. Biermann J. Dissecting the treatment-naïve ecosystem of human melanoma brain metastasis / Biermann J., Melms J.C., Amin A.D., Izar B. // *Cell* – 2022. – T. 185 – № 14 – C.2591- 2608.e30.
347. Catalano M. Non-neoplastic astrocytes: key players for brain tumor progression / Catalano M., Limatola C., Trettel F. // *Frontiers in Cellular Neuroscience* – 2023. – T. 17 – C.1352130.
348. Qu F. Crosstalk between small-cell lung cancer cells and astrocytes mimics brain development to promote brain metastasis / Qu F., Brough S.C., Michno W., Madubata C.J., Hartmann G.G., Puno A., Drainas A.P., Bhattacharya D., Tomasich E., Lee M.C., Yang D., Kim J., Peiris-Pagès M., Simpson K.L., Dive C., Preusser M., Toland A., Kong C., Das M., Winslow M.M., Pasca A.M., Sage J. // *Nature Cell Biology* – 2023. – T. 25 – № 10 – C.1506–1519.
349. Zhang L. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth / Zhang L., Zhang S., Yao J., Lowery F.J., Zhang Q., Huang W.-C., Li P., Li M., Wang X., Zhang C., Wang H., Ellis K., Cheerathodi M., McCarty J.H., Palmieri D., Saunus J., Lakhani S., Huang S., Sahin A.A., Aldape K.D., Steeg P.S., Yu D. // *Nature* – 2015. – T. 527 – № 7576 – C.100–104.
350. Priego N. STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis / Priego N., Zhu L., Monteiro C., Mulders M., Wasilewski D., Bindeman W., Doglio L., Martínez L., Martínez-Saez E., Ramón Y Cajal S., Megías D., Hernández-Encinas E., Blanco-Aparicio C., Martínez L., Zarzuela E., Muñoz J., Fustero-Torre C., Piñeiro-Yáñez E., Hernández-Laín A., Bertero L., Poli V., Sanchez-Martinez M., Menendez J.A., Soffietti R., Bosch-Barrera J., Valiente M. // *Nature Medicine* – 2018. – T. 24 – № 7 – C.1024–1035.
351. Neefjes J. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation / Neefjes J., Jongsma M.L.M., Paul P., Bakke O. // *Nature Reviews. Immunology* – 2011. – T. 11 – № 12 – C.823–836.
352. Yamamoto K. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I / Yamamoto K., Venida A., Yano J., Biancur D.E., Kakiuchi M., Gupta S., Sohn A.S.W., Mukhopadhyay S., Lin E.Y., Parker S.J., Banh R.S., Paulo J.A., Wen K.W., Debnath J., Kim G.E., Mancias J.D., Fearon D.T., Perera R.M., Kimmelman A.C. // *Nature* – 2020. – T. 581 – № 7806 – C.100–105.
353. Mandl M.M. Inhibition of Cdk5 induces cell death of tumor-initiating cells / Mandl M.M., Zhang S., Ulrich M., Schmoekel E., Mayr D., Vollmar A.M., Liebl J. // *British Journal of Cancer* – 2017. – T. 116 – № 7 – C.912–922.
354. Sallam H. Age-dependent pharmacokinetics and effect of roscovitine on Cdk5 and Erk1/2 in the rat brain / Sallam H., Jimenez P., Song H., Vita M., Cedazo-Minguez A., Hassan M. // *Pharmacological Research* – 2008. – T. 58 – № 1 – C.32–37.

355. Meijer L. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5 / Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong J.P., Blow J.J., Inagaki N., Inagaki M., Delcros J.G., Moulinoux J.P. // *European Journal of Biochemistry* – 1997. – T. 243 – № 1–2 – C.527–536.
356. Tolaney S.M. A Phase II Study of Abemaciclib in Patients with Brain Metastases Secondary to Hormone Receptor-Positive Breast Cancer / Tolaney S.M., Sahebjam S., Le Rhun E., Bachelot T., Kabos P., Awada A., Yardley D., Chan A., Conte P., Diéras V., Lin N.U., Bear M., Chapman S.C., Yang Z., Chen Y., Anders C.K. // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* – 2020. – T. 26 – № 20 – C.5310–5319.
357. Charlson E.S. Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers / Charlson E.S., Chen J., Custers-Allen R., Bittinger K., Li H., Sinha R., Hwang J., Bushman F.D., Collman R.G. // *PloS One* – 2010. – T. 5 – № 12 – C.e15216.
358. Wu J. Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults / Wu J., Peters B.A., Dominianni C., Zhang Y., Pei Z., Yang L., Ma Y., Purdue M.P., Jacobs E.J., Gapstur S.M., Li H., Alekseyenko A.V., Hayes R.B., Ahn J. // *The ISME journal* – 2016. – T. 10 – № 10 – C.2435–2446.
359. Morris A. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers / Morris A., Beck J.M., Schloss P.D., Campbell T.B., Crothers K., Curtis J.L., Flores S.C., Fontenot A.P., Ghedin E., Huang L., Jablonski K., Kleeup E., Lynch S.V., Sodergren E., Twigg H., Young V.B., Bassis C.M., Venkataraman A., Schmidt T.M., Weinstock G.M., Lung HIV Microbiome Project // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* – 2013. – T. 187 – № 10 – C.1067–1075.
360. Lim M.Y. Analysis of the association between host genetics, smoking, and sputum microbiota in healthy humans / Lim M.Y., Yoon H.S., Rho M., Sung J., Song Y.-M., Lee K., Ko G. // *Scientific Reports* – 2016. – T. 6 – C.23745.
361. Leng Q. Microbiota Biomarkers for Lung Cancer / Leng Q., Holden V.K., Deepak J., Todd N.W., Jiang F. // *Diagnostics (Basel, Switzerland)* – 2021. – T. 11 – № 3 – C.407.
362. Liu H.-X. Difference of lower airway microbiome in bilateral protected specimen brush between lung cancer patients with unilateral lobar masses and control subjects / Liu H.-X., Tao L.-L., Zhang J., Zhu Y.-G., Zheng Y., Liu D., Zhou M., Ke H., Shi M.-M., Qu J.-M. // *International Journal of Cancer* – 2018. – T. 142 – № 4 – C.769–778.
363. Bello S. Core Microbiota in Central Lung Cancer With Streptococcal Enrichment as a Possible Diagnostic Marker / Bello S., Vengoechea J.J., Ponce-Alonso M., Figueredo A.L., Mincholé E., Rezusta A., Gambó P., Pastor J.M., Galeano J., Del Campo R. // *Archivos De Bronconeumologia* – 2021. – T. 57 – № 11 – C.681–689.