

АННОТАЦИЯ
Диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности «6D060700-Биология»

Абдолла Нуршат

**Изучение миелоидных супрессорных клеток в различных
экспериментальных моделях хронического воспаления**

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена комплексному изучению функциональных и фенотипических характеристик миелоидных супрессорных клеток (MDSC) в различных экспериментальных моделях хронического воспаления и их комбинациях, а также изучению возможных фармакологических путей к таргетной элиминации MDSC.

Актуальность темы исследования. Согласно клиническим данным, хроническое воспаление было описано как благоприятная среда для возникновения и прогрессирования многих заболеваний, включая рак. Она активизирует клетки с иммуносупрессорной функцией или способствует их накоплению в очаге воспаления, стимулируя выработку большого количества провоспалительных медиаторов, участвующих в воспалении. Повышенное количество ряда популяций иммуносупрессорных клеток подавляет нормальную функцию эффекторных клеток иммунной системы. В результате изменяется иммунная система, противоопухолевый иммунный надзор ослабляется, что способствует прогрессированию и метастазированию опухолевых клеток. Еще одним фактором, влияющим на изменение воспалительных процессов и активирующим развитие опухолей, является нарушение регуляции циркадианных ритмов (ночное освещение, ночная работа, нарушения сна и др.). При этом происходит формирование иммуносупрессорного фона, который увеличивает вероятность возникновения рака, отрицательно влияя на регуляцию воспалительных сигналов и иммунных ответов.

MDSC считаются одним из важнейших клеточных компонентов иммуносупрессорного микроокружения опухоли. Физиологически MDSC являются иммуносупрессорными клетками, которые естественным образом генерируются во время беременности, чтобы защитить плод от атак иммунных клеток матери, а также при регенерации тканей после травм, чтобы подавить острый воспалительный процесс. Они также участвуют в поддержании гомеостаза в здоровом организме. Однако некоторые хронические заболевания, такие как рак, мобилизуют иммуносупрессорный потенциал MDSC, чтобы преодолеть иммунный надзор и использовать эти клетки в целях беспрепятственного роста. Роль MDSC наиболее исследована в биологии рака. Было обнаружено, что они ослабляют противоопухолевый иммунитет и снижают эффективность иммунотерапии на животных моделях и у онкологических больных. Высокий

уровень MDSC в крови больных раком свидетельствует о плохом прогнозе. Несмотря на значительные успехи в изучении роли MDSC в биологии рака, роль MDSC в хроническом воспалении изучена недостаточно. В большинстве исследований MDSC используются модели развития злокачественных опухолей у животных, которые не дают адекватной информации о возможном участии, характеристиках и роли MDSC на начальных этапах хронического воспаления. Дальнейшие исследования также показали, что хронические нарушения циркадианного ритма увеличивают выработку провоспалительных факторов (TNF α и IL-6), что приводит к дисфункции эффекторных клеток иммунной системы. Однако влияние этого нарушения на иммуносупрессорные клетки, включая MDSC, не было изучено. Поэтому важно исследовать MDSC, которые могут обладать способностью изменять иммунный гомеостаз и повышать риск рака.

В последние годы, исследователи пытаются разработать эффективные способы модуляции или элиминации MDSC при раке. Наиболее распространенные способы решения этой проблемы - это использование различных противоопухолевых препаратов, применяемых в клинической онкологии. Несмотря на некоторый успех в элиминации MDSC, потенциальные побочные эффекты фармакологических препаратов оставляют некоторую неопределенность в их применении для больных раком. Следовательно, крайне важно разработать и оценить клеточно-специфические цитотоксические агенты для эффективной элиминации MDSC.

В связи с вышеуказанными проблемами важным аспектом иммунологических исследований является детальное изучение функциональных и фенотипических характеристик MDSC при хроническом воспалении и роли MDSC, индуцированных хроническим воспалением, в развитии опухоли, что поможет лучше понять механизмы, лежащие в основе различных воспалительных заболеваний и открыть новые способы их эффективного лечения.

Целью исследования является изучение фенотипических и функциональных характеристик MDSC на экспериментальных моделях хронического воспаления и разработка эффективного фармакологического способа таргетной элиминации MDSC.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1 Изучить фенотипические и функциональные характеристики MDSC при адьювантном артрите на модели хронического воспаления на животных;
- 2 Изучить влияние ночного освещения на фенотипические и функциональные характеристики MDSC на модели хронического воспаления на животных;
- 3 Изучить роль MDSC, индуцированных хроническим воспалением, в развитии трансплантированной опухоли;
- 4 Разработать фармакологические подходы к таргетной элиминации MDSC.

Объекты исследования. MDSC, полученные из селезенки и костного мозга мышей.

Предмет исследования. Функциональные и фенотипические характеристики MDSC при хроническом воспалении.

Методы исследования. Эксперименты на животных, изопикническое центрифугирование клеток на градиентах плотности, тест на исключение трипанового синего, культивирование клеток, анализ пролиферации клеток с помощью CFSE, МТТ-тест, иммуномагнитное разделение клеток, проточная цитометрия, иммуноферментный анализ, спектрофотометрия, гельфильтрация.

Научная новизна исследования:

- Впервые установлено повышение уровня $CD11b^+Ly6G^{high}$ гранулоцитарной и $CD11b^+CD49d^+$ моноцитарной субпопуляций MDSC с иммуносупрессорным потенциалом на мышинной модели хронического адьювантного артрита.

- Установлено, что ночное освещение увеличивает накопление $CD11b^+CD49d^+$ и $CD11b^+Ly6G^{high}$ субпопуляций MDSC у мышей с хроническим воспалением.

- Обнаружено, что MDSC, индуцированные хроническим воспалением, способствуют росту трансплантированной опухоли.

- Продемонстрировано, что экзогенный провоспалительный цитокин $TNF\alpha$ усиливает супрессорную активность MDSC в отношении Т-клеток и индуцирует экспрессию молекулы адгезии CD62L MDSC *in vitro*.

- Установлено, что усиленный рост трансплантированной опухоли при хроническом воспалении сопровождается увеличением уровня MDSC, экспрессирующих CD62L.

- Установлено, что альфа-фетопроtein (AFP) специфически связывается с мышинными G-MDSC и M-MDSC.

- Показано, что цитотоксический конъюгат AFP-даунорубин (AFP-DR) способен селективно элиминировать MDSC *in vitro* и *in vivo* у мышей с трансплантированными опухолями, ингибируя их рост и повышая уровень NK-клеток.

Теоретическая значимость работы. Полученные результаты углубляют наше понимание клеточных механизмов, участвующих в развитии хронического воспаления и роста опухоли, связанных с хроническим воспалением. Выявление фенотипического профиля субпопуляций MDSC, уровень которых повышен при хроническом воспалении, а также роли этих клеток в активации роста опухоли может быть использовано для дальнейшей разработки подходов к иммунотерапии хронических воспалительных заболеваний и связанных с ними онкологических заболеваний. Данные о влиянии света ночью на индукцию MDSC позволяют по-новому взглянуть на увеличение частоты хронических воспалительных и онкологических заболеваний, наблюдаемых у людей с нарушением циркадианных ритмов (ночная работа), и дать новые направления в профилактике и лечении хронических заболеваний.

Практическая ценность исследования. Данная работа имеет высокую практическую ценность. Было показано, что разработка цитотоксического конъюгата на основе AFP является эффективным противоопухолевым иммунотерапевтическим подходом. Его действие связано с элиминацией иммуносупрессорных MDSC. Эти результаты представляют интерес для клинических иммунологов, а также онкологов, занимающихся разработкой новых методов терапии для онкологических больных. В рамках данной работы был получен патент на способ обнаружения MDSC, связывающих AFP (Патент РК, № 32074, 18.04.2017).

Основные результаты исследования и выводы:

1 Моделирование местного хронического воспаления у мышей (адьювантный артрит) сопровождается повышением уровня гранулоцитарных ($CD11b^+Ly6G^{high}$) и моноцитарных ($CD11b^+CD49d^+$) миелоидных супрессорных клеток (MDSC) в селезенке, что свидетельствует о том, что MDSC являются важным компонентом развития хронического воспаления.

2 Ночное освещение (световой стресс) вызывает повышение уровня как гранулоцитарных, так и моноцитарных MDSC, экспрессирующих молекулы CD62L и CD195, ответственные за миграцию MDSC в селезенку и очаг воспаления. При этом в крови повышается уровень провоспалительных (IL-6) и противовоспалительных (TGF β) цитокинов. Сочетание светового стресса с адьювантным артритом приводит к существенному увеличению уровня MDSC у мышей.

3 Местное хроническое воспаление приводит к ускорению роста опухоли, сопровождающегося продукцией провоспалительных факторов S100 и TNF α и повышенным уровнем субпопуляции MDSC. При этом обе субпопуляции MDSC характеризуются повышенной экспрессией CD62L. В экспериментах *in vitro* установлено, что TNF α усиливает экспрессию CD62L костномозговыми MDSC и их супрессорную активность в отношении CD8 $^+$ Т-лимфоцитов.

4 Впервые установлено, что онкофетальный белок альфа-фетопротеин избирательно связывается с субпопуляциями миелоидных супрессорных клеток. Химический конъюгат альфа-фетопротеина с даунорубицином оказывает селективное цитотоксическое действие на субпопуляцию моноцитарных MDSC в условиях *in vitro*, а при введении *in vivo* существенно снижает уровень MDSC, повышает уровень NK-клеток, что сопровождается значительным снижением роста подкожной опухоли Эрлиха и повышением выживаемости опухоленесущих мышей.

Все задачи, поставленные в диссертации выполнены.

Основные положения, выносимые на защиту диссертации:

1 Хроническое воспаление вызывает накопление супрессорных MDSC в селезенке.

2 Световой стресс повышает уровень MDSC с миграционным потенциалом через усиление экспрессии адгезивных молекул CD62L и CD195.

3 MDSC, индуцированные хроническим воспалением, ускоряют рост опухоли.

4 Провоспалительный цитокин TNF α усиливает супрессорную активность и экспрессию адгезивной молекулы CD62L в MDSC *in vitro*.

5 AFP специфически связываются с MDSC, полученными от мышей с опухолями.

6 Конъюгат AFP-DR оказывает избирательное цитотоксическое действие на субпопуляцию M-MDSC *in vitro*.

7 Конъюгат AFP-DR способен избирательно удалять MDSC у мышей с опухолями, что коррелирует с уменьшением роста опухоли и повышением уровня NK-клеток.

Уровень исследования темы. Исследования в диссертации выполнены на клеточном и молекулярном уровнях с использованием экспериментальных моделей.

Личный вклад автора. Автор самостоятельно провел анализ литературных данных по теме исследования, экспериментальные исследования, статистическую обработку и анализ полученных результатов, а также написание и оформление диссертационной работы.

Связь с планом основной научной работы. Диссертация выполнена в рамках проектов: 244/ГФЗ «Влияние элиминации миелоидных супрессорных клеток цитотоксическими конъюгатами альфа-фетопротеина на противоопухолевый иммунитет и рост опухоли в эксперименте» (2013-2015 гг) и AP05131710 «Фармакологические подходы к коррекции миелоидных супрессорных клеток (MDSC) для подавления хронического воспаления как стимулятора роста опухоли в эксперименте» (2018-2020 гг.) Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены и обсуждены на следующих международных научных конференциях:

- Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби Алем», 14-16 апреля 2015 года, Алматы, Казахстан;

- Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы биотехнологии: от лабораторных исследований до производства», 5-6 апреля 2016 года, Алматы, Казахстан;

- Международная научная конференция «Biomedical innovation for healthy longevity», 25-28 апреля 2016 года, Санкт-Петербург, Россия;

- IV Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби Алем», 10-11 апреля 2017 года, Алматы, Казахстан;

- V Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби Алем», 10-11 апреля 2018 года, Алматы, Казахстан;

- Международная научная конференция «Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine», 31 октября - 2 ноября 2018 года, Прага, Чехия;

- Международная научная конференция «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий», 8-11 октября 2019 года, Санкт-Петербург, Россия.

- Международная научная конференции молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии», 28-29 ноября 2019 года, Алматы, Казахстан

Публикации. Результаты диссертации представлены в 14 публикациях, в том числе в 3 международных журналах с импакт-фактором, указанных в базе данных *Web of Science* и *Scopus*; в 4 статьях в отечественных журналах, рекомендованных комитетом по контролю в сфере образования и науки Республики Казахстан; в 3 тезисах на международных конференциях зарубежных стран; в 4 тезисах докладов на международных конференциях Республики Казахстан, и 1 отечественный патент на изобретение.

Объём и структура диссертации. Диссертационное исследование написано на 120 страницах и состоит из следующих разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, заключение, список использованных источников из 267 наименований; содержит 46 рисунок, 1 таблицу и 2 приложение.