

ЛИТЕРАТУРА

1. Калошин А.А., Гатыпова Е.В., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств. Биотехнология. 2011, 2:74-84.
2. Калошин А.А., Исаков М.А., Михайлова Н.А., Вертиев Ю.В. Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 154 (9): 330-335.
3. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2016, 71 (1): 5-10.
4. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик.
5. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов эксперимента.
6. Солдатенкова А.В., Калошин А.А., Поддубиков А.В., Зимина Е.М., Калиниченко Е.О., Михайлова Н.А. Протективные свойства и безопасность рекомбинантной синегнойной вакцины. Цитокины и воспаление. 2017, 16 (4): 73-75.
7. Cuervo M.L., Sterling A.L., Nicot I.A. et al. Validation of a new alternative for determining in vitro potency in vaccines containing Hepatitis B from two different manufacturers. Biologicals. 2008, 36: 375-382.
8. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). 2011.
9. Nakane P.K., Kawoi A.A. New method of conjugation. Histochem. Cytochem. 1974, 22:1084-1091.
10. Shanmugham R., Thirumeni N., Rao V.S. et al. Immunocapture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Assessment of In Vitro Potency of Recombinant Hepatitis B Vaccine. Clinical and Vaccine Immunology. 2010, 17 (8): 1252-1260.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

А.Б.Филина^{1,3}, О.А.Свитич^{1,3,4}, Ю.И.Аммур¹, А.К.Голенков², Е.Ф.Клинушкина², В.В.Зверев^{1,3}

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ CXCL12, CCR4, EGFR В МИГРИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ МИЕЛОМОНОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА ДО И ПОСЛЕ ХИМИОТЕРАПИИ

¹НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова, ²Московский областной клинический НИИ им.М.Ф.Владимирского, ³Первый московский государственный медицинский университет им.И.М.Сеченова, ⁴Российский национальный научно-исследовательский медицинский университет им.Н.И.Пирогова, Москва

Цель. Изучение влияния CXCL12 на миграцию мононуклеарных клеток, выделенных от здоровых пациентов, пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии, а также исследование экспрессии генов CCR4, EGFR, CXCL12 после воздействия CXCL12. *Материалы и методы.* Исследовался хемотаксис мононуклеарных клеток (МНК) здоровых доноров и пациентов с миеломонобластным лейкозом в камере Бойдена с последующим выделением РНК, проведение обратной транскрипции и ПЦР-РВ. *Результаты.* Выявлено достоверное усиление хемотаксиса по направлению к CXCL12 клеток МНК миеломонобластного лейкоза после проведенной химиотерапии, а также снижение экспрессии данного хемокина в опухолевых клетках до химиотерапии после воздействия на него CXCL12. *Заключение.* Предположительно опухолевые клетки сами продуцируют CXCL12 в большом количестве, что необходимо для нарушения межклеточных взаимодействий и дальнейшей интравасии, продукция которого может снижаться при внешней стимуляции этим же хемокином. CXCL12 также способствует повышению уровня экспрессии EGFR и CCR4, что приводит к усилению пролиферации опухоли и миграции опухолевых клеток.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 100—104

Ключевые слова: хемотаксис, CXCL12, лейкоз, хемокины, камера Бойдена

STUDY OF CXCL12, CCR4, EGFR GENE EXPRESSION IN MIGRATING MYELOMONOBLASTIC LEUKEMIA CELLS BEFORE AND AFTER CHEMOTHERAPY

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Vladimirskiy Moscow Regional Research Clinical Institute, ³Sechenov First Moscow State Medical University, ⁴Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Aim. A study of CXCL12 effect on the migration of mononuclear cells isolated from healthy patients, from patients with myelomonoblastic leukemia before and after chemotherapy and the study of CCR4, EGFR and CXCL12 genes expression after exposure to CXCL12. *Materials and methods.* The chemotaxis of mononuclear cells (MNCs) of healthy donors and patients with myelomonoblastic leukemia was studied in a Boyden chamber, followed by isolation of RNA, reverse transcription and PCR-RV. *Results.* A significant increase in myelomonoblastic cell chemotaxis towards CXCL12 after chemotherapy was demonstrated, as well as a decrease in the expression of this chemokine in tumor cells before chemotherapy after exposure to CXCL12. *Conclusion.* Presumably, the tumor cells themselves produce CXCL12 in large amounts, which is necessary for the disturbance of intercellular interactions and further intravasation, whose production may decrease with external stimulation by the same chemokine. CXCL12 also helps to increase the expression level of EGFR and CCR4, which leads to increased tumor proliferation and migration of tumor cells.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 100—104

Key words: chemotaxis, CXCL12, leukemia, chemokines, Boyden chamber

ВВЕДЕНИЕ

Исследования в области онкологических заболеваний активно ведутся уже более двух столетий, однако, иммунологические аспекты опухолевой прогрессии изучаются совсем недавно. Важнейшими участниками онкологического процесса являются хемокины, которые участвуют не только в миграции опухолевых клеток, но также способствуют активному росту опухоли и ангиогенезу в солидные опухоли [2,5].

По данным многочисленных исследований, показано, что такие хемокины как CXCL12, CCL2, CCL3 и CCL5 являются активными участниками ангиогенеза. CXCL12, CCL2, CCL3 и CCL5 активируют миграцию клеток-предшественников эндотелия (endothelial precursor cells — EPCs) с помощью митоген-активированных протеинкиназных путей (Janus kinase 2 (JAK2) — STAT5) и p3893, что ведет к ангиогенезу. CXCL12 также может активировать пролиферацию эндотелия сосудов через активацию рецептора CXCR4 на поверхности эндотелиальных клеток [2,5,6].

Другой важнейшей функцией хемокинов является способность активировать миграцию иммунных клеток в микроокружение опухоли, так называемый рекрутинг. Под действием хемокинов, в основном таких как CCL20, CXCL14, CXCL12, CCL2, CXCL8, в опухолевую ткань мигрируют антигенпрезентирующие клетки (дендритные клетки, макрофаги, миелоидные супрессорные клетки, В-клетки), которые оказывают противоопухолевый эффект, подавляя активированные опухолевыми антигенами CD8+ Т-клетки [6,7].

Показано, что хемокины участвуют в миграции опухолевых клеток. На данный момент по научным данным известно, что по меньшей мере двадцать три типа опухолей экспрессируют CXCR4, способствуя миграции опухолевых клеток к CXCL12 по градиенту концентрации. Большинство исследований, направленных на изучение миграции опухолевых клеток к CXCL12, показывают, что повышенная экспрессия CXCR4 коррелирует с плохим прогнозом и более низким уровнем выживаемости у пациентов с онкологическими заболеваниями, в частности при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ). Однако, последние годы появляются новые данные, которые указывают на неоднозначность участия CXCL12 и его рецепторов в прогрессии опухоли. Luke J. Drury и его коллеги (2011) обнаружили, что хемотаксис клеток зависит от олигомерного состояния хемокина: мономерный вид и мутантный димерный белок

CXCL12 снижали хемотаксис опухолевых клеток, способствуя их гибели. Lorena Hernandez и ее коллеги (2011) также показали, что в зависимости от уровня экспрессии рецепторов CXCL12 (CXCR4 и CXCR7), данный хемокин проявляет разное действие на опухолевую клетку.

С учетом данных последних исследований и неоднозначности участия CXCL12 в регуляции опухолевой прогрессии в нашей работе была поставлена цель изучить влияние CXCL12 на миграцию мононуклеарных клеток, выделенных от здоровых пациентов, пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии, а также изучить экспрессию генов CCR4, EGFR, CXCL12 после воздействия CXCL12.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были отобраны здоровые доноры в возрасте 20-40 лет (n=10), у которых не было иммунодефицитных состояний, онкологических, аутоиммунных заболеваний, а также инфекционных заболеваний для формирования группы контроля. Во второй клинической группе были пациенты в возрасте 20-50 лет (n=5) с миеломонобластным лейкозом без наличия сопутствующих инфекционных, иммунодефицитных и аутоиммунных заболеваний до и после химиотерапии цитозаром и даунорубицином (пациенты отделения клинической гематологии и иммунотерапии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского).

Для выделения мононуклеарных клеток (МНК) использовался Diacoll-1077 (Диа-М, Россия). Для исследования хемотаксиса использовалась камера Бойдена фирмы MERCK MultiScreen Migration Invasion and Chemotaxis Filter Plate (Германия) с размерами пор 5 и 8 мкм. В качестве хемоаттрактанта использовался CXCL12 (ThermoFisher, США). В качестве контроля использовали среду RPMI-1640 (ПанЭко, РФ). Выделение РНК из клеток проводилось с помощью набора «РИБО-сорб» (ИЛС, РФ), далее проводили реакцию обратной транскрипции с помощью «Набора реагентов ОТ-1» (ИЛС, РФ) и ПЦР-РВ («Набор реагентов с SYBR Green1», Синтол, РФ) на амплификаторе ДТпрайм («ДНК-Технология», РФ). Последовательности праймеров для исследования экспрессии CCR4, EGFR, CXCL12 были получены из GeneBank (NCBI), после чего синтезированы компанией Синтол (РФ).

Были выделены МНК от здоровых доноров и пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии методом центрифугирования в градиенте плотности. На первом этапе оценивали количество мигрировавших клеток. Динамику миграции оценивали через 10, 60 мин и через сутки. В верхний отсек камеры помещалась взвесь клеток в объеме 60 мкл и количестве $60 \pm 1 \times 10^3$. В нижний отсек камеры вносили хемоаттрактант в объеме 175 мкл в концентрации 200 нг/мл (CXCL12) и контроль.

На втором этапе исследовалась экспрессия генов CCR4, EGFR, CXCL12 в контрольных образцах и активированных клетках. Уровень экспрессии оценивали относительно уровня β -актина. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной статистической программой BioStat, а также программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе мы оценивали миграцию МНК от здоровых доноров и пациентов с миеломонобластным лейкозом. Миграция мононуклеарных клеток здоровых доноров относительно CXCL12 была достоверно выше миграции контроля в 2 раза через 60 минут и 24 часа. Миграция МНК от пациентов с миеломонобластным лейкозом до начала химиотерапии под действием CXCL12 и в контроле не имела достоверных отличий, однако была достоверно ниже миграции клеток здоровых доноров под действием CXCL12 через 10 минут, 60 минут и 24 часа в 9 раз. Миграция МНК от пациентов после химиотерапии относительно CXCL12 была достоверно выше контроля в 1,5 раза через час, но через 10 минут и сутки достоверных отличий не было. Миграция МНК от пациентов после химиотерапии относительно CXCL12 была достоверно выше миграции МНК от пациентов до химиотерапии через 10 минут

в 4 раза и совпадала с количеством мигрировавших МНК от здоровых доноров через 10 минут. Через 60 минут миграция МНК от пациентов после химиотерапии к CXCL12 была достоверно выше миграции МНК от пациентов до химиотерапии в 3,5 раза, однако через 24 часа достоверных отличий не было (рис.).

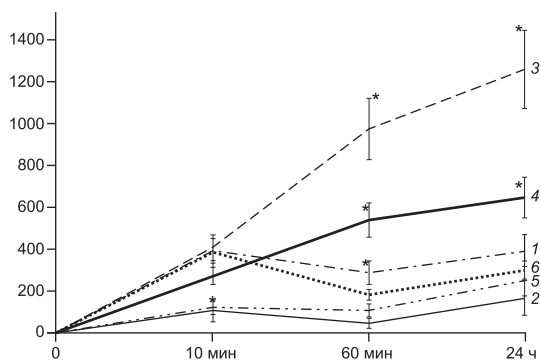
На втором этапе оценивалась экспрессия CCR4, EGFR, CXCL12. Экспрессия гена CXCL12 под воздействием CXCL12 не изменялась на протяжении всего эксперимента в МНК от здоровых доноров, а также достоверно не отличалась от экспрессии гена CXCL12 в интактных клетках (в контроле). Экспрессия гена CXCL12 в интактных МНК от пациентов с миеломонобластным лейкозом была достоверно выше контроля через 10 минут и через 60 минут в 16 и 4 раза соответственно, достоверных отличий через 24 часа обнаружено не было.

Экспрессия гена CCR4 в интактных клетках миеломонобластного лейкоза и здоровых доноров не отличается достоверно в течение 60 минут, однако экспрессия гена CCR4 в МНК миеломонобластного лейкоза достоверно увеличивается относительно экспрессии в МНК от здоровых доноров в 9 раз через сутки. Экспрессия гена CCR4 в МНК миеломонобластного лейкоза под действием CXCL12 в 39 раз достоверно выше контроля через 10 минут, достоверных отличий через час не наблюдалось, и достоверно ниже в 5000 раз относительно контроля через 24 часа. Экспрессия гена CCR4 в МНК миеломонобластного лейкоза под действием CXCL12 достоверно выше экспрессии гена CCR4 в МНК здоровых доноров под действием CXCL12 в 4,6 раза на 10 минуте и достоверно не отличается через 60 минут и через сутки.

Достоверных отличий в экспрессии гена EGFR в интактных МНК здоровых доноров, МНК здоровых пациентов под действием CXCL12 и МНК миеломонобластного лейкоза под действием CXCL12 не обнаружено. Экспрессия EGFR в интактных МНК от пациентов с миеломонобластным лейкозом достоверно отличается от контроля в 17 раз на десятой минуте, однако не отличается достоверно от контроля через 60 минут и через сутки.

В качестве исследуемого материала нами был выбран миеломонобластный лейкоз, так как по многочисленным исследованиям именно исход данного онкологического заболевания зависит от пары оси хемокина и рецептора CXCL12-CXCR4 [7]. Для исследования аутоактивации хемотаксиса был выбран самый значимый для данного типа опухоли хемокин — CXCL12, экспрессию гена которого мы исследовали. Также в качестве опосредованно экспрессируемых генов были выбраны EGFR и CCR4, так как по немногочисленным данным известно, что возможно усиление хемотаксиса через ось CXCL12-CXCR4, путем активации CCR4, когда, в свою очередь, активация CXCR4 может значительно повышать экспрессию EGFR, что ведет к активной пролиферации опухоли [7, 8].

Получены данные, что у пациентов с миеломонобластным лейкозом до химиотерапии спонтанная и индуцированная миграция снижена в 7 раз относительно миграции МНК здоровых доноров в течение всего эксперимента. После применения химиотерапии миграционная способность частично восстанавливается. Также показан высокий уровень экспрессии гена CXCL12 в интактных клетках миеломонобластного лейкоза, в то время как под действием хемокина экспрессия достоверно снижалась. Предположительно опухолевые клетки самостоятельно продуцируют CXCL12 в большом количестве, что необходимо для нарушения межклеточных взаимодействий и



Миграция мононуклеарных клеток пациентов с лейкозом до и после проводимой терапии по сравнению с показателями у здоровых доноров.

1 — МНК лейкоз CXCL12, 2 — МНК лейкоз контроль, 3 — МНК здоровые CXCL12, 4 — МНК контроль здоровые, 5 — МНК лейкоз после терапии CXCL12, 6 — МНК контроль после терапии.

дальнейшей интравазии. Стимуляция хемокином CXCL12 достоверно повышала хемотаксис опухолевых клеток после химиотерапии только через час, миграции МНК от пациентов до терапии достоверно не отличалась от контроля, что, скорее всего, обусловлено неотвечаемостью рецепторов вследствие повышенной сенсилизации рецептора вследствие аутоактивации выделяемым хемокином и также внешней стимуляции.

Уровень экспрессии CCR4 в опухолевых клетках под действием CXCL12 моментально повышается через 10 минут, что может способствовать активации миграции опухолевых клеток, однако до конца не ясен механизм спонтанной экспрессии CCR4, как и EGFR, в опухолевых клетках через 24 часа. Таким образом, основываясь на исследованиях других ученых и полученных нами данных, можно говорить о том, что хемотаксис опухолевых клеток может происходить без внешней стимуляции путем аутоактивации, которая при определенных условиях может приводить как к гибели клетки, так и к ее распространению в зависимости от стадии опухолевого процесса.

В дальнейшем планируется исследование экспрессии вышеописанных рецепторов в МНК миеломонобластного лейкоза после химиотерапии, а также CXCR4, CXCR7 и TLRs в МНК от здоровых доноров и от пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии по направлению к CXCL12 и TLRs лигандам, что поможет более детально изучить взаимосвязь факторов врожденного иммунитета в онкологических процессах [1,3,4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Лабжинов П.А., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Оценка экспрессии генов компонентов врожденного иммунитета в лейкоцитах мышей при действии синтетических лигандов *in vivo*. Журн. микробиол. 2013, 6:76-80.
2. Свитич О.А., Филина А.Б., Давыдова Н.В., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Роль факторов врожденного иммунитета в процессе опухолеобразования. Медицинская иммунология. 2018, 20(2):151-162.
3. Филина А.Б., Свитич О.А., Аммури Ю.И., Голенков А.К., Клинушкина Е.Ф., Зверев В.В. Изучение миграционной способности мононуклеарных и опухолевых клеток относительно TLRs лигандов и CXCL12. Российский иммунологический журнал. 2017, 11(20): 3:545-547.
4. Филина А.Б., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Лабжинов П.А., Парфенова Т.М., Зверев В.В. Изучение лиганд-опосредованного хемотаксиса клеток макрофагальной линии U937. Медицинская иммунология. 2014, 16(5):443-448.
5. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001, 357:539—545
6. Goede V., Brogelli L., Ziche M., Augustin H.G. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int. J. Cancer*. 1999, 82:765-770.
7. Lazennec G., Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol. Med*. 2010, 16:133-144.
8. Zhang Y., Tian L., Zheng Y.Y. et al. C-terminal peptides of chemokine-like factor 1 signal through chemokine receptor CCR4 to cross-desensitize the CXCR4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011, 409:356-361.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.П.Фошина, Т.А.Серова, И.В.Бишева, О.В.Слатинова

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОВАК ВП-4 В ОТНОШЕНИИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ЧАСТО И ДЛИТЕЛЬНО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Изучить уровень специфических антител различных изотипов к антигенам *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* в сыворотке, слюне и назальном секрете у часто и длительно болеющих детей (ЧДБД), а также концентрацию IgA, sIgA, IgG в слюне при назально-оральном введении Иммуновак ВП-4. *Материалы и методы.* Специфические антитела к *S.aureus* и *K.pneumoniae*, содержащиеся в слюне, назальном секрете и сыворотке крови, определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, концентрации иммуноглобулинов классов G, A и sA в слюне — методом радиальной иммунодиффузии с использованием коммерческого набора,