

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ТРОИЦКАЯ ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

**Разработка противоопухолевых подходов с использованием индукторов
иммуногенной клеточной гибели**

Направление подготовки 06.06.01 Биологические науки

Направленность 03.01.03 Молекулярная биология

Аспирант _____ О. С. Троицкая

Научный руководитель _____ д.б.н. О. А. Коваль

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель: **Коваль Ольга Александровна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск, Россия.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность.

Устоявшееся мнение, о том, что для успешного уничтожения опухолевых клеток предпочтительна гибель по пути апоптоза без активации иммунной системы, в последнее время было пересмотрено. Одной из успешных противоопухолевых стратегий, отличных от хирургического вмешательства, является стратегия «двойного действия», когда, с одной стороны, противоопухолевый препарат напрямую индуцирует гибель большинства раковых клеток, а с другой стороны, погибающие клетки активируют иммунную систему, формируя специфический иммунный ответ на опухолевые антигены, что ведет к уничтожению оставшихся опухолевых клеток. Таким требованиям удовлетворяют индукторы иммуногенной клеточной гибели (immunogenic cell death, ICD), к которым относят противоопухолевые препараты и подходы с различными механизмами действия: традиционные химиопрепараты, белковые агенты, онколитические вирусы, методы фотодинамической и радиотерапии, а также холодную плазму. Иммуногенную клеточную гибель можно определить по активации определенной комбинации сигналов (аларминов) от погибающих опухолевых клеток, что способствует их узнаванию и поглощению антиген-презентирующими клетками. К основным молекулярным событиям, позволяющим говорить об индукции ICD, относят экспозицию кальретикулина и белка теплового шока HSP70 на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны клетки, а также выход ядерного белка HMGB1 и АТФ в межклеточное пространство [1,2]. Клетки с активированными маркерами ICD активно подвергаются поглощению фагоцитирующими клетками, а процессинг и презентация опухолевых антигенов дендритными клетками запускает активацию антиген-специфических Т-лимфоцитов, что ведет к появлению адаптивного иммунного ответа против таких антигенов [3]. Активация иммуногенной гибели опухолевых клеток способствует формированию адаптивного противоопухолевого иммунного ответа. Клетки, погибающие по пути ICD, при трансплантации сингенным иммунокомпетентным животным оказывают противоопухолевый вакцинирующий эффект [4]. Развитие специфического иммунного ответа в отношении антигенов погибающих опухолевых клеток позволяет использовать терапевтические индукторы ICD как для борьбы с метастазирующими опухолями, так и для разработки подходов противоопухолевой иммунизации [5]. Следовательно, исследование противоопухолевых подходов на основе индукторов иммуногенной клеточной гибели является актуальной задачей.

Цель и задачи исследования.

Целью настоящей работы являлась разработка новых подходов индукции иммуногенной клеточной гибели под действием рекомбинантного аналога лактапина RL2, рекомбинантного вируса осповакцины, кодирующего лактапин и холодной плазменной струи в опухолевых клетках *in vitro* и в экспериментах по противоопухолевой вакцинации *in vivo*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование активации маркеров иммуногенной клеточной гибели под действием рекомбинантного аналога лактапина RL2.
2. Оценка эффективности противоопухолевой вакцинации клетками, погибающими в результате воздействия RL2.
3. Анализ усиления противоопухолевого иммунного ответа, вызванного RL2-обработанными клетками, при применении ингибиторов индоламин-2,3-диоксигеназы.
4. Исследование активации маркеров иммуногенной клеточной гибели в клетках, инфицированных рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact.
5. Оценка эффективности противоопухолевой вакцинации клетками, инфицированными рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact.
6. Исследование маркеров иммуногенной клеточной гибели в клетках, облученных холодной плазменной струей(ХПС).

Научная новизна.

В настоящее время иммунотерапия стала одной из наиболее быстро развивающихся областей терапии онкологических заболеваний. Одним из перспективных подходов является индукция гибели опухолевых клеток препаратами с активацией противоопухолевого иммунного ответа в отношении раковых клеток, избежавших гибели при непосредственном воздействии цитостатика. Противоопухолевая вакцинация является одной из важных стратегий, поскольку иммунная система способна узнавать опухолевые антигены [6,7].

Апоптоз-индуцирующие белки могут быть основой для разработки новых противоопухолевых препаратов [8]. Было показано, что рекомбинантный аналог цитотоксического белка лактапина из молока человека (RL2) вызывает гибель опухолевых клеток с признаками апоптоза и митофагии [9–11]. Было обнаружено, что в клетке основным белком-партнером RL2 является митохондриальный белок TOM70 [9].

Рекомбинантные онколитические вирусы, несущие трансгены с различной активностью, могут отличаться по эффективности противоопухолевого действия. Продукты экспрессии встраиваемых трансгенов могут непосредственно активировать гибель опухолевых клеток, тормозить рост опухоли или активировать иммунную систему [12]. Использование в качестве трансгенов генов апоптоз-индуцирующих белков может давать преимущество таким рекомбинантным вирусам в качестве противоопухолевых агентов. Для усиления противоопухолевых свойств вируса осповакцины генно-инженерным путем были сконструированы рекомбинантные вирусы VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo, кодирующие ГМ-КСФ человека и проапоптотические белки лактаптин и апоптин, соответственно. В лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН было показано, что эти рекомбинантные вирусы эффективно подавляют рост солидных опухолей при внутриопухолевом и внутривенном введении в экспериментах *in vivo* [13]. Ранее было показано, что рекомбинантные вирусы осповакцины VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo, кодирующие ГМ-КСФ человека и лактаптин или апоптин, соответственно, вызывают лизис опухолевых клеток *in vitro* с большей эффективностью, чем вирус VV-GMCSF-dGF, кодирующий только ГМ-КСФ [13].

Известно, что физико-химические противоопухолевые подходы, такие как холодная плазма, так же способны индуцировать иммуногенную клеточную гибель. Были проведены исследования цитотоксичности холодной плазменной струи, разработанной в ИФП СО РАН, по отношению к клеткам аденокарциномы легкого [14].

Тем не менее, иммуногенность клеточной гибели, индуцированной RL2, VV-GMCSF-Lact и холодной плазменной струей, разработанной в ИФП СО РАН, ранее не была изучена. В данной работе впервые было показана способность рекомбинантного аналога лактаптина RL2, рекомбинантного вируса осповакцины и облучения ХПС индуцировать гибель опухолевых клеток по иммуногенному типу.

Впервые показан эффект противоопухолевой вакцинации опухолевыми клетками, обработанными RL2. Впервые установлено, что ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы способен усиливать вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток.

Впервые показано, что вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток выше, чем вакцинирующий эффект опухолевых клеток, зараженных рекомбинантным вирусом осповакцины. Показано, что введение гена лактаптина в геном вируса осповакцины не влияет на способность вируса индуцировать гибель клеток по иммуногенному типу.

Впервые показано увеличение уровня одного из маркеров иммуногенной клеточной гибели - белка HMGB1 в сыворотке крови животных-опухоленосителей после облучения опухолей холодной плазменной струей.

Теоретическая и практическая значимость.

В данной работе были исследованы новые потенциальные индукторы иммуногенной клеточной гибели трех различных типов. Подтверждена их способность к индукции ICD *in vitro* и разработаны новые методы усиления противоопухолевого эффекта при воздействии на иммуносуппрессивное микроокружение опухоли. Полученные результаты вносят существенный вклад в выявление закономерностей механизма противоопухолевого действия индукторов иммуногенной клеточной гибели. Новые данные об особенностях индукции гибели опухолевых клеток под действием рекомбинантного аналога лактапина RL2 и рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующего лактапин, закладывают практическую основу для направленной разработки новых противоопухолевых агентов на основе лактапина, а также для внедрения этих подходов в клиническую практику.

Апробация работы. Публикации.

По результатам и проблематике настоящего исследования опубликовано 9 работ и 1 в печати, из них: 3 статьи опубликованы в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК, 1 находится в печати и 6 тезисов конференций (докладчик-Троицкая О.С.).

1. Koval O.A., Kochneva G.V., **Troitskaya O.S.**, Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., Nushtaeva A.A., Kuligina E.V., Richter V.A, Recombinant Vaccinia Viruses Coding Transgenes of Apoptosis-Inducing Proteins Enhance Apoptosis But Not Immunogenicity of Infected Tumor Cells, BioMed Research International, 2017, V. 2017, Article ID 3620510, DOI: 10.1155/2017/3620510

2. **Troitskaya, O.**; Varlamov, M.; Nushtaeva, A.; Richter, V.; Koval, O. Recombinant Lactaptin Induces Immunogenic Cell Death and Creates an Antitumor Vaccination Effect in Vivo with Enhancement by an IDO Inhibitor. Molecules 2020, 25, 2804, doi:10.3390/molecules25122804.

3. **Troitskaya, O.**; Golubitskaya, E.; Biryukov, M.; Varlamov, M.; Gugin, P.; Milakhina, E.; Richter, V.; Schweigert, I.; Zakrevsky, D.; Koval, O. Non-Thermal Plasma Application in Tumor-Bearing Mice Induces Increase of Serum HMGB1. IJMS 2020, 21, 5128, doi:10.3390/ijms21145128.

4. **Троицкая О.С.**, Новак Д.Д., Рихтер В.А., Коваль О.А. Иммуногенная гибель опухолевых клеток в терапии онкологических заболеваний. ActaNaturae 2021 (в печати).

5. **Troitskaya O.S.**, Tkachenko A.V., Kochneva G.V., Richter V.A., Koval O.A., Induction of the immunogenic type of cell death by recombinant lactaptin analogues, Febs Open Bio 2018, V. 8, N 1, P.294, DOI: 10.1002/2211-5463.12453 (доклад на конференции 18th

FEBS Young Scientists' Forum and 43rd FEBS Congress: Biochemistry Forever, 4-12 July 2018, Prague, Czech Republic)

6. **О. С. Троицкая**, А. В. Ткаченко, Г. В. Кочнева, В. А. Рихтер, О. А. Коваль, Индукция иммуногенного апоптоза рекомбинантными вирусами осповакцины, продуцирующими апоптоз-индуцирующие белки, X Всероссийский с международным участием конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия-2017», 25-28 октября 2017

7. **Troitskaya O.S**, Tkachenko A.V., Nushtaeva A.A., Kochneva G.V., Richter V.A., Koval O.A. Activation of the immune system by recombinant vaccinia virus coding lactaptin and human GM-CSF, международный молодежный форум Advance Course «Current Advances in Pathogen Research», 25-30 марта 2019, Ереван, Армения.

8. **Троицкая О.С.**, Варламов М.Е., Нуштаева А.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Коваль О.А. «Активация иммунной системы рекомбинантным вирусом осповакцины, кодирующим лактаптин и ГМ-КСФ человека», Мультиконференция «Биотехнология-медицине будущего», 29 июня-02 июля 2019, г. Новосибирск

9. **Troitskaya O.**, Varlamov M., Bagamanshina A., Kuligina E., Richter V., Koval O. «IDO inhibitors enhance antitumor vaccination effect of lactaptin-treated cancer cells», 27th Conference of the European Cell Death Organization, entitled «Cell death and Regeneration» 25-27 сентября 2019, Дрезден, Германия

10. **Troitskaya O.**, Varlamov M., Kuligina E., Richter V., Koval O. «IDO inhibitors increase the antitumor immunity of ICD-dying cells», Febs Open Bio 2021, V. 11, S 1, P. 401, DOI: 10.1002/2211-5463.13205 (доклад на конференции 45й FEBS Congress «Molecules of life: Toward new horizons», 3-8 July 2021, онлайн-формат)

Вклад автора.

Основная часть работы была выполнена автором лично, либо с ее непосредственным участием. Эксперименты на мышах были проведены совместно со студентами и аспирантами лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН. Эксперименты по исследованию свойств холодной плазмы были проведены в Институте физики полупроводников совместно с д.ф.-м.н. Закревским Д.Э. (ИФП СО РАН) и д.ф.-м.н. Швейгерт И.В. Клеточную сортировку проводили совместно с сотрудником лаборатории иммуногенетики ИМКБ СО РАН к.б.н. Кулемзиным Сергеем Викторовичем.

Благодарности.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, старшему научному сотруднику лаборатории биотехнологии, д.б.н. Ольге Александровне Коваль за плодотворную работу и чуткое руководство, руководителю лаборатории биотехнологии к.б.н. Владимиру Александровичу Рихтеру за помощь в обсуждении результатов, к.б.н. Василию Ивановичу Каледину, д.ф.-м.н. Закревскому Дмитрию Эдуардовичу и Швейгерт Ирине Вячеславовне за помощь в работе с холодной плазменной струей, а также всем сотрудникам лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН за постоянную поддержку и помощь в экспериментах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В работе использовали полученные и очищенные ранее аналог лактапина RL2 и рекомбинантные вирусы осповакцины VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo [8,13,15]. При исследовании индукции иммуногенной клеточной гибели *in vitro* использовали современные молекулярно-биологические методы. Для оценки экспрессии калретикулина в клетках проводили выделение суммарной ДНК реагентом Trizol®, осуществляли реакцию ОТ-ПЦР (амплификатор IQ™5, Bio-Rad, США) со специфическими праймерами (CRT, GAPDH), для расчетов использовали метод порогового цикла ($\Delta\Delta C_t$ метод): относительный уровень мРНК рассчитывали как соотношение между средними значениями целевого и референсного генов для каждого образца. Нормализованная экспрессия мРНК гена CRT в необработанных клетках была принята за 100%.

Все эксперименты по проточной цитометрии были выполнены с использованием проточного цитометра FACSCanto II (BD Biosciences, США), а данные были проанализированы с помощью программного обеспечения FACSDiva Software (BD Biosciences). Перед началом анализа выделяли популяцию (P1) на основе данных прямого и бокового рассеяния, чтобы исключить клеточный дебрис, после чего собирали не менее десяти тысяч событий. Процесс транслокации белка на внешнюю плазматическую мембрану (CRT, HSP70) детектировали с помощью антител к поверхностному антигену. Клетки открепляли от пластиковой подложки, осаждали центрифугированием и последовательно инкубировали с моноклональными антителами к CRT или HSP70 и вторичными антителами, конъюгированными с флюоресцентным красителем без фиксации и пермиабиллизации клеток. Окрашивание погибающих клеток перед трансплантацией мышам проводили при помощи набора Annexin V/PI (BD, США).

Для исследования изменения уровня АТФ под действием RL2 использовали образцы культуральной среды после обработки препаратами. Анализ количества АТФ в образцах среды проводили с помощью набора ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement (Promega, США) и анализировали на мультифункциональном люминометре/флуориметре CLARIOstar (BMG Labtech, Германия).

Для количественного определения HMGB1 в культуральной среде или в сыворотке мышей использовали набор для иммуноферментного анализа (IBL International, Германия). Образцы готовили в соответствии с протоколами производителя, и их

оптическую плотность определяли с помощью многоканального спектрофотометра Apollo LB912 (Berthold Technologies, TN, США) при 450 нм (референсная длина волны 620 нм).

Общий клеточный кальретикулин, HMGB1, тубулин, актин, GAPDH определяли с помощью вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител к исследуемым белкам и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Сигнал проявляли при помощи люминисцентного субстрата Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen, США) и детектировали сигнал на приборе GE Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, США)

Перитонеальные макрофаги мышей СЗН/Не выделяли и метили зеленым флуоресцентным красителем цитоплазмы (CellTracker™ Green CMFDA Dye, Invitrogen, США). Клетки МХ-7 окрашивали красным красителем цитоплазмы CellTracker™ Red CMTPX Dye (Invitrogen, США), после чего фагоцитоз оценивали путем совместного культивирования макрофагов с клетками МХ-7 с последующим анализом флуоресцентной микроскопией (флуоресцентный микроскоп Axioscop 2 PLUS (Carl Zeiss, GmbH).

Для оценки эффекта вакцинации *in vivo* клетки МХ-7 инкубировали с потенциальным индуктором ICD в течение 24 ч. После инкубации клетки открепляли от подложки, суспензию клеток разводили до необходимой концентрации ($5 \cdot 10^5$ - $7 \cdot 10^5$ клеток/мышь в зависимости от эксперимента) в физиологическом растворе (100 мкл) для введения мышам СЗН/Не и трансплантировали подкожно в один бок. Мышам контрольной группы аналогично вводили живые необработанные опухолевые клетки МХ-7. Через 8-10 дней после первой трансплантации всем мышам СЗН/Не перевивали подкожно необработанные клетки МХ-7 в дозе $5 \cdot 10^5$ - $7 \cdot 10^5$ клеток/мышь. Для оценки эффективности противоопухолевой иммунной реакции в качестве критериев были выбраны выживаемость, динамика роста опухолевого узла после повторной трансплантации и количество животных без опухоли. Кривые выживаемости Каплана – Майера и статистику Log-Rank рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (Сан-Диего, Калифорния, США).

Для усиления противоопухолевого эффекта RL2-обработанных клеток использовали ингибиторы индоламин-2,3-диоксигеназы – этилпируват и 1-метилтриптофан. Мышам СЗН/Не, через 3 дня после трансплантации RL2-обработанных клеток внутрибрюшинно вводили этилпируват (40 мг/кг, Sigma), всего 4 инъекции каждые 12 часов. Для каждого эксперимента раствор этилпирувата (2 мг/мл) разводили раствором Рингера («Медполимер», Россия) до концентрации 40 мг/кг. Контрольной группе вводили раствор Рингера по той же схеме. 1-метилтриптофан для лечения и усиления вакцинирующего

эффекта растворяли в 0,5% метилцеллюлозе с добавлением 0,5% Tween 80. Мышам проводили 10 внутрижелудочных инъекций 1-МТ (400 мг/кг).

РВМС выделяли из цельной крови мышей с использованием Histopaque®1083 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). Затем клетки дважды промывали PBS с последующей инкубацией в течение 1 часа с антителами к IgG мыши: CD45 PerCP / Cy5.5, CD19 APC, CD3 FITC, CD25 PE и CD8a PE.

В работе использовался источник струи холодной плазмы, описанный в работе [16]. Источником плазмы служил кварцевый разрядный канал с питаемым электродом внутри и внешним кольцевым заземленным электродом над диэлектрической трубкой. На электроды подавался сигнал синусоидального напряжения с частотой ~ 40 кГц и амплитудой до 10 кВ. В возбуждающий объем помещался диэлектрический капилляр диаметром 2,3 мм. При подаче напряжения на электроды и расходе гелия 1–10 л/мин разряд зажигался, образуя холодную плазменную струю. Типичные значения параметров разряда следующие: расход газа $v = 9$ л/мин, амплитуда напряжения $U = 4,9$ кВ, ток разряда I до 12 мА, длительность полуширины тока 15 нс, энергия в импульсе до 12 мкДж. В данной работе использовали прямую обработку клеток ХПС, при этом клетки на подложке в культуральной среде в 96-луночном планшете обрабатывали ХПС в течение 1 минуты, после чего клетки снимали с подложки и анализировали (CRT, HSP70, HMGB1) или использовали образцы среды от обработанных клеток для анализа уровня АТФ и HMGB1 после облучения ХПС.

Цитокины сыворотки измеряли с помощью набора для анализа ELISA Array Kit MEM-004A (Qiagen, США), где уровень IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 α , INF- γ , TNF- α , G-CSF и GM-CSF могут быть оценены. Кровь мышей выделяли через 1 час после второго облучения ХПС и выделяли сыворотку крови путем 30-минутной коагуляции при 37°C и центрифугирования при 4000 об/мин 10 мин. Образцы сыворотки разбавляли в 8 раз для последующего анализа. Разбавленные образцы загружали в 96-луночный планшет для ИФА и анализировали в соответствии с инструкциями производителя. Значения уровня цитокинов из сыворотки крови мышей, облученных ХПС, были нормализованы к значениям контрольных здоровых мышей, не получавших облучения (100%) и представлены как относительное количество (% от контроля).

Для анализа уровня HMGB1 в сыворотке крови мышей, облученных ХПС, СЗН/Не мышей-носителей подкожно трансплантированной опухоли МХ-7 (5×10^5 клеток в 100 мкл PBS на животное) перед облучением ХПС анестезировали инъекциями раствора авертина (0,2% 2,2,2-трибромэтанол, 0,2% 2-метилбутанол в 0,9% NaCl). Авертин (400 мкл) вводили мышам внутривентрально, и через 5 минут мыши погружались в сон.

Контрольная группа мышей без опухоли и мыши СЗН/He с опухолями со средним размером опухоли 50 мм³ получали два курса ХПС-облучения. В эксперименте задействовали 3 группы мышей: здоровые мыши, здоровые мыши, облученные ХПС, мыши-опухоленосители, облученные ХПС. Зона облучения мышей с опухолью была такой же, как и у здоровых мышей. Через 1-24 ч после второго облучения проводили забор крови и делали сыворотку, как описано выше. Для измерения температуры над обработанной мышью помещали тепловизор Testo 872 (Testo AG, Германия). Мышей облучали ХПС в течение 1 мин при напряжении $U = 4,9$ кВ, токе $I = 7$ мА, длительности полуширины тока 15 нс и энергии импульса ~ 7 мкДж.

Результаты и обсуждение

Для разработки противоопухолевых подходов рассматривали несколько потенциальных индукторов иммуногенной клеточной гибели: рекомбинантный аналог лактапина RL2, рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующий ГМ-КСФ человека и лактапин, и холодную атмосферную плазменную струю. Исследование возможности применения данных подходов в качестве индукторов иммуногенной гибели клеток проводили в двух направлениях: изучение изменений маркеров иммуногенной клеточной гибели *in vitro* и оценка эффекта вакцинации опухолевыми клетками, погибающими по пути ICD в результате воздействия индуктора в экспериментах *in vivo* с применением дополнительных активаторов иммунной системы или самостоятельно.

1. Рекомбинантный аналог лактапина RL2

Исследование индукции иммуногенной клеточной гибели рекомбинантным аналогом лактапина RL2 *in vitro*

Исследование экспрессии мРНК *CRT* в клетках, обработанных RL2, проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для эксперимента использовали культуры клеток MCF-7, MDA-MB-231 и MX-7. На рисунке 1 представлены данные по величине экспрессии *CRT* в различных клеточных линиях. В качестве препарата сравнения был выбран известный индуктор иммуногенной гибели клеток доксорубин (Dox). В работе [4] было показано, что доксорубин индуцирует иммуногенный апоптоз *in vivo*, что ведет к формированию противоопухолевого иммунного ответа у экспериментальных животных.

В результате исследования изменения уровня мРНК *CRT* при инкубации с RL2 было установлено, что RL2 вызывает снижение экспрессии мРНК кальретикулина в клетках MDA-MB-231 и MX-7 через 5-24 ч по сравнению с необработанными клетками. В

обработанных RL2 клетках MCF-7 значение относительного уровня мРНК CRT достоверно не отличалось от значения для контрольных клеток. Обработка доксорубицином не вызывала достоверного изменения экспрессии уровня мРНК CRT по сравнению с уровнем мРНК в контрольных клетках MDA-MB-231 и MCF-7 после 5 ч инкубации, но вызывала снижение через 24 ч инкубации. Для клеток рабдомиосаркомы мышей MX-7 снижение экспрессии мРНК CRT наблюдали через 5-24 ч как для клеток, инкубированных с RL2, так и с доксорубицином. Таким образом, в обработанных клетках не было отмечено увеличения уровня мРНК CRT, которое могло бы вести к увеличению уровня его белкового продукта в клетках.

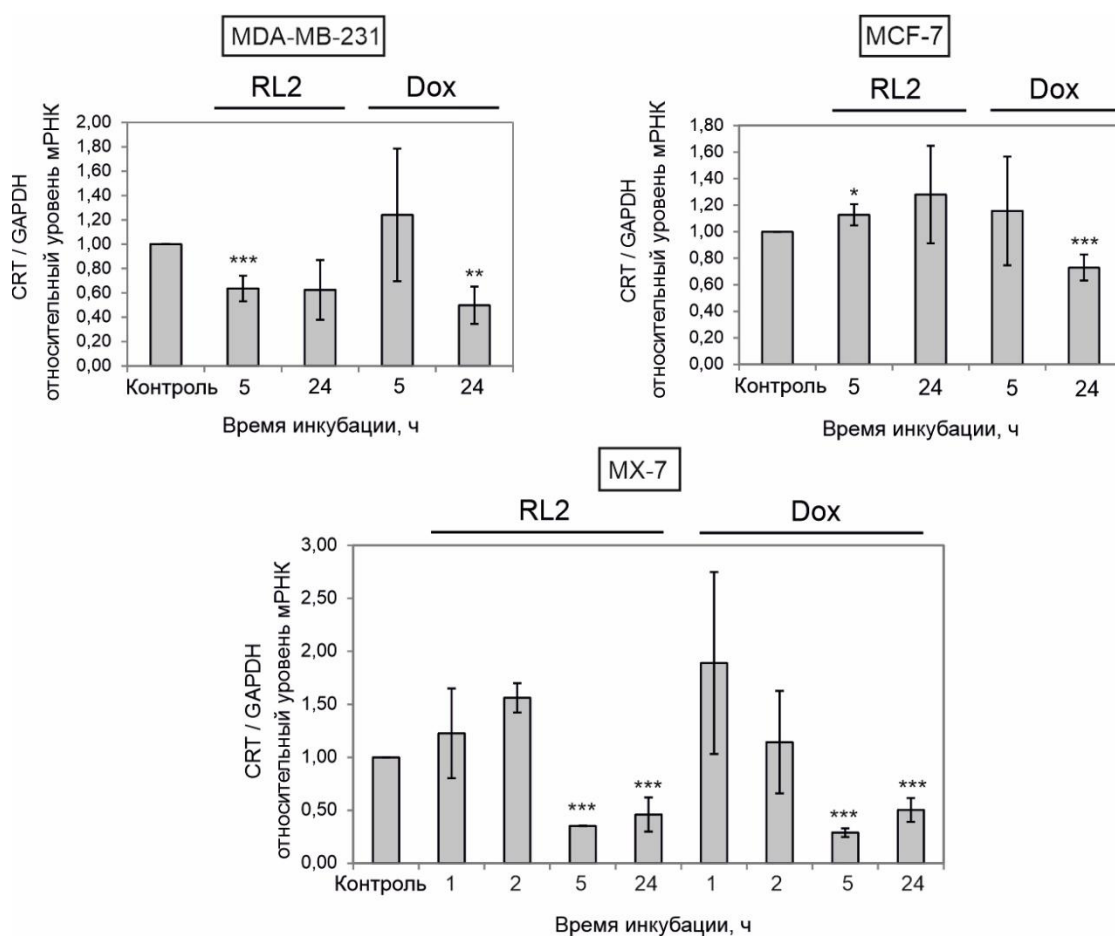


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК CRT в клетках, обработанных RL2 или Dox (данные ОТ-ПЦР в реальном времени). Относительное количество мРНК CRT было нормализовано к мРНК GAPDH.

Исследование уровня белка кальретикулина в клетках, обработанных RL2, проводили методом вестерн-блота с использованием моноклональных антител к кальретикулину. Для эксперимента использовали культуры клеток MDA-MB-231 и MX-7, которые обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл) или доксорубицином (0.2 мкМ) в качестве

препарата сравнения. В результате обработки RL2 уровень CRT незначительно снижался через 8 ч инкубации как в клетках MDA-MB-231, так и в клетках MX-7 (рис. 2). Доксорубин не влиял на количество CRT в клетках MDA-MB-231, но вызывал увеличение CRT в клетках MX7 через 8-24 ч инкубации. Таким образом, в клетках, обработанных рекомбинантным лактаптином RL2, не было отмечено увеличения уровня белка CRT, что согласуется с данными по экспрессии CRT мРНК.

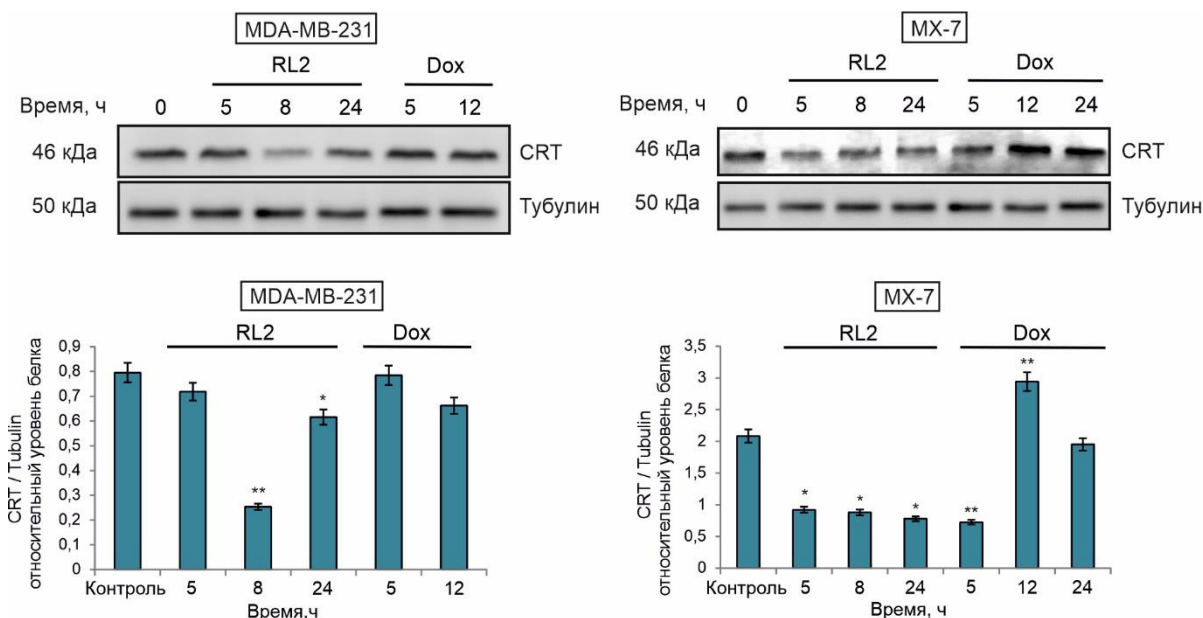


Рис. 2. Динамика изменения общего CRT в клетках MDA-MB-231 и MX-7, обработанных RL2 или доксорубицином (Dox). Вестерн-блоттинг и относительное количественное определение общего клеточного CRT в клетках. β -тубулин использован в качестве нормировочного контроля.

Анализ транслокации CRT на внешнюю клеточную мембрану проводили на линиях клеток MDA-MB-231, MCF-7 MX-7 методом проточной цитометрии без предварительной пермиабиллизации клеток перед окрашиванием. При анализе поверхностного кальретикулина можно видеть, что наиболее эффективно RL2 стимулирует транслокацию CRT на внешнюю плазматическую мембрану в клетках MDA-MB-231 и менее эффективно – в клетках MCF-7 (рис. 3). Стоит отметить, что наименьшее количество CRT⁺-клеток в образцах, обработанных доксорубицином, также наблюдается в клетках MCF-7 (рис. 3). Увеличение времени инкубации клеток с RL2 (или с доксорубицином) ведет к увеличению популяции CRT⁺-клеток во всех исследованных культурах клеток (рис. 3 б). Клетки MCF-7 были довольно устойчивы к транслокации CRT после обработки RL2 и Dox. Сравнение базового уровня CRT в этих клеточных линиях показало его более низкую экспрессию в клетках MCF-7 (рис. 3 в, г).

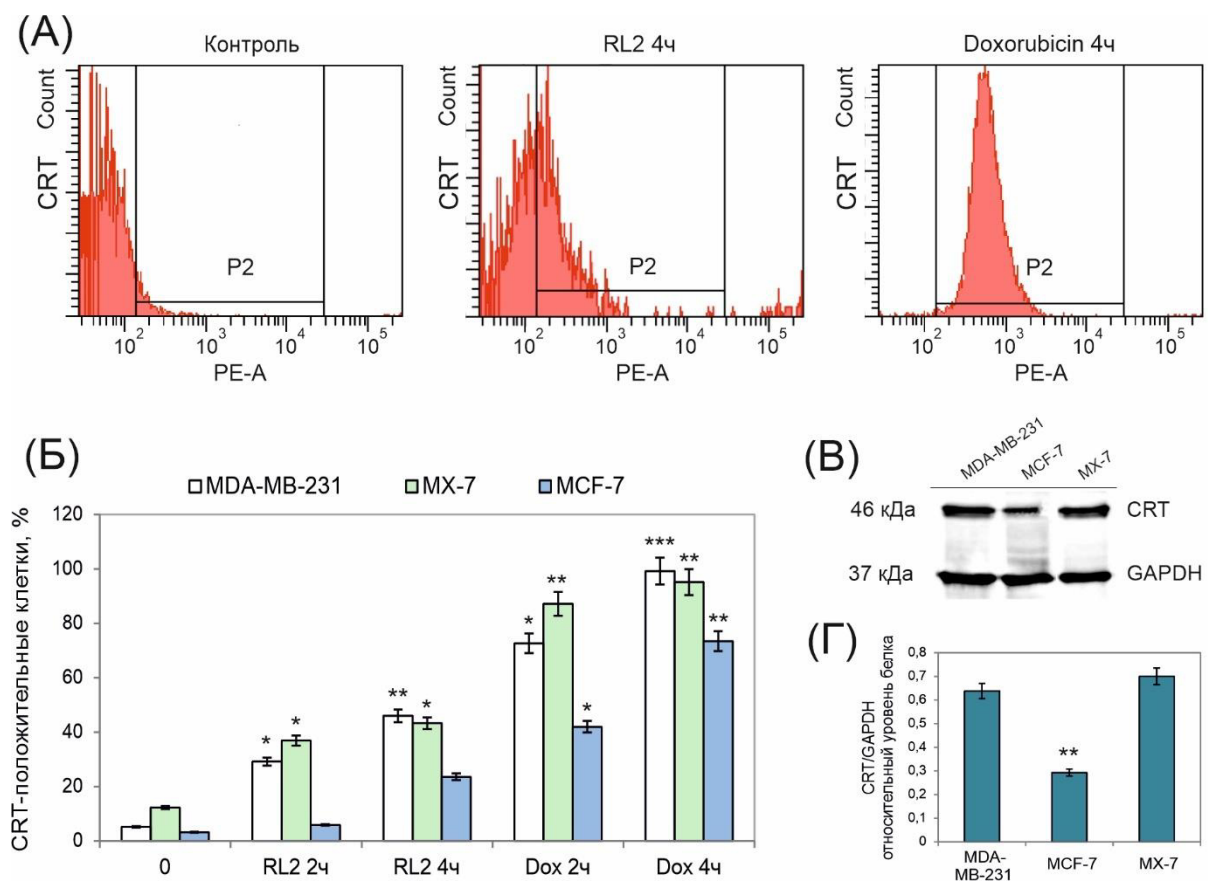


Рис. 3. Изменение уровня кальретикулина в RL2-обработанных клетках. Клетки обрабатывали RL2 (0,3 мг/мл) или доксорубицином (Dox, 0,1 мкг/мл или 0,2 мкМ) в течение указанного времени. (A) Репрезентативные изображения анализа проточной цитометрии экто-CRT (популяция P2) в клетках MDA-MB-231. (Б) Относительное количество CRT-положительных клеток (популяция P2) согласно данным проточной цитометрии для клеточных линий MDA-MB-231, MCF-7 и MX-7. (B, Г) Вестерн-блот анализ клеточного базального уровня CRT (репрезентативный вестерн-блот и относительная количественная оценка CRT/GAPDH); Статистические различия между контрольной и экспериментальной группами обозначены * для $p < 0,05$; ** для $p < 0,01$, *** для $p < 0,001$.

Учитывая полученные данные о том, что инкубация клеток с рекомбинантным аналогом RL2 не ведет к увеличению экспрессии CRT как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции, можно сделать вывод, что увеличение популяции клеток с поверхностным CRT является результатом его RL2-стимулированной транслокации из эндоплазматического ретикулума (ЭПР), что является необходимым условием индукции иммуногенной клеточной гибели, — именно экспозиция кальретикулина на поверхности опухолевой клетки определяет захват опухолевых антигенов дендритными клетками [17]. CRT-положительные погибающие клетки, могут быть распознаны дендритными клетками

через рецептор CD91 с последующей презентацией антигенов и активацией Т-клеточного ответа [18]. Тот факт, что RL2 и доксорубин вызывали меньшую транслокацию CRT в обработанных клетках MCF-7 по сравнению с MCF-7 и MX-7, позволяет предположить, что более низкий базовый уровень CRT в MCF-7 влияет на уровень его возможной поверхностной экспозиции. Мы предполагаем, что клетки MCF-7, с меньшим уровнем транслокации CRT при инкубации с RL2 (рис. 3) могут вызвать менее выраженный эффект вакцинации *in vivo*. Действительно, Obeid с соавторами показали, что апоптоз клеток с низким исходным уровнем CRT является довольно толерогенным [19].

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

Экспозиция белка теплового шока HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану под действием RL2 *in vitro*

Транслокация белка теплового шока HSP70 на внешнюю клеточную мембрану при индукции клеточной гибели также является маркером ICD. Известно, что белки теплового шока группы HSP, в том числе HSP70, могут пассивно выделяться в межклеточное пространство и выполнять различные функции, взаимодействуя с соседними клетками [20]. Однако в ряде случаев показано, что HSP70 может быть экспонирован на внешней плазматической мембране клетки, где он взаимодействует с рецепторами CD91 на поверхности дендритных клеток, что необходимо для их созревания [21]. RL2-зависимую транслокацию HSP70 на внешнюю клеточную мембрану оценивали методом проточной цитометрии с применением специфических к HSP70 антител. Для анализа доли клеток с поверхностным HSP70, клетки MDA-MB-231 и MX-7 инкубировали с RL2, после чего анализировали на проточном цитометре. HSP70-позитивные популяции через 24 часа составили 66,2% для MDA-MB-231 и 56,2% для клеток MX-7 (рис. 4).

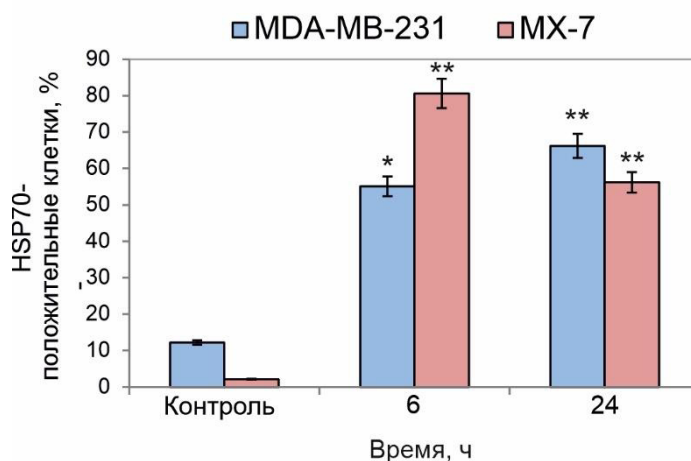


Рис. 4. Экспозиция белка теплового шока HSP70 под действием RL2. (А) Репрезентативные изображения данных проточной цитометрии клеток MDA-MB-231 через 24 ч инкубации с RL2 (0,3 мг/мл). (Б) Относительное количество HSP70-положительных клеток для клеточных линий MDA-MB-231 и MX-7

Изменение уровня внеклеточного АТФ под действием RL2 *in vitro*

Выход АТФ во внеклеточное пространство является одним из признаков иммуногенной клеточной гибели. Для анализа уровня внеклеточного АТФ, клетки MDA-MB-231 и MX-7 инкубировали с RL2 или доксорубицином в течение 4-24 часов, после чего образцы культуральной среды отбирали и анализировали методом иммуноферментного анализа с люминесцентным субстратом. Инкубация в течение 4 часов опухолевых клеток с RL2 не вызывала увеличения концентрации внеклеточного АТФ (рис. 5). Достоверное увеличение концентрации внеклеточного АТФ наблюдалось уже после 20 ч инкубации и далее увеличивалось со временем инкубации. На рисунке 5 можно видеть, что продолжительная инкубация клеток с RL2 ведет к достоверному увеличению внеклеточного АТФ по сравнению с контролем как в случае клеток MDA-MB-231, так и в случае клеток MX-7. В случае доксорубицина, достоверное увеличение АТФ наблюдалось только через 24 ч инкубации.

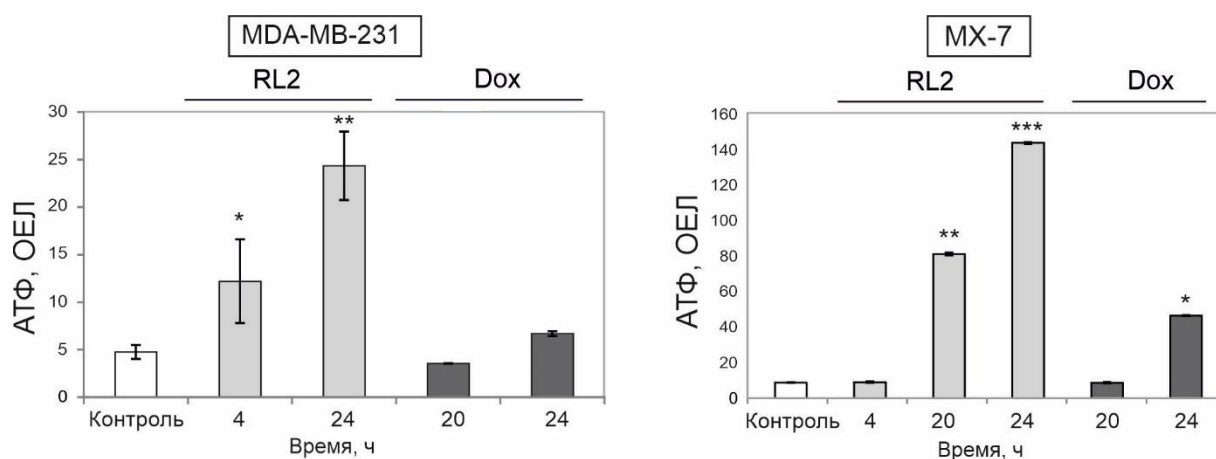


Рис. 5. Относительное количество АТФ в среде при культивировании клеток в присутствии RL2 и доксорубина. Клетки MDA-MB-231 и MX-7 инкубировали с RL2 (0,3 мг/мл) или доксорубином (0,2 мкМ) в течение 4-24 ч. ОЕЛ- относительные единицы люминисценции

Изменение уровня внеклеточного и клеточного HMGB1 под действием RL2 *in vitro*

В процессе иммуногенной клеточной гибели происходит выход белка HMGB1 во внеклеточное пространство. Это событие может быть детектировано как по изменению количества HMGB1 в культуральной среде методом иммуноферментного анализа (ИФА), так и по изменению суммарного клеточного HMGB1 по сравнению с контролем методом вестерн-блоттинга. Анализ внеклеточного HMGB1 после обработки RL2 показал, что RL2 вызывал высвобождение HMGB1 в культуральную среду после 12 ч инкубации (рис. 6 а, б). Анализ общего клеточного HMGB1 методом вестерн-блота подтвердил снижение внутриклеточного эндо-HMGB1: в процессе инкубации с RL2 происходило линейное уменьшение количества внутриклеточного эндо-HMGB1 (рис. 6 в-е). Таким образом, мы продемонстрировали, что уменьшение клеточного HMGB1 было связано именно с его высвобождением из обработанных клеток, а не, например, продуктивным протеолизом. Высокий уровень высвобожденного HMGB1 предпочтителен для ICD, поскольку позволяет эффективно активировать рецепторы TLR4 и RAGE на иммунных клетках, что является важным критерием, необходимых для запуска ICD [22].

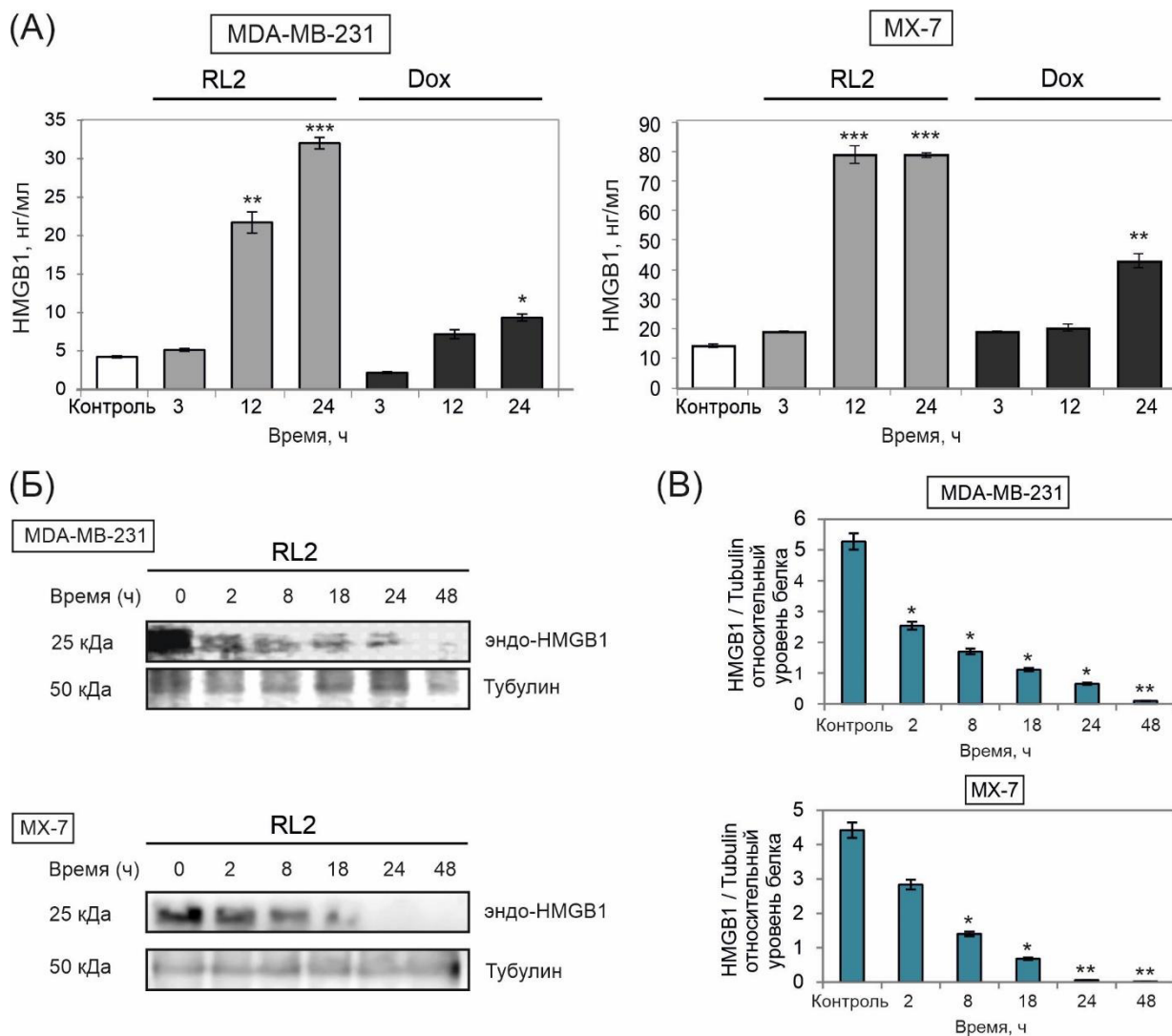


Рис. 6. Изменение уровня HMGB1 под действием RL2. Клетки MX-7 и MDA-MB-231 обрабатывали RL2 (0,3 мг / мл) или доксорубицином (0,1 мкг / мл) в течение 2–48 часов. (A) внеклеточный HMGB1 в клетках, обработанных RL2 и Dox; (Б) Клеточный эндо-HMGB1; вестерн-блот анализ суммарного клеточного HMGB1, представлены репрезентативные вестерн-блоты (Б) и рассчитанный относительный уровень белка HMGB1, нормированный на β -тубулин (В)

Таким образом, рекомбинантный аналог лактапина RL2 вызывал все молекулярные изменения, позволяющие говорить о иммуногенном типе клеточной гибели: транслокацию кальретикулина и HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану, выход АТФ и HMGB1 во внеклеточное пространство.

Фагоцитирующая активность перитонеальных макрофагов мыши в отношении опухолевых клеток, погибающих под действием RL2

Поскольку эффективное поглощение погибающих опухолевых клеток дендритными клетками и тканевыми макрофагами взаимосвязано с последующим долгосрочным противоопухолевым ответом, мы проанализировали, могут ли обработанные RL2 клетки быть поглощены макрофагами. Для этого макрофаги мышей СЗН/Не исследовали на их способность поглощать предварительно инкубированные с RL2 сингенные для этой линии мышей клетки MX-7 (рис. 7 а).

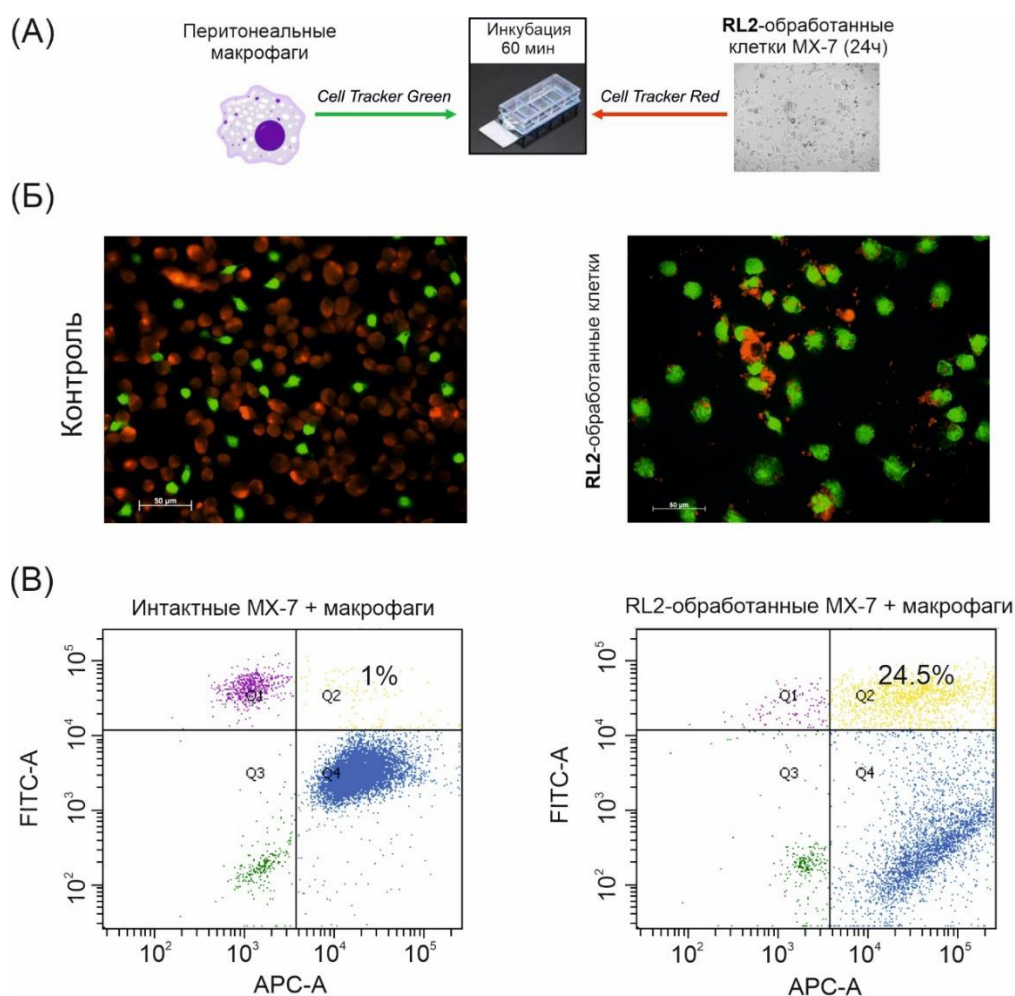


Рис. 7. Фагоцитоз клеток MX-7, обработанных RL2. (А) Схема эксперимента. Клетки MX-7, меченные красным флуоресцентным красителем обрабатывали RL2 (0,3 мг/мл) в течение 24 часов, а затем совместно инкубировали с перитонеальными макрофагами, меченными зеленым флуоресцентным красителем. Представлены репрезентативные изображения микроскопического (Б) и цитометрического анализа препаратов (В). Квадрант Q2 (в, г) соответствует дважды положительной зелено/красной популяции (фагоцитоз).

При анализе препаратов клеток методом флуоресцентной микроскопии мы наблюдали высокий уровень фагоцитоза клеток МХ-7, обработанных RL2, где большая часть красных сигналов (клетки МХ-7) локализовалась совместно с зелеными сигналами (макрофаги) (рис. 7. б). Относительную долю фагоцитирующих клеток оценивали с методом проточной цитометрии (рис. 7 в). Дважды положительная популяция (двойное зелено-красное свечение, квадрант Q2), соответствующая макрофагам, захватившим МХ-7 клетки или их фрагменты, составила около 24% для образцов клеток МХ-7, обработанных RL2, в отличие от 1% в контрольных образцах с интактными клетками МХ-7 (рис. 7. в).

Исследование эффекта вакцинации клетками, обработанными рекомбинантным аналогом лактапина RL2

Клетки, погибающие с активацией маркеров иммуногенной клеточной гибели, должны обладать эффектом противоопухолевой вакцинации. Поскольку было обнаружено, что препарат RL2 вызывает иммуногенную гибель клеток в культуре, важно было исследовать вакцинирующий эффект опухолевых клеток, предварительно обработанных RL2. Эксперименты проводили согласно стандартной схеме, которая рекомендована для исследования эффекта вакцинации, обусловленного иммуногенной клеточной гибелью (рис. 8). Клетки *in vitro* инкубируют с индуктором ICD и трансплантируют иммунокомпетентным животным подкожно без добавления адьюванта. Следующим этапом является вторая трансплантация живых опухолевых клеток той же линии через 7-10 дней; а контрольным животным дважды трансплантируют живые опухолевые клетки.

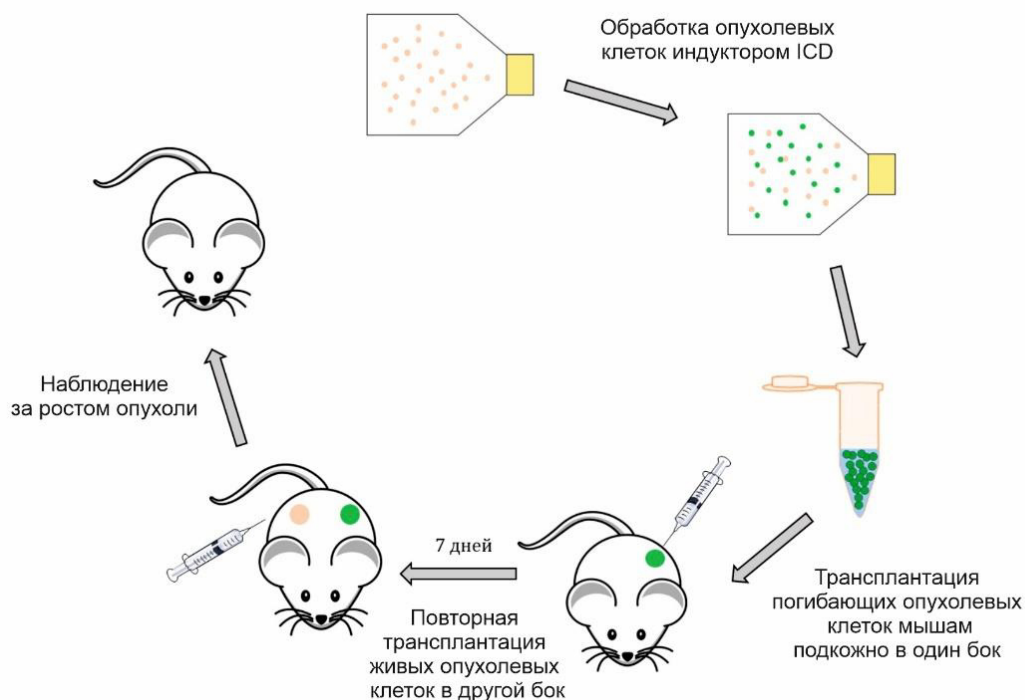


Рис. 8. Схема иммунизации мышей для исследования эффекта вакцинации опухолевыми клетками, обработанными индукторами ICD

Феномен иммуногенного апоптоза был продемонстрирован при сравнении терапевтического ответа на индукторы ICD у иммунокомпетентных и иммунодефицитных мышей. Сравнение эффекта вакцинации гибнущими опухолевыми клетками у иммунокомпетентных и иммунодефицитных животных позволяет провести сравнение эффективности ответа иммунной системы при вакцинации [5]. Поскольку в экспериментах *in vitro* мы показали, что RL2 индуцирует иммуногенный тип клеточной гибели в опухолевых клетках мыши MX-7 и опухолевых клетках человека MDA-MB-231, эти клеточные модели были предпочтительны для дальнейших экспериментов *in vivo*. Клетки рабдомиосаркомы мыши MX-7 туморогенны при трансплантации сингенным иммунокомпетентным мышам СЗН/Не, поэтому эту опухолевую линию можно считать подходящей моделью для исследования вакцинирующего под действием RL2 *in vivo*.

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

Для исследования эффекта вакцинации опухолевыми клетками с индуцированной в них ICD, важно, чтобы максимальное число из трансплантируемых клеток находилось в стадии гибели. Долю клеток MX-7 в состоянии гибели, после обработки RL2 или доксорубицином анализировали при окрашивании Аннексином V-FITC методом проточной цитометрии. Результаты анализа представлены на рисунке 9.

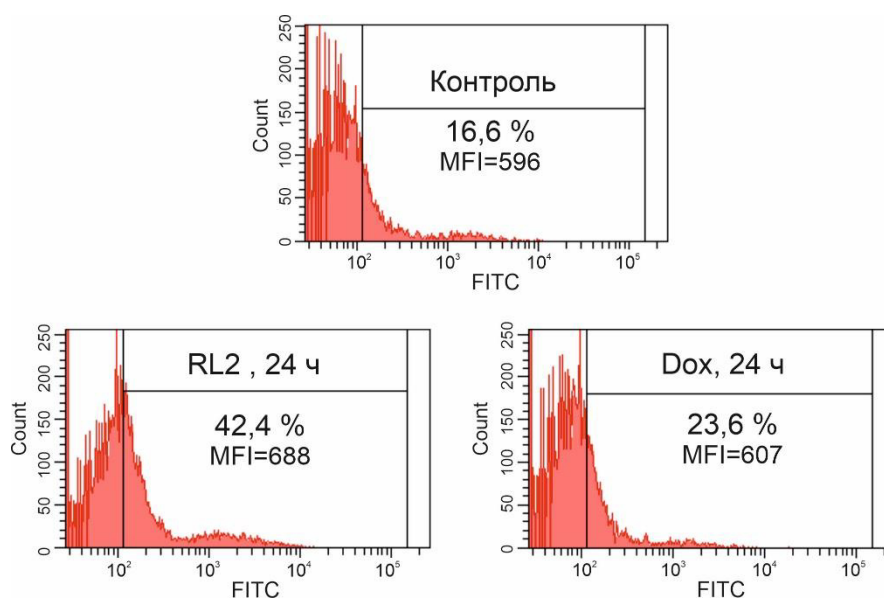


Рис. 9. Анализ доли клеток MX-7 с экспонированным фосфатидилсерином после обработки RL2 или Dox. Клетки MX-7 инкубировали с RL2 (0,3 мг/мл) или доксорубицином (0,2 мкМ) в течение 24 ч, затем образцы обрабатывали конъюгатом FITC-Annexin-V, после чего анализировали на проточном цитометре. Популяция P2 – популяция клеток с фенотипом Annexin V+

Можно видеть, что среди клеток, инкубированных с RL2 и предназначенных для трансплантации было 42,4% клеток с экспонированным фосфатидилсерином (Annexin V-положительных) и 23% среди клеток, инкубированных с доксорубицином. Увеличение длительности инкубации клеток с препаратами вела к увеличению доли клеток в состоянии вторичного некроза (Annexin V+/PI+), что по данным литературы является негативным фактором для противоопухолевой вакцинации такими клетками. Таким образом, для трансплантации использовали популяцию клеток, в которых только часть была Annexin V-положительной.

Оценка эффекта вакцинации при трансплантации клеток MX-7, обработанных RL2 или доксорубицином

Для анализа вакцинирующего эффекта трансплантации опухолевых клеток MX-7, обработанных RL2, обработанные клетки были трансплантированы подкожно мышам СЗННе. Экспериментальной группе подкожно вводили клетки, обработанные RL2, без адьюванта, а контрольным мышам вводили живые клетки (рис. 10 а). Животных с трансплантированными клетками, обработанными доксорубицином (0,2 мкМ, 24 ч), использовали в качестве положительного контроля. Через 10 дней после иммунизации трансплантировали живые клетки MX-7 в противоположный бок. Было обнаружено, что к

70-му дню иммунизации у 50% мышей в обеих группах - RL2 и Dox, не было опухолей в месте трансплантации живых опухолевых клеток (рис. 10 б). Выживаемость мышей в группе RL2 составила всего 70%, в группе Dox все мыши были живы (рис. 10 в). Средний объем опухоли в месте второй трансплантации живых клеток для группы RL2 был достоверно меньше, чем у контрольной группы (рис. 10 г). Данные по росту опухоли приведены до 15-го дня после второй трансплантации, до момента начала гибели животных в контрольной группе. Таким образом, мыши, иммунизированные RL2-обработанными клетками MX-7, были частично защищены от повторной трансплантации опухолевых клеток. Показанная вакцинная эффективность RL2 была сравнима с таковыми у описанного белкового индуктора ICD - RIG-I-подобной геликазы (RLH). Дьювел с соавторами. продемонстрировали, что вакцинация мышей C57BL/6 RLH-обработанными опухолевыми клетками Panc02 индуцировала защитный противоопухолевый иммунитет у шести из восьми мышей [23]. Более того, клетки, обработанные RL2, были более эффективными в модели профилактической вакцинации, чем, например, пептидный индуктор ICD – RT53. Было показано, что вакцинация клетками, обработанными RT53, приводила только к торможению роста опухоли в месте трансплантации живых клеток по сравнению с контрольной группой, и все мыши в после повторной трансплантации имели опухоли [24]. Таким образом, полученные *in vivo* результаты подтверждают активацию противоопухолевого иммунного ответа при трансплантации опухолевых клеток обработанных RL2.

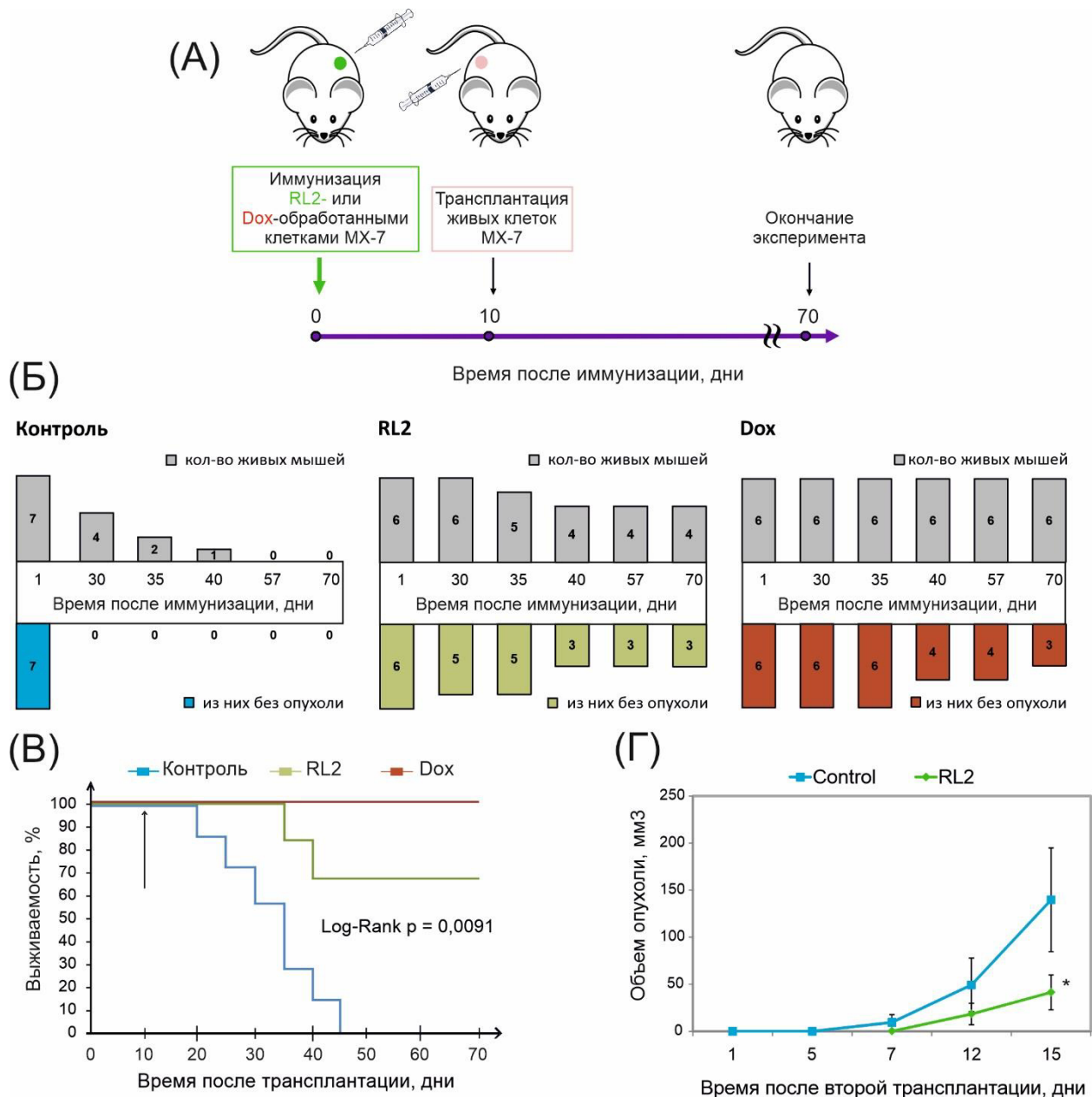


Рис. 10. Иммунизация мышей СЗН/Не клетками MX-7, обработанными рекомбинантным аналогом лактапина RL2. (А) Схема иммунизации. Мышей СЗН/Не иммунизировали обработанными RL2 или Dox клетками MX-7 ($7 \cdot 10^5$ клеток/животное) – точка “0” на оси абсцис. Через восемь дней мышам вводили живые клетки MX-7 ($7 \cdot 10^5$) (Б) Количества живых мышей и мышей без опухолей в группах в динамике. (В) Продолжительность жизни вакцинированных мышей. (Г) Динамика роста опухоли в сайте трансплантации живых клеток. Различия между группами рассчитаны с использованием непараметрической статистики, критерия хи-квадрат Пирсона, достоверно при $p < 0,05$. Кривые выживаемости Каплана-Майера и статистику Log-Rank рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prizm (Сан-Диего, США).

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

Для преодоления надзора иммунной системы опухоли реализуют различные механизмы супрессии иммунной системы или толерантности к ее воздействию. Наряду с экспрессией CD31 и CD47, предотвращающих захват антиген-презентирующими клетками, секрецией иммуносупрессорных цитокинов (TGF β , IL-10) метаболические ферменты микроокружения опухоли также могут осуществлять иммуносупрессию [25–28]. К таким ферментам относят индуцибельную NO-синтазу, индоламин 2,3-диоксигеназу (IDO), триптофан 2,3 диоксигеназу, аргиназу и другие [29,30]. В нашем исследовании мы изучили, может ли ингибирование индоламин-2, 3-диоксигеназы (IDO), фермента метаболизма триптофана, усиливать противоопухолевый эффект вакцинации клетками, обработанными RL2. Для этого, мыши, иммунизированные RL2-обработанными клетками до второй трансплантации живых опухолевых клеток дополнительно получали этилпируват (ЭП), ингибитор IDO, в соответствии со схемой на рисунке 11 (а). В результате, две из пяти мышей в группе RL2 были без опухоли, в группе RL2/ЭП - три из пяти (рис. 11 б). В группе RL2/ЭП были живы все животные, в то время как в группе RL2 за время эксперимента погибла одна мышь с крупным опухолевым узлом от первой трансплантации. Наиболее вероятно, что это происходило вследствие присутствия RL2-устойчивых живых клеток среди клеток, применяемых для вакцинации. Средний объем развившихся опухолей для групп RL2 и RL2/ЭП был значительно меньше по сравнению с таковым в контрольной группе (рис. 11 г). Следует также отметить, что, несмотря на то, что различия в количестве мышей без опухолей для RL2 и RL2/ЭП статистически недостоверными, средний размер опухолей для группы RL2/ЭП был наименьшим и был примерно в четыре раза ниже, чем в контрольной группе (рис. 11 г).

Для того, чтобы усилить наблюдаемый эффект ЭП, мы снизили дозу клеток для вакцинации с $7 \cdot 10^5$ до $5 \cdot 10^5$ клеток на животное. Эта стратегия привела к увеличению выживаемости контрольных и вакцинированных мышей (рис. 11 д). В группе RL2 у четырех из 10 мышей не было опухоли в месте второй трансплантации опухолевых клеток, и только одна мышь умерла. В группе RL2/ЭП у шести из 10 мышей не было опухоли, и все животные были живы.

Таким образом, согласно трем независимым экспериментам, описанным выше, вакцинирующий противоопухолевый эффект в среднем развился у 43,3% вакцинированных мышей в группе RL2. В группе RL2/ЭП вакцинирующий противоопухолевый эффект развился в среднем у 60% мышей.

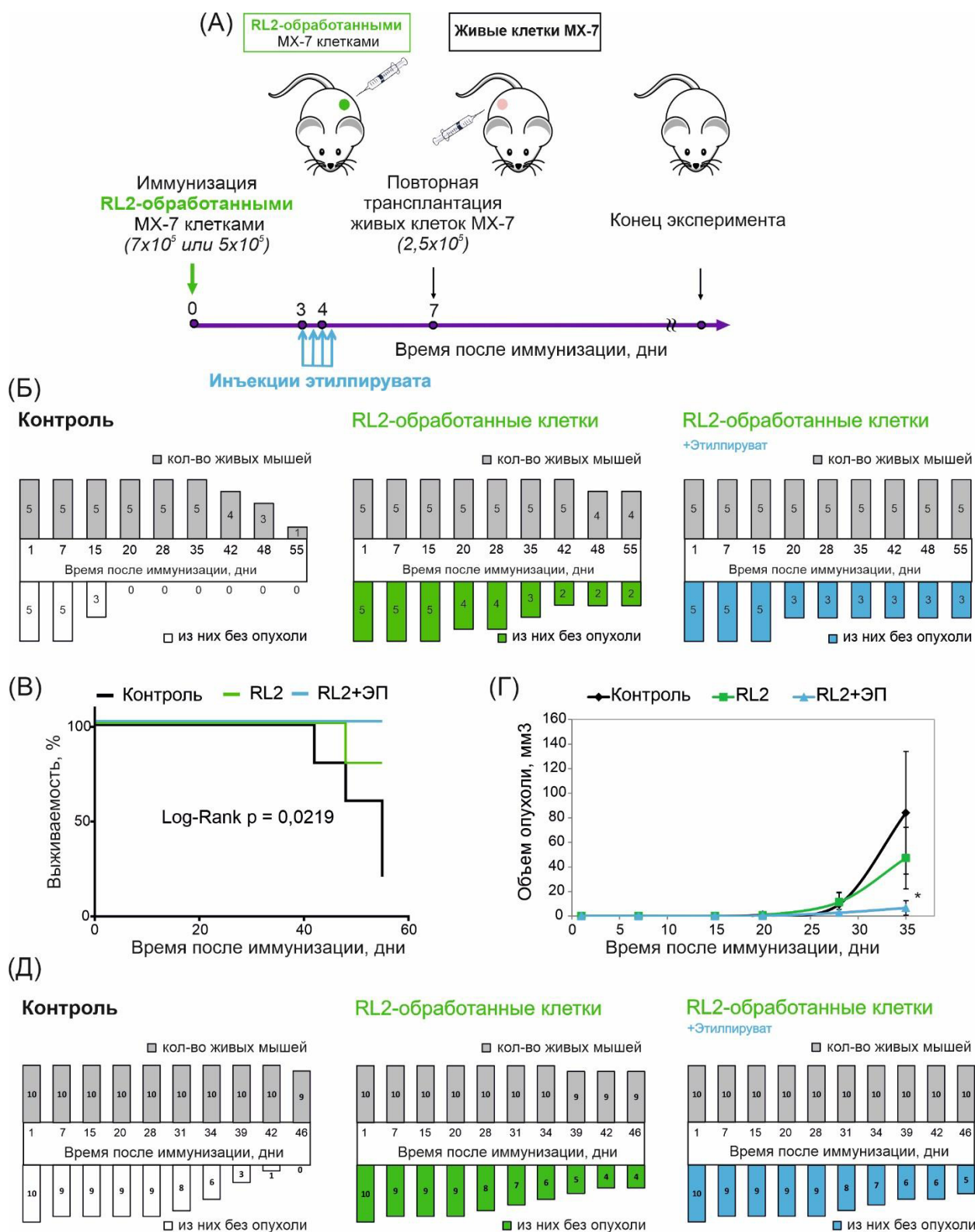


Рис. 11. Этилпируват усиливает эффективность противоопухолевой вакцинации клетками, обработанными RL2. (А) Схема иммунизации мышей СЗН/Не клетками MX-7, обработанными RL2 и ЭП (этилпируват). (Б) Динамика количества живых мышей в группах и мышей без опухолей при трансплантации 7×10^5 клеток/мышь (Б-Г) и 5×10^5 клеток/мышь (Д). Выживаемость вакцинированных мышей (В). Динамика роста второго

опухолевого узла (Г). Различия между группами рассчитаны с использованием непараметрической статистики критерия хи-квадрат Пирсона, и они были достоверными при $p < 0,05$. Кривые выживаемости Каплана-Майера и статистику Log-Rank рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prizm (Сан-Диего, США).

Было обнаружено, что перитонеальные макрофаги мышей СЗН/Не, вакцинированных RL2-обработанными клетками, показывали способность к фагоцитозу интактных клеток MX-7 *in vitro* в отличие от макрофагов контрольных животных. Более того, инъекции этилпирувата усиливали фагоцитирующую способность макрофагов иммунизированных мышей.



Рис. 12. Фагоцитоз клеток MX-7 (красные) макрофагами мышей СЗН/Не (зеленые), вакцинированных RL2-обработанными клетками MX-7. Микроскопический анализ

Влияние ингибирования индоламин-2,3-диоксигеназы на Т- и В-лимфоциты

Чтобы оценить влияние ингибирования IDO на динамику Т- и В-клеток в крови мышей, анализировали образцы крови иммунизированных животных. В анализ брали образцы взятые через день после иммунизации опухолевыми клетками, через день и через восемь дней после трансплантации живых клеток (рис. 13). Мы обнаружили, что трансплантация живых клеток MX-7 приводила к уменьшению популяции В-клеток (CD3-/CD19+) в крови мышей через восемь дней после их трансплантации в группах RL2/ЭП и контрольной по сравнению с группой здоровых мышей (рис. 13). Уменьшение популяции В-клеток в группе RL2/ЭП началось раньше, чем в контрольной группе, уже в первый день после заражения живыми клетками MX-7. Таким образом, инъекции этилпирувата стимулировали уменьшение популяции В-клеток. Доля Т-клеток (CD3 +/CD19-) среди мононуклеаров крови не различались между группами с трансплантированными опухолевыми клетками и для всех групп наблюдалось увеличение доли этих клеток по сравнению с контрольными здоровыми животными без трансплантаций. Известно, что

активность IDO и ее метаболитических продуктов реакции являются основным иммуносупрессорным факторами в незрелых миелоидных супрессорных клетках (MDSC), которые представлены гетерогенными иммунодепрессивными клетками при нескольких типах рака [31]. Было показано, что IDO необходим для иммуносупрессивной активности MDSC в отношении Т-клеток, которая может блокироваться ингибитором IDO 1-метил-L-триптофаном [32]. Поскольку не было обнаружено различий в относительном количестве CD3+/CD19- в группах с трансплантациями опухолевых клеток, мы полагаем, что такое увеличение стимулировалось больше трансплантацией клеток, чем регуляцией IDO. В этом случае общее количество Т-клеток не отражает напрямую Т-клеточный ответ на активность IDO. В целом, указанный дуализм функции IDO должен быть принят во внимание для дальнейшего рассмотрения его роли в активации иммунной системы клетками, гибнущими по пути ICD.

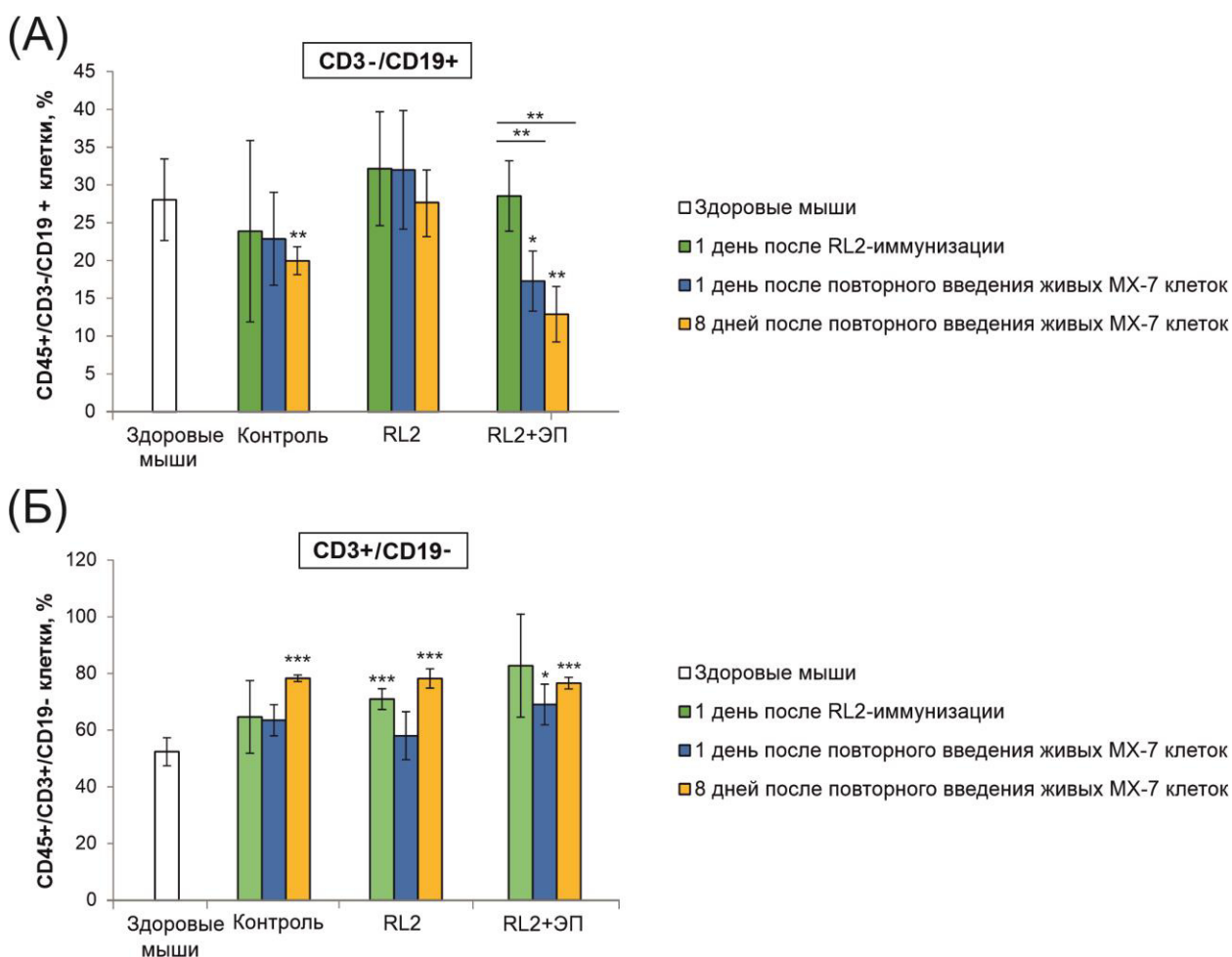


Рис. 13. Распределение популяций иммунных клеток среди мононуклеаров периферической крови. РВМС выделяли из образцов цельной крови, окрашивали флуоресцентно-мечеными моноклональными антителами к CD45, CD3 и CD19 и анализировали методом проточной цитометрии. Доля положительных клеток показана в процентах от общего количества CD45-положительных клеток. (А) В-лимфоциты; (Б) Т-

лимфоциты. Образцы крови здоровых мышей использовали в качестве контроля; Мышей «контрольной вакцинации» вакцинировали живыми клетками МХ-7. Статистические различия между контрольной и экспериментальной группами обозначены * для $p < 0,05$; ** для $p < 0,01$

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

Для усиления иммуногенности RL2-обработанных клеток также использовали 1-метилтриптофан (1-МТ), еще один ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы. Аналогично предложенной ранн схеме для ЭП, мышей СЗН/Не подкожно иммунизировали погибающими клетками МХ-7, обработанными RL2. и трансплантировали живые опухолевые клетки через 7 дней. 1-Метилтриптофан мышам вводили через желудочный зонд после трансплантации живых клеток (всего 10 инъекций, суммарная полученная доза 400 мг/кг). В финальной точке эксперимента в группе RL2/1-МТ из 10 животных было 4 мыши без опухоли, как и в группе RL2.

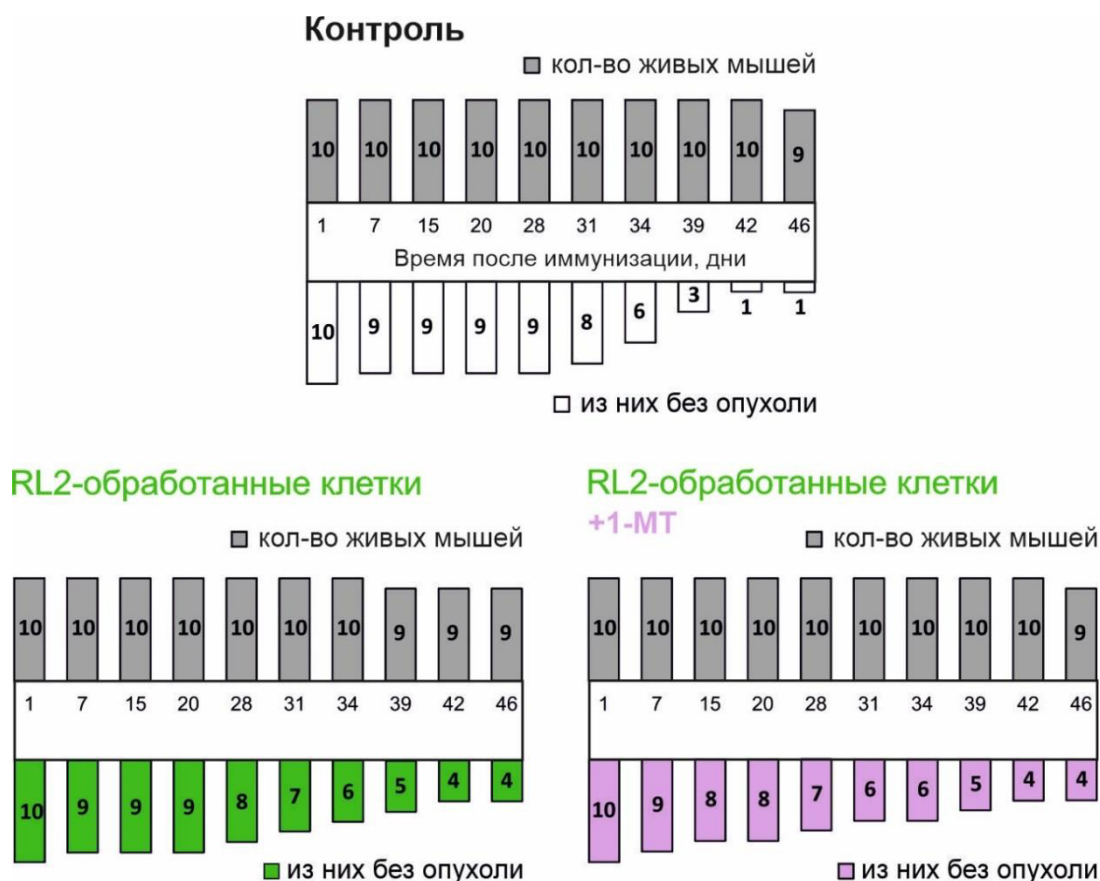


Рис. 14. Динамика опухолеобразования и выживаемости мышей в группах.

2. Рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующий ГМ-КСФ человека и лактапин

Для усиления противоопухолевых свойств вируса осповакцины (ВОВ) на основе штамма Л-ИВП генно-инженерным путем были сконструированы, выделены и очищены рекомбинантные вирусы осповакцины VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo, кодирующие гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) человека и проапоптотические белки лактаптин и апоптин, соответственно. Ген ГМ-КСФ человека был встроен в геном рекомбинантных вирусов в структурной части гена тимидинкиназы вируса для усиления противоопухолевого иммунного ответа. Рекомбинантные вирусы содержали вставку гена лактаптина или апоптина в районе гена *C11R*, кодирующего ростовой фактор (VGF) вируса. Для оценки эффектов апоптоз-индуцирующих белков-продуктов этих генов использовали контрольный рекомбинант VV-GMCSF-dGF, с несущий вставку гена ГМ-КСФ человека в гене тимидинкиназы вируса и имеющий делецию гена ростового фактора вируса [13].

Индукция иммуногенного апоптоза рекомбинантными вирусами осповакцины *in vitro*

Недавние исследования показали, что онколитические вирусы, такие как аденовирусы, парвовирусы, коксаки вирусы, вирусы осповакцины, вирус болезни Ньюкасла, вирус простого герпеса вызывают гибель клетки-хозяина по иммуногенному типу с испусканием соответствующих DAMPs и представлением репертуара опухолевых ассоциированных антигенов дендритным клеткам, что необходимо для формирования адаптивного противоопухолевого иммунного ответа [33]. В данной работе рекомбинантные вирусы VV-GMCSF-dGF, VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo были использованы для исследования индукции ICD в раковых клетках человека *in vitro*.

Экспозиция кальретикулина на внешнюю плазматическую мембрану под действием рекомбинантных вирусов осповакцины

Для оценки изменения уровня экто-CRT в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, рабдомиосаркомы мыши MX-7 и клетки лекарственно-устойчивой лимфосаркомы мыши RLS заражали рекомбинантными ВОВ со множественностью инфекции: 0,5 и 0,05 БОЕ/клетку и анализировали изменение поверхностного кальретикулина через 24-48 ч после заражения.

Результаты анализа представлены на рисунке 15. Можно видеть, что все рекомбинантные вирусы (VV-GMCSF-Lact, VV-GMCSF-Apo, и контрольный вирус VV-GMCSF-dGF) вызывают транслокацию CRT на внешнюю мембрану клетки.

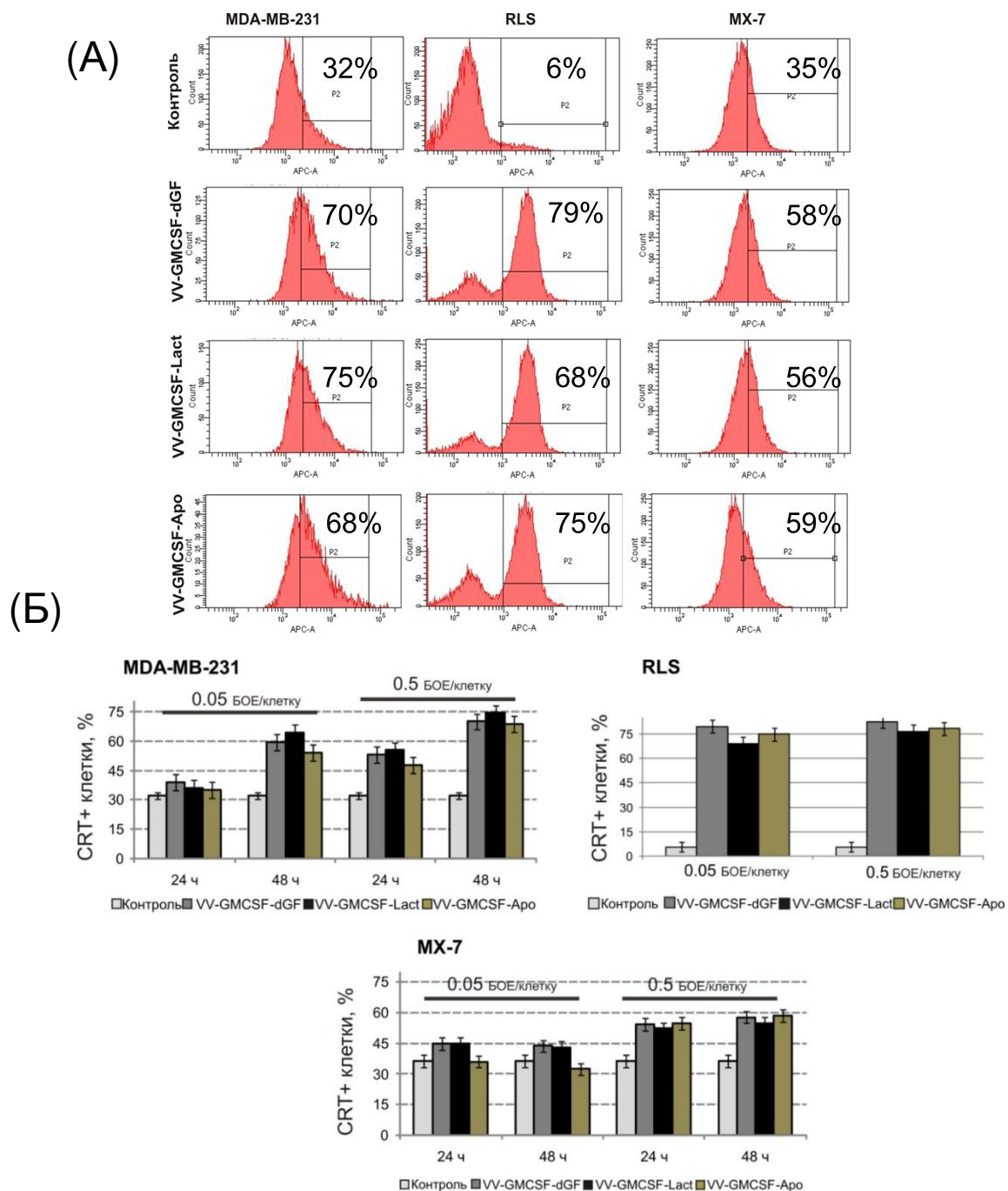


Рис. 15. Изменение уровня кальретикулина (CRT) в опухолевых клетках, зараженных рекомбинантными BOB. (A) – пример распределения CRT-положительных популяций в клетках MDA-MB-231, MX-7 и RLS через 48 ч инкубации (Б) – гистограммы распределения CRT-положительных клеток (популяция P2) после обработки вирусами (множественность инфекции: 0,05 и 0,5 БОЕ/клетку), относительно контрольных необработанных клеток

Достоверных различий между рекомбинантными вирусами по уровню индукции экто-CRT не обнаружено. При этом, наибольший эффект транслокации CRT отмечен для клеток лимфосаркомы RLS. В случае клеточной линии MX-7, экспозиция CRT происходит только при высоком титре вирусных частиц (0,5 БОЕ/клетку), а при низком

титре (0,05 БОЕ/клетку) экспозиции кальретикулина не происходит даже при длительной вирусной инфекции (48 ч). В случае клеток MDA-MB-231 можно видеть, что экспозиция кальретикулина зависит как от множественности вирусной инфекции, так и от длительности инкубации: увеличивается с увеличением титра вирусных частиц (0,05 БОЕ/клетку) и с продолжительностью вирусной инфекции: после 48 ч инфекции популяция клеток с фенотипом CRT⁺ была выше, чем после 24 ч инкубации.

Таким образом, при заражении опухолевых клеток рекомбинантными вирусами осповакцины VV-GMCSF-Lact, VV-GMCSF-Apo, VV-GMCSF-dGF происходит экспозиция CRT на внешней плазматической мембране.

Изменение уровня внеклеточного АТФ при инфекции рекомбинантными вирусами осповакцины

Мы обнаружили (рис. 16), что под действием рекомбинантных вирусов осповакцины происходит увеличение уровня внеклеточного АТФ в культуральной среде зараженных клеток. Уровень АТФ в образцах через 44 часа возрастал в ряду VV-GMCSF-Lact < VV-GMCSF-Apo < VV-GMCSF-dGF. Стоит отметить, что свободный рекомбинантный аналог лактапина RL2 вызывал больший и более ранний (через 20-24 ч инкубации) выход внеклеточного АТФ, чем рекомбинантные вирусы осповакцины, что было показано выше. Таким образом, все рекомбинантные вирусы осповакцины стимулировали высвобождение АТФ во внеклеточное пространство через 44 ч после инфицирования.

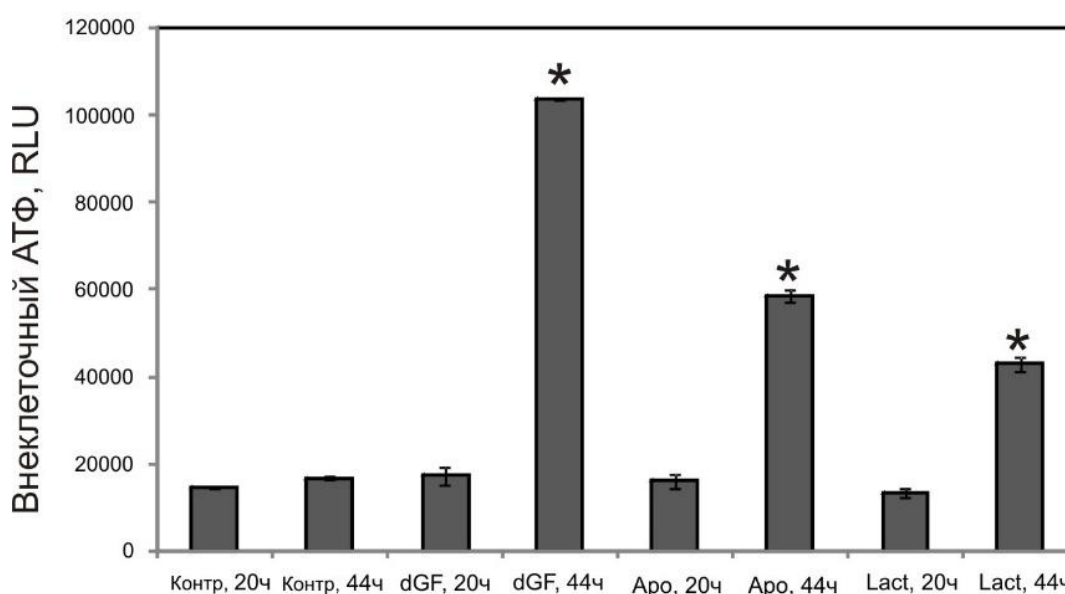


Рис. 16. Относительное количество АТФ в культуральной среде клеток, зараженных рекомбинантными вирусами осповакцины. Анализ проводили через 20 и 44 ч после

заражения вирусами (0,05 БОЕ/клетку). dGF: VV-GMCSF-dGF, Apo: VV-GMCSF-Apo, Lact: VV-GMCSF-Lact. * – достоверно отличается по сравнению с контрольными клетками ($p < 0,05$)

Изменение клеточного эндо-HMGB1 под действием рекомбинантных вирусов осповакцины

Для исследования изменения HMGB1, клетки MDA-MB-231 инкубировали с рекомбинантными вирусами осповакцины в течение 3-48 ч, после чего клетки лизировали и анализировали методом вестерн-блота с применением моноклональных антител против HMGB1. В качестве внутреннего контроля использовали уровень белка глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), нормировали относительно HMGB1 (рис. 17).

Из данных, представленных на рисунке 8, можно видеть, что под действием рекомбинантных BOB суммарное содержание клеточного HMGB1 через 24 ч и 48 ч уменьшается относительно его уровня в контрольных незараженных клетках.

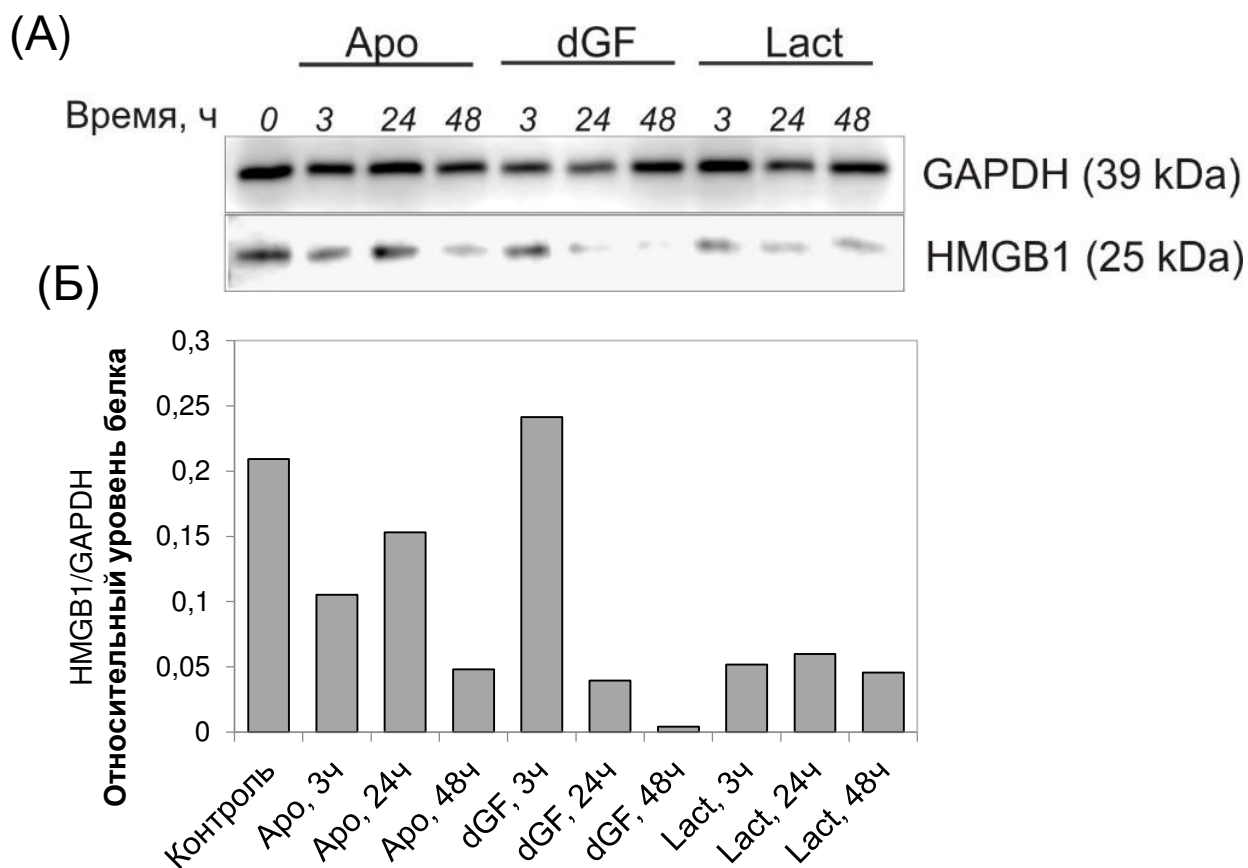
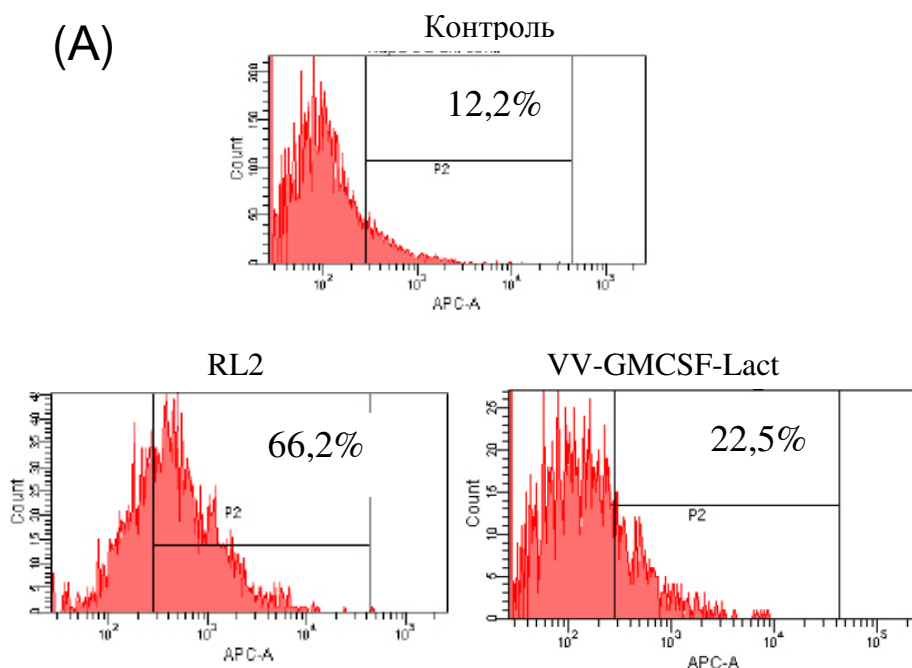


Рис. 17. Изменение эндо-HMGB1 в опухолевых клетках, зараженных рекомбинантными вирусами осповакцины. (A) - Вестерн-блот анализ изменения уровня клеточного HMGB1 в клетках MDA-MB-231 через 3-48 ч после обработки

рекомбинантными вирусами осповакцины; (Б) – изменение уровня HMGB1 в обработанных клетках

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

Следующим исследуемым алармином был белок теплового шока HSP70. В качестве препарата сравнения (индуктора ICD) использовали рекомбинантный аналог лактапина RL2. Мы показали, что инфицирование рекомбинантными вирусами, кодирующими лактапин и апоптин, вызывает экспозицию HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану через 24 часа вирусной инфекции (рис. 18 а, б). Можно видеть, что под действием рекомбинантного аналога лактапина экспозиция HSP70 происходит более эффективно, чем после инкубации с рекомбинантными вирусами (рис. 18 а). Нужно отметить, что экспозиция HSP70 была детектирована только при множественности инфекции 0,5 БОЕ/клетку, а при множественности 0,05 БОЕ/клетку не было отмечено существенного увеличения HSP70-положительной популяции клеток.



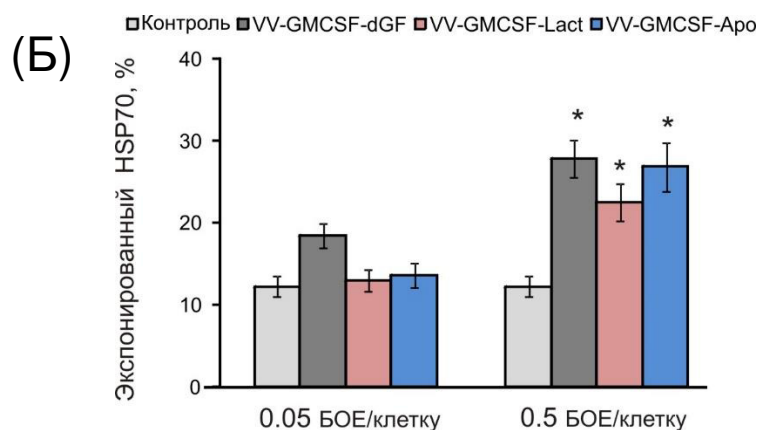


Рис. 18. Изменение экспозиции белка HSP70 на внешней плазматической мембране в опухолевых клетках. (А) – исследование экто-HSP70 в обработанных клетках методом проточной цитометрии на примере распределения HSP70-положительных популяций под действием RL2 и VV-GMCSF-Lact по сравнению с контролем через 24 ч инкубации. (Б) – гистограммы распределения HSP70-положительных клеток (популяция P2) после обработки вирусами (0,05 и 0,5 БОЕ/клетку), относительно контрольных необработанных клеток. * – достоверно отличается по сравнению с контрольными клетками ($p < 0,05$)

Можно заключить, что уровень активации DAMPS в опухолевых клетках при заражении рекомбинантными ВОВ практически не зависит от апоптоз-индуцирующих трансгенных белков апоптина и лактаптина. Наиболее вероятно, что активации маркеров ICD происходит как общий ответ на вирусную инфекцию, маркирующий зараженную клетку к захвату фагоцитирующими клетками.

Исследование эффекта вакцинации клетками, зараженными рекомбинантными вирусами осповакцины *in vivo*

Клетки рабдомиосаркомы мыши MX-7 *in vitro* инкубировали с индукторами ICD и, далее, методом проточной сортировки FACS, отбирали популяцию клеток, положительных по йодиду пропидия (PI^+ - клетки) (рис. 19). PI^+ - клетки трансплантировали иммунокомпетентным животным подкожно без добавления адьюванта. Для трансплантации перевивали 300-400 тысяч клеток на мышь.

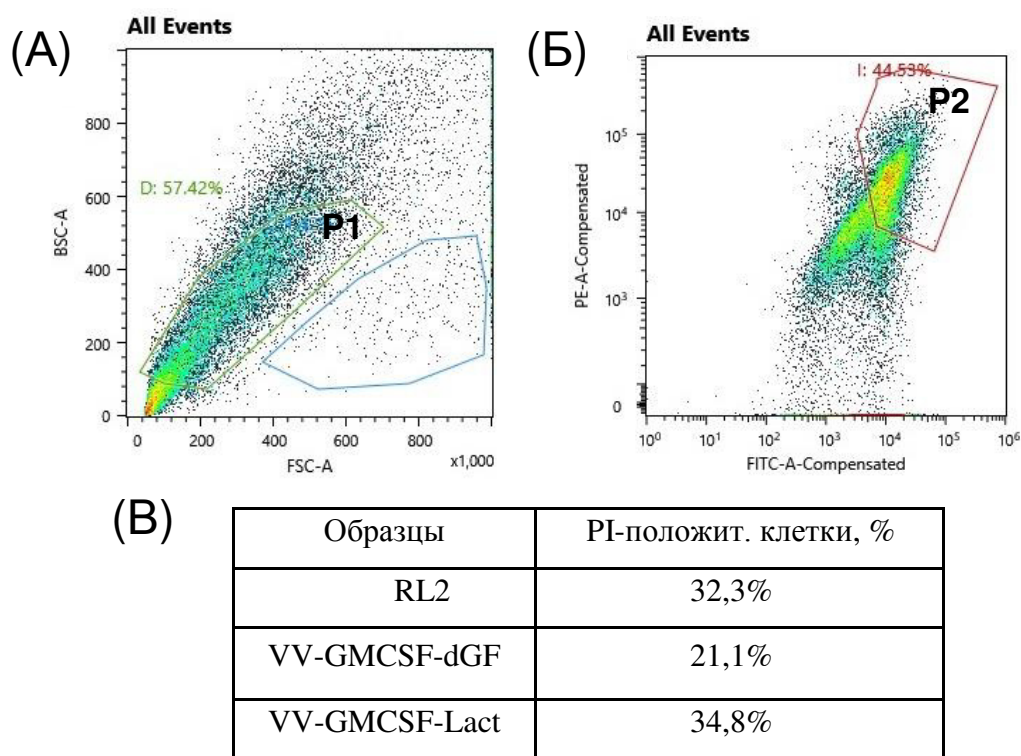


Рис. 19. Анализ сортировки клеток MX-7, отобранных для трансплантации. (А) – определение анализируемой популяции (P1) по параметрам размер (FSC) /гранулярность (BSC). (Б) – выбор сортируемой популяции (P2) по интенсивности флюоресценции в красном канале (PE-A). Указаны проценты клеток, попадающих в сортируемый диапазон на примере клеток, инкубированных с RL2. (В) – % PI+ клеток во всех образцах

Контрольным животным трансплантировали живые опухолевые клетки. Через 7 дней после первой трансплантации проводили повторную трансплантацию живых опухолевых клеток (500 тысяч клеток/мышь) всем животным в противоположный бок.

Через 25 дней после повторной трансплантации опухоли, в группе RL2 у 3 из 8 мышей не развилась опухоль, в группе рекомбинантного вируса VV-GMCSF-Lact у 1 из 8 (рис. 20). В контрольной группе и группе, иммунизированной контрольным вирусом VV-GMCSF-Lact у всех мышей был детектирован вторичный опухолевый узел. Нужно отметить, что через 45 дней и далее после повторной трансплантации в группе RL2 у 3х живых мышей все также не детектировали вторичного опухолевого узла, а в группе VV-GMCSF-Lact – у одной.

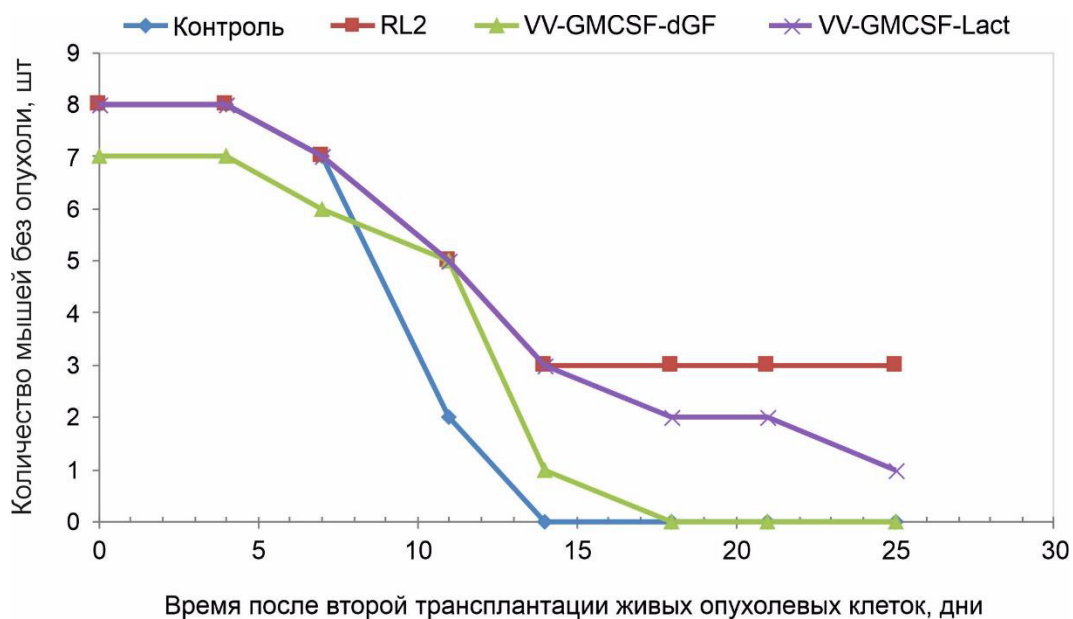


Рис. 20. Оценка эффективности противоопухолевой вакцинации мышей СЗН/Не клетками МХ-7, обработанными индукторами иммуногенного апоптоза. Показана динамика появления опухолевого узла экспериментальных животных в сайте второй трансплантации (живых опухолевых клеток). * – достоверно отличается по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)

Таким образом, было установлено, что эффект вакцинации (37%) проявлялся лишь при иммунизации клетками, обработанными рекомбинантным аналогом лактапина RL2. По сравнению с экспериментами по вакцинации RL2-обработанными клетками, описанном выше, без сортировки PI-положительных клеток, в этом эксперименте эффект вакцинации был ниже (37% против 43%). Для животных, иммунизированных клетками, обработанными рекомбинантными ВОВ, эффекта противоопухолевой иммунизации достичь не удалось.

В данном эксперименте мышей иммунизировали клетками, положительными только по пропидию йодиду (вторично-некротическими клетками или находящимися в состоянии некроза). Также известно, что основным путем гибели опухолевых клеток под действием вируса осповакцины является программируемый некроз [34], что может влиять на эффективность противоопухолевой вакцинации. Таким образом, можно сделать вывод, что иммунизация некротическими клетками/вторично некротическими клетками оказывает меньший вакцинирующий эффект. Шеффер с соавторами [35] трансплантировали иммунокомпетентным мышам погибающие опухолевые клетки, в одних из которых γ -облучением был индуцирован апоптоз, а в других – последовательными процедурами замораживания/оттаивания индуцирован некроз. Они показали, что при последующей трансплантации живых клеток опухоли этим же мышам,

только у животных, вакцинированных апоптотическими клетками, не происходило развития опухоли в 75%-100% случаев. У животных, вакцинированных некротическими клетками по той же схеме лишь 0-30% животных оставались без опухоли при трансплантации живых опухолевых клеток. Таким образом, наши данные для RL2 подтверждают меньший вакцинирующий потенциал некротических/вторично некротических клеток по сравнению с неразделенной популяцией апоптотических и некротических клеток при использовании одного и того же индуктора ICD.

Суммируя, показано, что рекомбинантные BOB вызывают изменение характерных молекулярных маркеров достаточное для того, чтобы считать их индукторами иммуногенной клеточной гибели *in vitro*. Однако, в экспериментах *in vivo* не удалось добиться эффекта вакцинации клетками, зараженными вирусами.

3. Холодная плазменная струя (ХПС) как индуктор ICD

Одним из новых перспективных направлений в лечении злокачественных образований является холодная плазменная струя (ХПС). В то время как тепловая (горячая) плазма, которая, обычно используется, например, для эндоскопической коагуляции тканей и разрушения тканей человека, холодная плазма может применяться без термического повреждения для обработанных тканей [36]. Для исследования индукции ICD под действием холодной плазменной струи (ХПС) мы проанализировали транслокацию CRT и HSP70 на внешнюю клеточную мембрану, а также внеклеточный HMGB1. В качестве клеточной модели использовали клетки MX-7, чувствительные к облучению ХПС.

Экспозиция CRT и HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану под действием ХПС

Транслокацию кальретикулина и HSP70 под действием ХПС анализировали с помощью проточной цитометрии через 6 и 24 часа после обработки клеток рабдомиосаркомы мыши MX-7 (рис. 21). Через 24 часа после воздействия ХПС наблюдали появление клеток с экспонированными кальретикулином и HSP70. В результате облучения ХПС около 25% клеток имели на своей поверхности кальретикулин и 38% клеток были HSP70-положительными (рис. 21 а-в). Не было обнаружено различий в CRT- или HSP70-положительных клетках в контрольных и обработанных плазмой клетках, когда клетки были фиксированными и проницаемыми (рис. 21 г, д), что подтвердило транслокацию этих маркеров ICD на внешнюю клеточную мембрану после облучения.

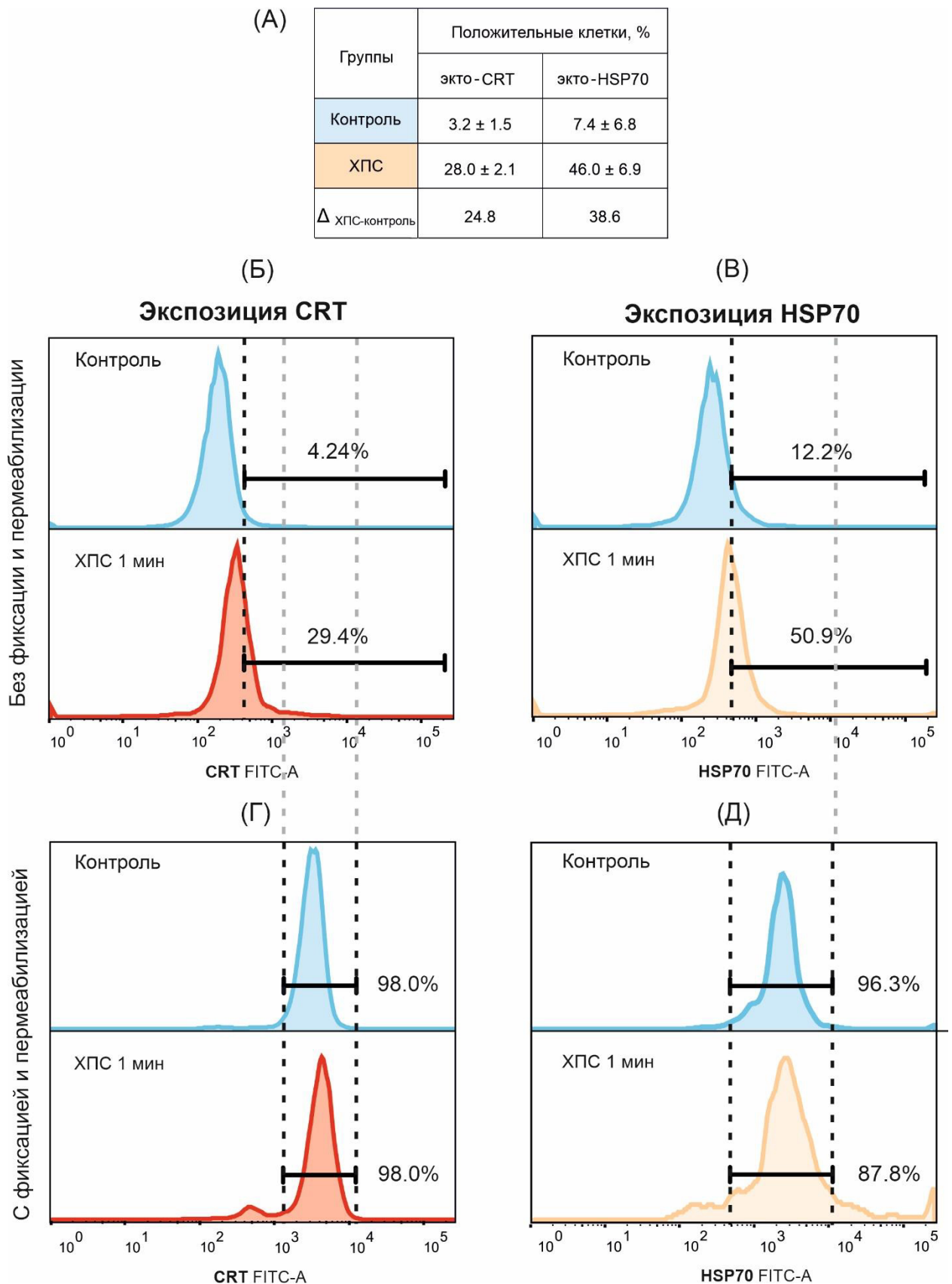


Рис. 21. ХПС-зависимая транслокация CRT и HSP70. Клетки MX-7 облучали САР в течение 1 мин при расходе газа 9 л/мин, амплитуде напряжения 4,9 кВ и оценивали экто-CRT и экто-HSP70 через 24 ч. (А) Количественные данные для положительных по экто-

CRT и экто-HSP70 клеток. (Б-Д) Анализ внеклеточного (Б-В) и общего (Г-Д) CRT и HSP70.

Изменение уровня внеклеточного и клеточного эндо-HMGB1 под действием ХПС

Для оценки уровня внеклеточного HMGB1, клетки MX-7 облучали ХПС в течение 1 минуты, культивировали в стандартных условиях 24 ч, отбирали образцы культуральной среды от обработанных и контрольных клеток и оценивали уровень HMGB1 с помощью метода ИФА. Увеличение уровня HMGB1 было обнаружено через 24 и 32 часа после облучения ХПС (рис. 22 а). Чтобы проверить интенсивность высвобождения HMGB1, мы также протестировали внеклеточный HMGB1 в другой линии опухолевых клеток мыши – клетках рака толстой кишки мыши СТ26. Наибольшая концентрация HMGB1 была обнаружена в культуральной среде клеток СТ26 через 24 ч после обработки ХПС. Было обнаружено, что исходные концентрации HMGB1 в культуральной среде необработанных клетках также были разными для тестируемых клеточных линий. Чтобы оценить относительные изменения HMGB1, данные были нормализованы на уровень HMGB1 в необработанных клетках конкретной линии (рис. 22 б). В данном случае относительное увеличение HMGB1 в культуральной среде клеток MX-7 было больше, чем для СТ26. Уменьшение HMGB1 в клетках MX-7 после облучения ХПС (1 мин) также было подтверждено вестерн-блотом (рис. 22 в). Интересно, что внеклеточная концентрация HMGB1 была выше через 24 ч после облучения, чем через 32 ч, что может быть связано с протеолизом HMGB1 протеолитическими ферментами погибающих клеток. Такие частично расщепленные формы HMGB1 могут создавать трудности при анализе методом ИФА с иммобилизованными специфическими антителами к определенному эпитопу HMGB1.

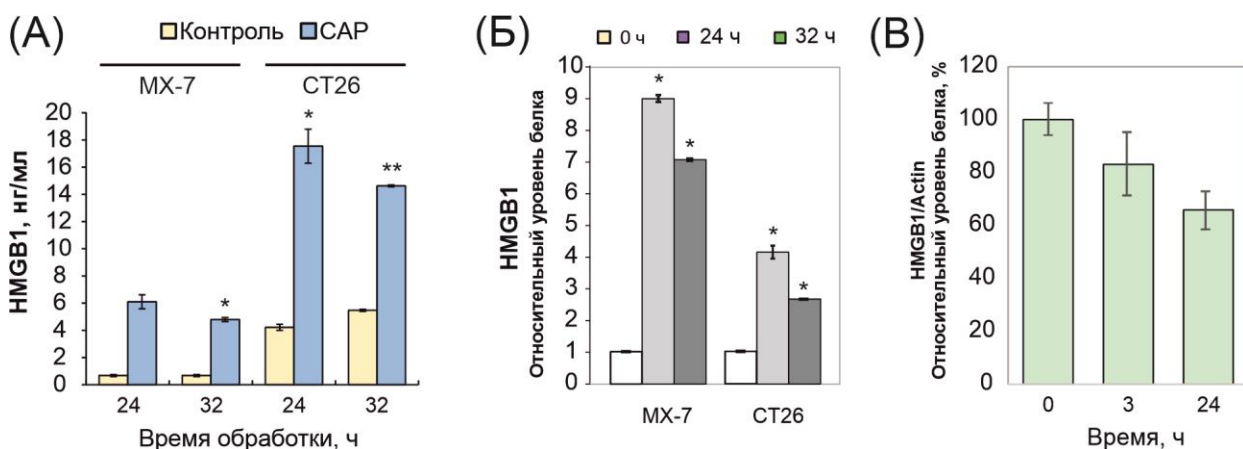


Рис. 22. Анализ внеклеточного (А, Б) и внутриклеточного (В) HMGB1. Клетки MX-7, СТ26 подвергали воздействию CAP в течение 1 минуты, а спустя 24 и 32 часа HMGB1

анализировали в культуральной среде. (Б) Данные представлены как кратное изменение количества HMGB1 по сравнению с необработанным контролем. (В); относительный уровень белка HMGB1 относительно α -актина в клетках MX-7. Для сравнения контрольной и экспериментальной групп применялся t-критерий Стьюдента. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Таким образом, можно сделать вывод, что через 24 ч после облучения ХПС маркеры ICD были обнаружены. Обнаружение определенного набора признаков ICD в обработанных клетках означает, что облучение ХПС приводит к иммуногенному типу гибели клеток.

Холодная атмосферная плазма вызывает увеличение HMGB1 в сыворотке крови мышей с опухолями

Теоретически внеклеточный HMGB1 из погибающих клеток может попасть в кровотоки. Мы предположили, что ХПС-зависимое высвобождение HMGB1 из погибающих опухолевых клеток может изменять уровень HMGB1 в сыворотке крови облученных мышей-опухоленосителей. Мышей СЗН/Не с трансплантированной опухолью MX-7 и здоровых мышей двукратно облучали ХПС в течение 1 минуты 2 дня подряд, кровь мышей собирали через 1 и 24 часа после второго облучения ХПС (рис 23 а, б). Чтобы подтвердить, что лечение ХПС не вызывает термического повреждения мышей, использовали тепловизор для измерения температуры кожи в области облучения. Средняя температура кожи, определенная за время облучения, составила $37,8 \pm 0,7$ ° С, термических повреждений не наблюдалось. Анализ сыворотки крови мышей показал, что облучение ХПС вызывало двукратное увеличение уровня HMGB1 через 1 час после второго воздействия ХПС в сыворотке крови мышей с опухолью (рис. 23 в). Следует отметить, что через 24 часа после второго облучения уровень HMGB1 в сыворотке снизился в обеих группах, получавших ХПС. Мы предположили, что повышение уровня HMGB1 в сыворотке у мышей-опухоленосителей после облучения может быть следствием высвобождения HMGB1 в кровотоки из клеток, погибающих по пути ICD после облучения.

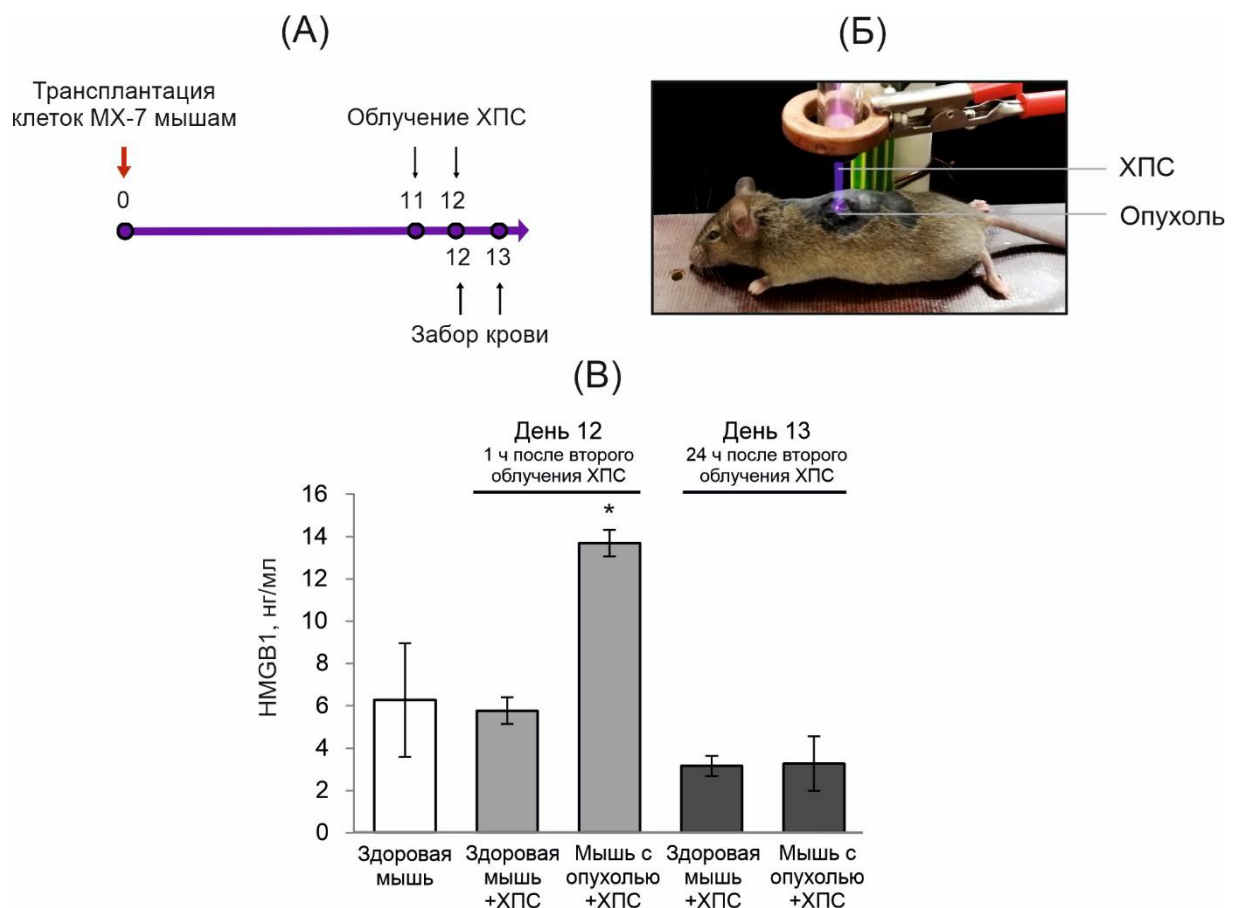


Рис. 23. Влияние облучения ХПС на уровень HMGB1 в сыворотке крови здоровых мышей и мышей-опухоленосителей. (А) Схема эксперимента. (Б) Пример облучения мышей. (В) Количество HMGB1 в сыворотке. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($n = 5$). Различия были рассчитаны с использованием t-критерия Стьюдента, и они были достоверными при $p < 0,05$ (*)

Изменение уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови мышей, облученных ХПС

Повышенный уровень секреции цитокинов также может быть маркером возникающего иммунного ответа. Мы проанализировали сывороточный уровень IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 α , INF- γ , TNF- α , G-CSF и GM-CSF в сыворотке здоровых мышей после облучения ХПС. Разница в уровне цитокинов между контрольными мышами и мышами, облученными ХПС, была обнаружена только для двух цитокинов: G-CSF значительно увеличился, а IL-4 снизился в сыворотке облученных здоровых мышей (рис. 24). Принимая во внимание данные об уровне HMGB1 в сыворотке крови здоровых облученных мышей, наши данные показывают, что кратковременное облучение ХПС вызывает слабый цитокиновый ответ.

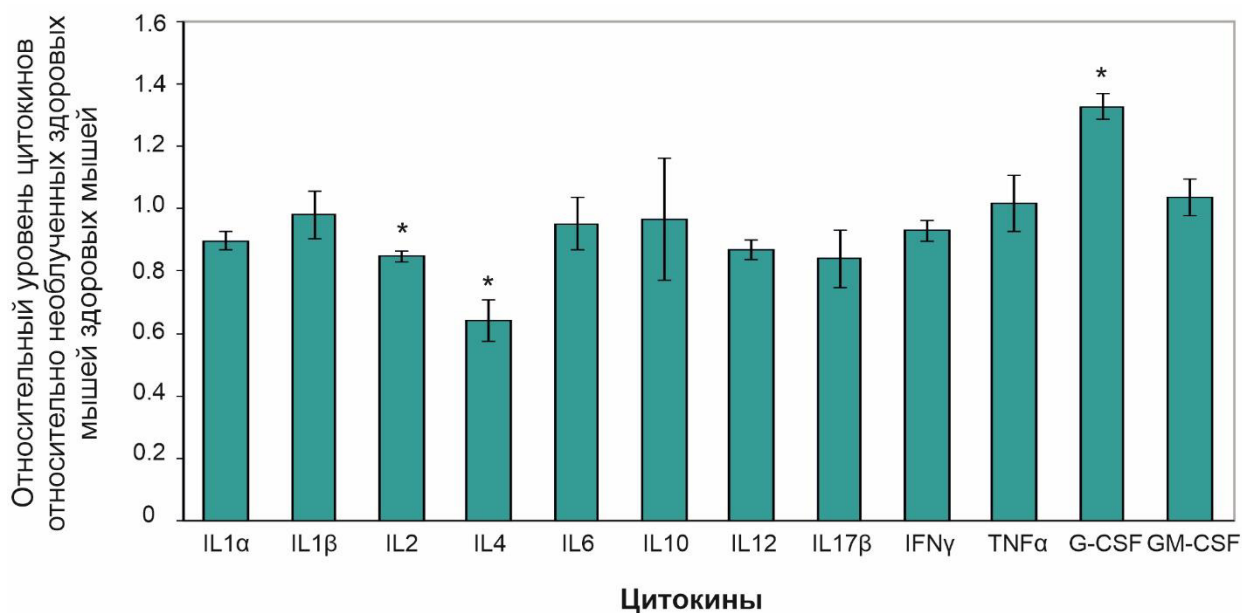


Рис. 24. Уровень цитокинов в сыворотке крови мышей С3Н/Не, облученных холодной плазменной струей (ХПС). Сыворотки крови разбавлены в 8 раз. Данные нормализованы к необработанному контролю (принят за единицу) и представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (n = 5). Различия рассчитывались с использованием t-критерия Стьюдента, разница между группами была статистически значимой при $p < 0,05$ (*)

Выводы

1. Показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 индуцирует гибель опухолевых клеток иммуногенного типа.
2. Обнаружено, что гибнущие опухолевые клетки, обработанные аналогом лактапина RL2, способны стимулировать противоопухолевый иммунный ответ.
3. Показано, что ингибирование индоламин-2,3-диоксигеназы усиливает противоопухолевый иммунный ответ, активированный вакцинацией клетками, обработанными RL2.
4. Обнаружено, что гибель опухолевых клеток, инфицированных рекомбинантными вирусами осповакцины, протекает с активацией маркеров иммуногенной клеточной гибели. Эффективность активации маркеров иммуногенной клеточной гибели не зависит от наличия трансгенов апоптоз-индуцирующих белков апоптина и лактапина. Клетки, инфицированные рекомбинантными вирусами осповакцины не оказывают противоопухолевого вакцинирующего эффекта при трансплантации мышам.

5. Показано, что облучение опухолевых клеток холодной плазменной струей индуцирует активацию маркеров иммуногенной клеточной гибели *in vitro*. Показано, что облучение ХПС опухолей у мышей ведет к повышению концентрации в сыворотке крови маркера иммуногенной клеточной гибели HMGB1.

Список использованной литературы

1. Vacchelli E. et al. Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers // *Oncoimmunology*. 2014. Vol. 3, № 1. P. e27878.
2. Богданова, И.М., Пономаренко, Е.А. Стимуляция опухолеспецифического иммунного ответа цитостатическими химиопрепаратами в популяции клеток селезенки мышей *in vitro*: 3 // *Иммунология*. Россия, Москва: Общество с ограниченной ответственностью Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2015. Vol. 36, № 3. P. 158–161.
3. Vacchelli E. et al. Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers // *Oncoimmunology*. 2013. Vol. 2, № 3. P. e23510.
4. Casares N. et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death: 12 // *Journal of Experimental Medicine*. 2005. Vol. 202, № 12. P. 1691–1701.
5. Kepp O. et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death // *Oncoimmunology*. 2014. Vol. 3, № 9. P. e955691.
6. Boon T. et al. Human T cell responses against melanoma // *Annu. Rev. Immunol.* 2006. Vol. 24, № 1. P. 175–208.
7. Tagliamonte M. et al. Antigen-specific vaccines for cancer treatment // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014. Vol. 10, № 11. P. 3332–3346.
8. Semenov D.V. et al. Recombinant Analogs of a Novel Milk Pro-Apoptotic Peptide, Lactaptin, and Their Effect on Cultured Human Cells // *Protein J*. 2010. Vol. 29, № 3. P. 174–180.
9. Richter M. et al. The Recombinant Fragment of Human κ -Casein Induces Cell Death by Targeting the Proteins of Mitochondrial Import in Breast Cancer Cells // *Cancers*. 2020. Vol. 12, № 6. P. 1427.
10. Koval O.A. et al. Lactaptin induces p53-independent cell death associated with features of apoptosis and autophagy and delays growth of breast cancer cells in mouse xenografts // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, № 4. P. e93921.
11. Bagamanshina A.V. et al. Cytotoxic and Antitumor Activity of Lactaptin in Combination with Autophagy Inducers and Inhibitors // *Biomed Res Int*. 2019. Vol. 2019. P. 4087160.

12. Workenhe S.T., Mossman K.L. Oncolytic virotherapy and immunogenic cancer cell death: sharpening the sword for improved cancer treatment strategies // *Mol Ther.* 2014. Vol. 22, № 2. P. 251–256.
13. Kochneva G. et al. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 45. P. 74171–74188.
14. Golubitskaya E.A. et al. Cold Physical Plasma Decreases the Viability of Lung Adenocarcinoma Cells: 3 // *Acta Naturae.* 2019. Vol. 11, № 3. P. 16–19.
15. Чинак О.А. et al. Проникновение пептида лактапина в раковые клетки человека // *Биоорган. химия.* 2016. Vol. 42, № 4. P. 401–410.
16. Schweigert I. et al. Interaction of Cold Atmospheric Argon and Helium Plasma Jets with Bio-Target with Grounded Substrate Beneath: 21 // *Applied Sciences.* 2019. Vol. 9, № 21. P. 4528.
17. Zappasodi R. et al. Improved Clinical Outcome in Indolent B-Cell Lymphoma Patients Vaccinated with Autologous Tumor Cells Experiencing Immunogenic Death // *Cancer Res.* 2010. Vol. 70, № 22. P. 9062–9072.
18. Pitt J.M., Kroemer G., Zitvogel L. Immunogenic and Non-immunogenic Cell Death in the Tumor Microenvironment // *Tumor Immune Microenvironment in Cancer Progression and Cancer Therapy* / ed. Kalinski P. Cham: Springer International Publishing, 2017. Vol. 1036. P. 65–79.
19. Obeid M. et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death // *Nat Med.* 2007. Vol. 13, № 1. P. 54–61.
20. Wu J. et al. Heat Shock Proteins and Cancer // *Trends Pharmacol Sci.* 2017. Vol. 38, № 3. P. 226–256.
21. Zitvogel L. et al. Immunological aspects of cancer chemotherapy: 1 // *Nat Rev Immunol.* 2008. Vol. 8, № 1. P. 59–73.
22. Pang X. et al. Expression and effects of high-mobility group box 1 in cervical cancer // *Int J Mol Sci.* 2014. Vol. 15, № 5. P. 8699–8712.
23. Duewell P. et al. RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8(+) T cells // *Cell Death Differ.* 2014. Vol. 21, № 12. P. 1825–1837.
24. Pasquereau-Kotula E. et al. The anticancer peptide RT53 induces immunogenic cell death // *PLoS One.* 2018. Vol. 13, № 8. P. e0201220.
25. Brown S. et al. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment: 6894 // *Nature.* 2002. Vol. 418, № 6894. P. 200–203.

26. Lv Z. et al. Loss of Cell Surface CD47 Clustering Formation and Binding Avidity to SIRP α Facilitate Apoptotic Cell Clearance by Macrophages: 2 // *J.I.* 2015. Vol. 195, № 2. P. 661–671.
27. Lechner M.G., Liebertz D.J., Epstein A.L. Characterization of Cytokine-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells from Normal Human Peripheral Blood Mononuclear Cells // *J.I.* 2010. Vol. 185, № 4. P. 2273–2284.
28. Groth C. et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression // *Br J Cancer.* 2019. Vol. 120, № 1. P. 16–25.
29. Soliman H., Mediavilla-Varela M., Antonia S. Indoleamine 2,3-dioxygenase: is it an immune suppressor? // *Cancer J.* 2010. Vol. 16, № 4. P. 354–359.
30. Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours // *Nat Rev Immunol.* 2012. Vol. 12, № 4. P. 253–268.
31. Shou D. et al. Suppressive role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the microenvironment of breast cancer and targeted immunotherapies // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 39. P. 64505–64511.
32. Yu J. et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress Antitumor Immune Responses through IDO Expression and Correlate with Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer // *J.I.* 2013. Vol. 190, № 7. P. 3783–3797.
33. Takasu A. et al. Immunogenic cell death by oncolytic herpes simplex virus type 1 in squamous cell carcinoma cells // *Cancer Gene Ther.* 2016. Vol. 23, № 4. P. 107–113.
34. Whilding L.M. et al. Vaccinia virus induces programmed necrosis in ovarian cancer cells // *Mol Ther.* 2013. Vol. 21, № 11. P. 2074–2086.
35. Scheffer S.R. et al. Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo // *Int J Cancer.* 2003. Vol. 103, № 2. P. 205–211.
36. Semmler M.L. et al. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment // *Cancers.* 2020. Vol. 12, № 2. P. 269.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Троицкая Ольга Сергеевна

Проверяющий: Гапонова Светлана Константиновна (sveta-mira@yandex.ru / ID: 4540715)

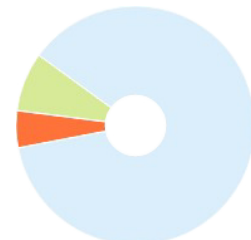
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 1
Начало загрузки: 31.08.2021 07:41:07
Длительность загрузки: 00:01:07
Имя исходного файла: Научный доклад_Троицкая.docx
Название документа: Научный доклад_Троицкая
Языки текста документа: русский, английский
Размер текста: 1 кБ
Символов в тексте: 81461
Слов в тексте: 10423
Число предложений: 644
Method of text extraction: OCR

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
Начало проверки: 31.08.2021 07:42:14
Длительность проверки: 00:01:18
Комментарии: не указано
Поиск с учетом редактирования: да
Модули поиска: ИПС Адилет, Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс, Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KkRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KyRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Переводные заимствования (KkEn), Переводные заимствования (KyEn), Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn), eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ, Интернет, Медицина, Диссертации НББ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по Интернету, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



ЗАИМСТВОВАНИЯ

4,9%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

8,21%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

86,89%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	7,6%	7,6%	не указано	раньше 2011	Библиография	2	2	
[02]	0,26%	1,46%	Семенова, Анастасия Викторовна Конструирование и изучение противоопухолевых свойств рекомбинантных вариантов вируса осповакцины, экспрессирующих транспены репортерных, иммуностимулирующих и онкотоксических белков : диссертация ... кандидата биологически... http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	3	9	
[03]	0%	1,46%	«Конструирование и изучение противоопухолевых свойств рекомбинантных вариантов вируса осповакцины, экспрессирующих транспены репортерных, иммуностимулирующих и онкотоксических белков» http://vector.nsc.ru	23 Апр 2020	Интернет	0	9	
[04]	0,93%	1,27%	Багаманшина, Анастасия Викторовна Цитотоксическая и противоопухолевая активность рекомбинантных аналогов лактапина : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.01.03 Новосибирск 2020 http://dlib.rsl.ru	12 Янв 2021	Сводная коллекция РГБ	4	6	
[05]	0%	1,25%	«Конструирование и изучение противоопухолевых свойств рекомбинантных вариантов вируса осповакцины, экспрессирующих транспены репортерных,	23 Апр 2020	Интернет Плюс	0	8	

иммуностимулирующих и онкотоксических белков»
<http://vector.nsc.ru>

[06]	1%	1%	https://kpfu.ru/portal/docs/F1415540430/Simbioz_2017_IFMiB_Sbornik.pdf https://kpfu.ru	14 Сен 2018	Интернет	4	4
[07]	0,09%	0,96%	X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия-2017» Сборник тезисов - PDF https://docplayer.ru	05 Апр 2019	Интернет Плюс	2	12
[08]	0%	0,81%	Combinatorial strategies for the induction of immunogenic cell death https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	7
[09]	0%	0,81%	The New Era of Cancer Immunotherapy: Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Overcome Immune Evasion https://frontiersin.org	18 Авг 2020	СМИ России и СНГ	0	5
[10]	0,25%	0,79%	Лаборатория биотехнологии [Институт химической биологии и фундаментальной медицины] http://niboch.nsc.ru	12 Мар 2021	Интернет Плюс	2	6
[11]	0%	0,79%	Combinatorial Strategies for the Induction of Immunogenic Cell Death https://core.ac.uk	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	7
[12]	0%	0,72%	Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses https://doi.org	30 Ноя 2017	Издательство Wiley	0	9
[13]	0,04%	0,71%	Human fibrocytic myeloid-derived suppressor cells express IDO and promote tolerance via Treg-cell expansion https://doi.org	30 Ноя 2014	Издательство Wiley	1	10
[14]	0%	0,7%	Interplay Between Mitophagy and Apoptosis Defines a Cell Fate Upon Co-treatment of Breast Cancer Cells With a Recombinant Fragment of Human - Casein and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand https://frontiersin.org	19 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	5
[15]	0%	0,7%	Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death https://core.ac.uk	02 Ноя 2020	Интернет Плюс	0	5
[16]	0%	0,7%	Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death https://core.ac.uk	02 Ноя 2020	Интернет	0	5
[17]	0%	0,7%	Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death https://frontiersin.org	20 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	5
[18]	0,23%	0,67%	https://kpfu.ru/portal/docs/F1415540430/Simbioz_2017_IFMiB_Sbornik.pdf https://kpfu.ru	14 Сен 2018	Интернет Плюс	4	8
[19]	0%	0,67%	The clinical evidence for targeting human myeloid-derived suppressor cells in cancer patients https://doi.org	31 Авг 2017	Издательство Wiley	0	10
[20]	0%	0,65%	The Tumor Immunoenvironment https://doi.org	22 Ноя 2018	Интернет Плюс	0	7
[21]	0,23%	0,65%	Нуштаева, Анна Андреевна Культуры онкотрансформированных клеток молочной железы и эндометрия для изучения опухолевой прогрессии и разработки терапевтических подходов : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.01.03 Новосибирск 2019 http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Сводная коллекция РГБ	1	3
[22]	0,61%	0,61%	не указано	раньше 2011	Шаблонные фразы	13	13
[23]	0,11%	0,59%	Женское молоко – источник потенциального лекарства от рака. http://elibrary.ru	25 Дек 2013	eLIBRARY.RU	2	7
[24]	0%	0,58%	Рекомбинантный штамм vv-gmcsfact-dgf вируса осповакцины, обладающий онколитической активностью и продуцирующий секретируемый химерный белок, состоящий из гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека и онкотоксического белка лак... https://findpatent.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	4
[25]	0%	0,57%	Cancer-immune system interplay in the tumor microenvironment	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	6

<https://core.ac.uk>

[26]	0%	0,57%	Myeloid- derived suppressor cells in obstetrical and gynecological diseases https://doi.org	31 Авг 2020	Издательство Wiley	0	8
[27]	0%	0,54%	Crosstalk between myeloid- derived suppressor cells and the immune system in prostate cancer https://doi.org	31 Янв 2020	Издательство Wiley	0	8
[28]	0%	0,52%	Human fibrocytic myeloid-derived suppressor cells express IDO and promote tolerance via Treg-cell expansion https://doi.org	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	4
[29]	0%	0,51%	Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers https://doi.org	31 Авг 2019	Издательство Wiley	0	4
[30]	0%	0,46%	Action immunitaire de chimiothérapies anticancéreuses : un exemple à travers les modes d'actions des cellules "Interferon-producing Killer Dendritic Cells". https://tel.archives-ouvertes.fr	14 Авг 2019	Интернет Плюс	0	4
[31]	0%	0,46%	Oncolytic immunotherapy: dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity https://frontiersin.org	16 Сен 2020	СМИ России и СНГ	0	4
[32]	0%	0,46%	Intra-graft CD11b+IDO+ Cells Mediate Cardiac Allograft Tolerance by ECDCI-Fixed Donor Splenocyte Infusions https://doi.org	30 Ноя 2012	Издательство Wiley	0	8
[33]	0,09%	0,43%	PDF http://ajcr.us	31 Авг 2021	Интернет Плюс	1	4
[34]	0,41%	0,41%	http://www.bio.msu.ru/newsview.phpID=1560 http://istina.msu.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1
[35]	0%	0,41%	Миелоидные супрессорные клетки: общая характеристика/Myeloid suppressor cells: general characteristics https://medlit.ru	26 Дек 2016	Медицина	0	3
[36]	0%	0,4%	Oncolytic virus-induced cell death and immunity: a match made in heaven? https://doi.org	30 Сен 2017	Издательство Wiley	1	5
[37]	0,15%	0,39%	Тезисы XV Международного конгресса по реабилитации в медицине и иммунореабилитации <i>->(Дубай, ОАЭ, 24-27 апреля 2010)</i>. http://elibrary.ru	11 Мая 2018	eLIBRARY.RU	4	6
[38]	0%	0,38%	Т. 9, № 1 http://emll.ru	20 Дек 2016	Медицина	0	3
[39]	0%	0,37%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, № 5 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2
[40]	0,37%	0,37%	Сборник тезисов. Том 2 http://istina.msu.ru	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1
[41]	0,37%	0,37%	Часть 2. Конкретные примеры работ, выполненных в институтах ФАНО–СО РАН в 2017 году и соответствующих приоритетам Стратегии НТР России. http://sbras.ru	28 Дек 2019	Интернет Плюс	1	1
[42]	0%	0,35%	Пилигаев, Александр Васильевич Выделение и изучение свойств штаммов микроводорослей, продуцирующих липиды, и их биокаталитическая переработка в биодизельное топливо : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.01.06 Новосибирск 2018 http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2018	Сводная коллекция РГБ	0	2
[43]	0%	0,35%	Oncolytic Immunotherapy: Conceptual Evolution, Current Strategies, and Future Perspectives https://frontiersin.org	18 Авг 2020	СМИ России и СНГ	0	3
[44]	0%	0,34%	The purification and identification of human blood serum proteins with affinity to the antitumor active RL2 lactaptin using magnetic microparticles https://doi.org	30 Ноя 2019	Издательство Wiley	0	2
[45]	0%	0,34%	Сведения об авторах. http://elibrary.ru	04 Авг 2016	eLIBRARY.RU	0	4
[46]	0%	0,32%	Irradiation-Induced Changes in the Immunogenicity of Lung Cancer Cell Lines: Based on Comparison of X-rays and Carbon Ions https://frontiersin.org	22 Апр 2021	СМИ России и СНГ	0	3

[47]	0%	0,31%	Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer Cell and Developmental Biology https://frontiersin.org	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	3
[48]	0%	0,31%	The immune response to secondary necrotic cells https://ncbi.nlm.nih.gov	20 Мая 2021	Интернет Плюс	0	3
[49]	0%	0,31%	Targeting STAT3 enhances NDV- induced immunogenic cell death in prostate cancer cells https://doi.org	30 Апр 2020	Издательство Wiley	0	4
[50]	0%	0,29%	Чудилова, Галина Анатольевна Мультивариантность фенотипической трансформации субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов при различных иммунозависимых заболеваниях : диссертация ... доктора биологических наук : 14.03.09 Краснодар 2020 http://dlib.rsl.ru	16 Июнь 2021	Сводная коллекция РГБ	0	2
[51]	0%	0,29%	http://www.vector.nsc.ru/userfiles/model/s/autoreferats-files/asemenova.pdf http://vector.nsc.ru	12 Мар 2021	Интернет Плюс	0	2
[52]	0%	0,28%	PEG-Derivatized Dual-Functional Nanomicelles for Improved Cancer Therapy https://frontiersin.org	16 Окт 2020	СМИ России и СНГ	0	2
[53]	0%	0,28%	Frontiers Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? Physiology https://frontiersin.org	13 Мая 2021	Интернет Плюс	0	2
[54]	0%	0,28%	Frontiers Myeloid-Derived Suppressor Cells in Multiple Myeloma: Pre-Clinical Research and Translational Opportunities Oncology https://frontiersin.org	03 Apr 2020	Интернет Плюс	0	2
[55]	0%	0,28%	http://bloodjournal.ru/wp-content/uploads/2017/01/4-1.pdf http://bloodjournal.ru	31 Мая 2021	Интернет Плюс	0	2
[56]	0%	0,27%	Бирюков_Магистерская диссертация	25 Мая 2021	Кольцо вузов	0	2
[57]	0,06%	0,26%	Лаборатория биотехнологии [Институт химической биологии и фундаментальной медицины] http://niboch.nsc.ru	05 Фев 2019	Интернет Плюс	1	2
[58]	0%	0,26%	Связь иммунологических показателей с эффективностью неоадьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы. http://elibrary.ru	18 Дек 2013	eLIBRARY.RU	0	3
[59]	0,11%	0,25%	Пашенков, Михаил Владимирович диссертация ... доктора медицинских наук : 03.03.03 Москва 2013 http://dlib.rsl.ru	25 Дек 2015	Сводная коллекция РГБ	1	2
[60]	0%	0,25%	STAT3 Contributes To Oncolytic Newcastle Disease Virus-Induced Immunogenic Cell Death in Melanoma Cells https://frontiersin.org	11 Сен 2020	СМИ России и СНГ	0	2
[61]	0%	0,24%	Пазина, Татьяна Юрьевна Дисфункции естественных киллерных клеток при множественной миеломе и возможные пути их коррекции : диссертация ... кандидата биологических наук : 14.03.03 Санкт-Петербург 2016 http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2
[62]	0,15%	0,23%	http://www.ibp.ru/diser/dissertaciya-piligaev.pdf http://ibp.ru	13 Июнь 2020	Интернет Плюс	1	2
[63]	0%	0,23%	http://www.ibp.ru/diser/dissertaciya-piligaev.pdf http://ibp.ru	06 Ноя 2020	Интернет Плюс	0	2
[64]	0%	0,23%	Песня-Прасолов, Светозар Борисович Криодеструкция опухолей головного мозга под контролем интраоперационной сонографии : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.01.18 Москва 2016 http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2
[65]	0%	0,23%	Криодеструкция опухолей головного мозга под контролем интраоперационной сонографии http://emil.ru	28 Apr 2017	Медицина	0	2
[66]	0%	0,22%	Иммунология http://studentlibrary.ru	27 Ноя 2017	Сводная коллекция ЭБС	0	1
[67]	0%	0,22%	Иммунология http://studentlibrary.ru	19 Дек 2016	Медицина	0	1

[68]	0%	0,21%	Frontiers Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment Immunology https://frontiersin.org	04 Мая 2021	Интернет Плюс	0	1	
[69]	0%	0,21%	https://istina.msu.ru/media/publications/article/544/432/19083782/Tezisy.sbormik.2015.pdf https://istina.msu.ru	06 Фев 2019	Интернет Плюс	0	1	
[70]	0%	0,21%	http://www.bionet.nsc.ru/files/2016/conferece/BGRS2016.pdf http://bionet.nsc.ru	02 Дек 2020	Интернет Плюс	0	1	
[71]	0%	0,2%	Иммунология № 01.2016 http://studentlibrary.ru	27 Ноя 2017	Сводная коллекция ЭБС	0	1	
[72]	0%	0,2%	Иммунология № 01.2016 http://studentlibrary.ru	27 Ноя 2017	Сводная коллекция ЭБС	0	1	
[73]	0%	0,2%	Нейтрофилы та онкогенез https://clinicaloncology.com.ua	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	
[74]	0%	0,2%	Иммунотерапия злокачественных опухолей головного мозга (обзор). http://elibrary.ru	11 Мая 2018	eLIBRARY.RU	0	2	
[75]	0%	0,2%	Myeloid cells in circulation and tumor microenvironment of breast cancer patients SpringerLink https://link.springer.com	14 Апр 2020	Интернет Плюс	0	1	
[76]	0,02%	0,2%	СЕНСОРНЫЕ И ТРАНСПОРТНЫЕ УСТРОЙСТВА НА ОСНОВЕ КРЕМНИЕВЫХ МИКРОКАНАЛЬНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МИКРОФЛЮИДНЫХ СИСТЕМ - Диссертация http://konf.x-pdf.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	1	2	
[77]	0%	0,2%	Диссертация Салчак С.М	28 Сен 2020	Кольцо вузов	0	1	
[78]	0%	0,2%	Therapeutically Active RIG-I Agonist Induces Immunogenic Tumor Cell Killing in Breast Cancers Cancer Research http://cancerres.aacrjournals.org	18 Мая 2019	Интернет Плюс	0	1	
[79]	0%	0,2%	Методы индукции толерогенных дендритных клеток у животных и человека – тема научной статьи по фундаментальной медицине читайте бесплатно текст научно-исследовательской работы в электронной библиотеке КиберЛенинка https://cyberleninka.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	
[80]	0%	0,19%	The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer - The Lancet Oncology https://thelancet.com	25 Июн 2021	Интернет Плюс	0	2	
[81]	0%	0,19%	СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ. http://elibrary.ru	29 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	1	
[82]	0%	0,19%	Способ лечения злокачественных опухолей у млекопитающих. Патент РФ 2461566 http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	
[83]	0%	0,19%	Can Immunogenic Chemotherapies Relieve Cancer Cell Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors? https://frontiersin.org	11 Сен 2020	СМИ России и СНГ	0	2	
[84]	0%	0,19%	https://kaznmu.kz/press/wp-content/uploads/2016/12/%D0%92%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%BD%D0%B8%D0%BA-%D0%9A%D0%B0%D0%B7%D0%9D%D0%9C%D0%A3-%E2%84%963-2016.pdf https://kaznmu.kz	04 Июн 2020	Интернет Плюс	0	2	
[85]	0%	0,18%	Приказ Министерства здравоохранения РФ от 30 апреля 2013 г. N 281 "Об утверждении научных платформ медицинской науки" http://ivo.garant.ru	22 Фев 2019	СПС ГАРАНТ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0%	0,18%	kem_2012_3.pdf http://morfolhum.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0%	0,18%	https://niikim.ru/attachments/article/254/%D0%90%D0%B2%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B5%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%B0%D1%82%20%D0%9A%D1%83%D0%B7%D0%BD%D0%B5%D1%86%D0%BE%D0%B2%D0%B0%20%D0%9C.%D0%A1.pdf https://niikim.ru	19 Апр 2020	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[88]	0%	0,18%	Информационные события [Институт химической биологии и фундаментальной медицины] http://niboch.nsc.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0%	0,18%	Т. 2 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	0%	0,18%	Способ очистки вируса осповакцины или его рекомбинантных вариантов. Патент РФ 2537000 http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0%	0,18%	Средство для нейтрализации вируса натуральной оспы. Патент РФ 2515905 http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0%	0,18%	Способ получения наноразмерной системы доставки нуклеозидтрифосфатов в клетки млекопитающих. Патент РФ 2527681 http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0%	0,18%	19 вузов России получили право присуждать ученые степени http://ug.ru	16 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0%	0,18%	NYmnik_68112. Милахина Елена Васильевна. Разработка устройства генерации низкотемпературной плазменной струи и развитие новых методов воздействия на злокачественные http://umnik.fasie.ru	31 Окт 2020	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0%	0,18%	NYmnik_74803. Милахина Елена Васильевна. Разработка устройства генерации низкотемпературной плазменной струи и развитие новых методов воздействия на злокачественные http://umnik.fasie.ru	28 Ноя 2020	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0%	0,17%	Диссертация на тему «Патогенетическая связь показателей иммунной системы и противоопухолевого эффекта неоадьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы», скачать бесплатно автореферат по специальности ВАК РФ 14.03.03 - Патологическая физиология https://dissercat.com	14 Апр 2020	Интернет Плюс	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0%	0,17%	Диссертация на тему «Патогенетическая связь показателей иммунной системы и противоопухолевого эффекта неоадьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы», скачать бесплатно автореферат по специальности ВАК РФ 14.03.03 - Патологическая физиология https://dissercat.com	15 Мар 2021	Интернет Плюс	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0%	0,17%	Сеничкин, Вячеслав Витальевич Регуляция Mcl-1 для повышения чувствительности опухолевых клеток к апоптозу : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.01.08; 03.01.04 Москва 2018 http://dlib.rsl.ru	22 Фев 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0%	0,15%	Физико-химические детерминанты сенсбилизации васкулярной системы тетрапиррольными пигментами при фотодинамическом воздействии http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[100]	0%	0,15%	Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards Nature Communications https://nature.com	02 Мая 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[101]	0%	0,15%	Frontiers Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain Immunology https://frontiersin.org	15 Янв 2021	Интернет Плюс	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0%	0,15%	Цыганов, Евгений Николаевич диссертация ... кандидата биологических наук : 14.03.09 Москва 2013 http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[103]	0%	0,15%	Regulation of Apoptotic Cell Clearance During Resolution of Inflammation https://frontiersin.org	29 Окт 2020	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
			Факторы прогноза поражения парастеральных лимфатических					

[104]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	узлов при раке молочной железы центральной и медиальной локализации и выявление "сторожевых" лимфатических узлов в парастеральной зоне http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[105]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Молекулярно-генетические особенности патогенеза немелкоклеточного рака легкого http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[106]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Mycoplasma suis infection results endothelial cell damage and activation: new insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotrophic mycoplasma https://ncbi.nlm.nih.gov	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[107]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Маянский, Николай Андреевич Механизмы и регуляция клеточной гибели нейтрофилов : диссертация ... доктора медицинских наук : 14.00.36 Москва 2005 http://dlib.rsl.ru	20 Янв 2010	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[108]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Экспериментальные подходы к повышению эффективности GM-CSF-секретирующей цельноклеточной противоопухолевой вакцины http://emll.ru	20 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[109]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation https://frontiersin.org	25 Фев 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[110]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	ОНКОТОКСИЧЕСКИЕ БЕЛКИ В ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ: МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ. http://elibrary.ru	04 Апр 2015	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[111]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	NLGP Attenuates Murine Melanoma and Carcinoma Metastasis by Modulating Cytotoxic CD8+ T Cells https://frontiersin.org	21 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	chernaya_e_m_molekulyarnye-mehanizmy-vozniknoveniya-pervichnoy-ustoychivosti-opuholevyh-kletok-k-immunoterapii.docx	31 Мая 2021	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Стимуляция опухолеспецифического иммунного ответа цитостатическими химиопрепаратами в популяции клеток селезенки мышей in vitro/Stimulation of tumor-specific immune response by cytostatic chemotherapeutic drugs in population mice spleen cells in vitro https://medlit.ru	26 Дек 2016	Медицина	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	Ученые СО РАН готовят запрос на клинические испытания вакцины от рака http://ria.ru	03 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	NYmnik_63175. Милахина Елена Васильевна. Разработка устройства генерации низкотемпературной плазмы для развития новых методов электрофизического и химического воздействия на злокачественные http://umnik.fasie.ru	28 Окт 2019	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	141945 http://biblioclub.ru	18 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[117]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	Composition and methods for enhancing immunogenicity of antigens - The Trustees of the University of Pennsylvania (1/2) http://freepatentsonline.com	09 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[118]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects https://ncbi.nlm.nih.gov	14 Ноя 2020	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[119]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	CELLULAR VACCINE - Spetz-holmgren, Anna-lena (4/4) http://freepatentsonline.com	07 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[120]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	The Gut Microbiota, Kynurenine Pathway, and Immune System Interaction in the Development of Brain Cancer https://frontiersin.org	19 Ноя 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[121]	<input type="text" value="0%"/>	0,12%	Фенотипические и функциональные особенности альтернативно активированных макрофагов: возможное использование в регенеративной медицине/Phenotypic and functional characteristics of the alternative activated macrophages:	26 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

			potential use in regenerative med... https://medlit.ru					
[122]	<input type="text" value="0%"/>	0,12%	Диссертация на тему «Совершенствование методов контроля качества жидких копильных сред на основе обобщенного показателя», скачать бесплатно автореферат по специальности ВАК РФ 05.18.12 - Процессы и аппараты пищевых производств https://dissercat.com	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[123]	<input type="text" value="0%"/>	0,12%	Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. http://elibrary.ru	25 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[124]	<input type="text" value="0%"/>	0,12%	Т. 5, № 4 http://emll.ru	20 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[125]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Frontiers Enhanced Expression of CD47 Is Associated With Off-Target Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib in NSCLC Immunology https://frontiersin.org	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[126]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Сулейменова, Асем Толеугазиновна Клеточные механизмы иммунитета и их роль в течении и прогнозе рака яичников при комбинированном лечении : диссертация ... кандидата медицинских наук [по специальности] 14.01.12 Онкология Бишкек 2017 http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[127]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Многомерный поиск в обучающих системах. http://elibrary.ru	17 Дек 2011	eLIBRARY.RU	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[128]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Zhantekov B. BV 18-07k IWS-3.docx	06 Мая 2021	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[129]	<input type="text" value="0%"/>	0,1%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, № 2 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[130]	<input type="text" value="0%"/>	0,1%	Отзыв научного руководителя по научно-квалификационной работе (диссертации) аспиранта _ (Ф. И. О. полностью) кафедры _ (полностью) на тему _ и подготовленном научном докладе об основных результатах выполненной научно-квалификационной работы (диссертаци... https://pandia.ru	22 Июн 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[131]	<input type="text" value="0%"/>	0,1%	COMPOUNDS AND USES THEREOF TO INDUCE AN IMMUNOGENIC CANCER CELL DEATH IN A SUBJECT - INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (6/6) http://freepatentsonline.com	08 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[132]	<input type="text" value="0%"/>	0,1%	Аспиранты ВГАУ впервые получили дипломы http://voronej.bezformata.ru	02 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[133]	<input type="text" value="0%"/>	0,1%	Теоретические и экспериментальные исследования коагуляции молока диссертация по технологии продовольственных продуктов, скачайте бесплатно автореферат диссертации на тему 'Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств' http://tekhnosfera.com	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[134]	<input type="text" value="0%"/>	0,09%	Functional Roles of Calreticulin in Cancer Biology https://hindawi.com	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[135]	<input type="text" value="0%"/>	0,09%	Клиническая фармакология препарата эндометромаг- био ® и его терапевтическая эффекти в ность при п о слеродовом эндометрите у коров http://avtoreferat.seluk.ru	28 Мар 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[136]	<input type="text" value="0%"/>	0,09%	Реферат: "Влияние метаболического синдрома на поражение сердца у больных артериальной гипертонией" https://vpu.lg.ua	06 Фев 2019	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[137]	<input type="text" value="0%"/>	0,07%	Identifying Individual T Cell Receptors of Optimal Avidity for Tumor Antigens https://frontiersin.org	20 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на
объем заимствования

Троицкая Ольга Сергеевна

«Разработка противоопухолевых подходов с использованием индукторов
иммуногенной клеточной гибели»

Оригинальность работы составляет ___86.89___ %, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.б.н. С.К. Гапонова