

Санкт-Петербургский Государственный Университет

Биологический факультет

Кафедра цитологии и гистологии

Кузьмина Дарья Олеговна

**«Противоопухолевая активность моноцитов ТНР-1 под действием
гамма-излучения и рапамицина»**

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Работа выполнена

в Химико-Биологическом Кластере Университета ИТМО,
лаборатории экспериментальной онкологии и иммунологии

Научный руководитель: доцент, к.б.н. Сабанеева Е.В.

Научный консультант: к.б.н. Духинова М.С.

Санкт-Петербург

2021

СОДЕРЖАНИЕ:

Список сокращений.....	3
1. Введение.....	6
2. Литературный обзор.....	8
2.1. Фенотип макрофагов.....	8
2.2. Влияние радиотерапии на фенотип и жизнеспособность макрофагов.....	10
2.3. Роль mTORC1 в регуляции фенотипа макрофагов.....	12
2.4. Антигенпрезентирующая функция макрофагов.....	17
2.4.1. Организация HLA-DR у моноцитов и макрофагов	
2.4.2. Цикл HLA-DR	
2.5. Регуляция экспрессии и активности HLA-DR.....	22
2.5.1. Влияние опухоли на антигенпрезентирующую функцию макрофагов	
2.5.2. Радиотерапия в регуляции антигенпрезентирующей функции макрофагов	
2.5.3. mTORC1 в регуляции антигенпрезентирующей функции макрофагов	
3. Материалы и методы исследования.....	26
3.1. Материалы.....	26
3.1.1. Реактивы и материалы для ведения клеточных культур	
3.1.2. Клеточные линии, использованные в работе	
3.1.3. Приготовление кондиционированной среды	
3.2. Методы.....	27
3.2.1. Облучение клеток.....	27
3.2.2. Проточная цитофлуориметрия.....	28
3.2.3. Микроскопия.....	31
3.2.4. Выделение РНК.....	31
3.2.5. Обратная транскрипция.....	31
3.2.6. Полимеразная цепная реакция в реальном времени.....	32
3.2.7. МТТ-тест для исследования цитотоксичности.....	34
3.2.8. Статистический анализ.....	35
4. Результаты и обсуждение.....	35
5. Выводы.....	49
6. Список литературы.....	51

Список сокращений

Akt – протеинкиназа B

AP-2 – клатриновый адаптерный комплекс

Arg-1– аргиназа 1

Atf8b – ADP-рибозилирующий фактор-подобный белок 8B

ATG13 – белок, связанный с аутофагией 13

AMBRA1 – 1 регулятор аутофагии и беклина 1

BMP-7 – костный морфогенетический белок

CatS/CatB – катепсин S/B

CCL – CC хемокиновый лиганд

CD – кластер дифференцировки

СИТА – транс-активатор главного комплекса гистосовместимости второго класса

CLIP – ассоциированный с классом II инвариантный цепной пептид

CSFR1– рецептор колониестимулирующего фактора 1

CXCL – CXC хемокиновый лиганд

DcR3 – рецептор-ловушка 3

DEPTOR – ДЭП содержащий домен MTOR взаимодействующий белок

EGF – эпидермальный фактор роста

ERK – регулируемые внеклеточными сигналами киназы

FYCO1 – адаптер FYVE и домена аутофагии coiled-coil 1

FIP200 – белок с массой 200 кДа , взаимодействующий с семейством киназ фокальной адгезии

Fizz1 – белок, найденный в зоне воспаления

FoxO1– forkhead-бокс O₁-класса

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

GR – галактозный рецептор

GRp58 – регулируемый глюкозой белок 58

HIF- α – гипоксией индуцированный фактор-1 альфа

HLA-DM – человеческий лейкоцитарный антиген DM

HLA-DR – главный комплекс гистосовместимости II класса, локус DR

HMGB1 – амфотерин

IFN- α/γ – интерферон альфа/гамма

Ii – инвариантная цепь
IL – интерлейкин
IL-1 decoy receptor – рецептор-ловушка
IL-1RA – антагонист рецептора интерлейкина 1
IRE1 α – эндорибонуклеаза инозит-требующий фермент 1 α
JAK – янус-киназа
JNK – N-концевые киназы c-Jun
LIP22 – 22-кДа фрагмент Ii
LIP10 – 10-кДа фрагмент Ii
MAPK-p38 – p38 митоген-активируемая протеинкиназа
MAP1LC3A – ассоциированные с микротрубочками белки 1A / 1B легкой цепи 3A
MGL1, MGL2 – связывающие галактозу лектин 1, 2
MIP-1 α , MIP-1 β – макрофагальный белок воспаления 1 альфа, 1 бета
mLST8 – цель субъединица комплекса рапамицина
MMP – металлопротеиназы
MR – маннозный рецептор
MRC1 – маннозный рецептор C-типа 1
mtROS – митохондриальные активные формы кислорода
mTOR – мишень рапамицина млекопитающих
mTORC1, mTORC2 – мишень рапамицина млекопитающих комплекс 1, 2
MyD88 – ген первичного ответа миелоидной дифференцировки 88
NF- κ B-p65 – ядерный фактор «каппа-би»
NOS – синтаза оксида азота, NO-синтаза
PDGF – тромбоцитарный фактор роста
PD-L1 – лиганд программируемой клеточной смерти 1
PGC-1 β – β рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами коактиватор 1
PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа
PIP2 – фосфатидил (4,5)-бисфосфат
PIP3 – фосфатидилинозитол (3,5) -трифосфат
PKC – протеинкиназа C
PRAS40 – богатый пролином субстрат АКТ 40 кДа
p-P70S6K – рибосомный белок S6 киназа бета-1

Rab7 – Ras-родственный белок Rab-7a
Rac1 – Ras-связанный субстрат 1 ботулотоксина С3
Raptor – регуляторный ассоциированный белок комплекса MTOR1
RILP – Ras-родственный белок Rab-7a
Rheb – обогащенный в головном мозге гомолог Ras
SKIP – белок, взаимодействующий со сфингозинкиназой
SMAD – матери против декапентаплегического гомолога 1
SR-A – рецептор-мусорщик
STAT – преобразователь сигналов и активатор транскрипционных белков
TAMs – опухоль-ассоциированные макрофаги
TCR – Т-клеточный рецептор
Tel2 – поддерживающие теломеры белок 2
TGF- β – трансформирующий фактор роста бета
TLR4 – толл-подобный рецептор 4
TNF- α – фактор некроза опухоли альфа
TSC1, TSC2 – гамаргин, туберин
Tti1 – Tel2-взаимодействующий белок
ULK1 – unc-51 подобная киназа 1, активирующая аутофагию
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
Ym1, Ym2 – хитиназоподобный белок 1, 2
АПК – антигенпрезентирующая клетка
АТФ – аденозинтрифосфат
АФК – активные формы кислорода
Гр – Грей
ЛПС – бактериальный липополисахарид
4EBP-1 – эукариотический фактор инициации трансляции 4E-связывающий белок 1
 γ – гамма-облучение

1. Введение

Опухоль-ассоциированные макрофаги (ОАМ) являются самой многочисленной популяцией в микроокружении солидных опухолей (Gentles A. J. & Newman A. M., 2015).

Среди ОАМ преобладают макрофаги с противовоспалительным (M2, или альтернативно активированным) фенотипом, направленными на подавление воспаления, продукцию противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-4, IL-13 и т.д.) и факторов роста (TGF- β , VEGF, EGF и т.д), способствующих развитию опухоли (Cassetta L. & Pollard J. W., 2018). При воздействии терапии, направленной на уничтожение злокачественного образования, происходит поляризация клеток – фенотипические и функциональные изменения макрофагов в сторону про- или противовоспалительной активности. Воздействие терапии на макрофаги в дальнейшем может повысить чувствительность или, наоборот, способствовать лекарственной и радиоустойчивости опухоли. В частности, нарушение антигенпрезентирующей функции, которое наблюдается у опухоль-ассоциированных макрофагов, помогает избежать опухоли воздействия радиотерапии и продолжать деление (Seifert L. e.a., 2016; Ruffell B., Coussens L., 2015; Crittenden M. e.a., 2012).

Лучевая терапия является одним из основных терапевтических подходов, используемых в онкотерапии (Connell P. & Hellman S., 2009). Облучение, направленное на опухоль, влияет и на поляризацию макрофагов. После воздействия ионизирующего излучения макрофаги могут активироваться в противовоспалительный фенотип, который благоприятствует развитию опухоли и снижает терапевтическое воздействие радиотерапии (Petrillo M. e.a., 2015). После облучения также могут формироваться провоспалительные макрофаги (M1, или классически активированные макрофаги), которые активируют острый воспалительный иммунный ответ и подавляют опухоль (Wu Q., Allouch A., Paoletti A., 2017).

Провоспалительные макрофаги напрямую уничтожают опухолевые клетки или активируют другие иммунные клетки против опухоли. В частности, провоспалительные макрофаги экспрессируют лейкоцитарный антиген второго класса HLA-DR на своей клеточной мембране и, таким образом, обладают активной способностью к презентации антигена и активации противоопухолевого Т-клеточного иммунитета (Haabeth O., Tveita W., Fauskanger A., 2014). После облучения изменяется локализация HLA-DR в

антигенпрезентирующих клетках (Stary V. e.a., 2020; Pinto A. e.a., 2016). Однако до сих пор нет достаточно информации о механизмах регуляции HLA-DR в ответ на радиотерапию. Нарушение антигенпрезентирующей функции, которое наблюдается у опухоль-ассоциированных макрофагов, помогает избежать опухоли воздействия радиотерапии и продолжать деление (Seifert L. e.a., 2016).

Таким образом, понимание механизмов регуляции антигенпрезентирующей функции макрофагов при воздействии излучения необходимо для разработки новых подходов в иммунорадиотерапии. Поляризация опухоль-ассоциированных макрофагов в провоспалительный фенотип и индукция антигенпрезентирующей функции макрофагов должны повысить положительный эффект радиотерапии.

В данной работе рассмотрена проблема регуляции экспрессии рецептора HLA-DR и цитокинового профиля в модели опухоль-ассоциированных макрофагов, линии моноцитов человека THP-1. Основное внимание в данной работе уделено предполагаемому регулятору мембранной экспрессии HLA-DR – пути мишени рапамицина млекопитающих (mechanistic target of rapamycin, mTOR), который участвует в регуляции аутофагии и клеточной гибели, а также является одной из новых перспективных мишеней для фенотипической и функциональной регуляции макрофагов (Saric A. e.a., 2015; Mercalli A. e.a., 2013). В связи с этим, цель данной работы – изучить влияние умеренной дозы гамма-излучения и подавления mTORC1 с помощью ингибитора рапамицина на противоопухолевую активность моноцитов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Создать модель опухоль-ассоциированных макрофагов и провести ее валидацию с помощью МТТ-теста на жизнеспособность, описания морфологических характеристик моноцитов и определения поверхностной экспрессии HLA-DR с помощью проточной цитофлуориметрии;
2. Изучить изменения поверхностной экспрессии HLA-DR в моноцитах THP-1 и модели опухоль-ассоциированных макрофагов после терапевтических доз гамма-излучения методом проточной цитофлуориметрии;
3. Исследовать уровни генной экспрессии провоспалительных маркеров, таких как IL6, IL1B, CD80, CCL2 и CXCL10, в моноцитах THP-1 после воздействия гамма-излучения методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР);

4. Описать изменения морфологических характеристик моноцитов THP-1 и модели опухоль-ассоциированных макрофагов после воздействия гамма-излучения с помощью световой микроскопии;
5. Выявить влияние ингибитора mTORC1 рапамицина, на характер поверхностной экспрессии HLA-DR в моноцитах THP-1 и модели опухоль-ассоциированных макрофагов;
6. Изучить воздействие ингибитора mTORC1 рапамицина на провоспалительные и противовоспалительные маркеры, такие как IL1B, TNFA и ARG1, в моноцитах THP-1 и модели опухоль-ассоциированных макрофагов

2. Литературный обзор

Профиль цитокинов, хемокинов, других секретируемых клеткой веществ (активных форм кислорода, аргиназы-1 и т.д.) и наличие рецепторов на клеточной мембране определяет фенотип макрофагов, поэтому при изучении эффектов радиотерапии и рапамицина необходимо учитывать данные характеристики клеток. В данном обзоре приводится актуальная информация о роли опухоли, радиотерапии и mTORC1 в регуляции про- и противоопухолевой активности моноцитов/макрофагов.

Также помимо маркеров, свойственных M1/M2 макрофагам, рассматривается влияние облучения и регуляции mTORC1 на выживаемость моноцитов/макрофагов. Успех терапии зависит от клеточной выживаемости. Жизнеспособность провоспалительных макрофагов будет благоприятствовать лечению, тогда как устойчивость противовоспалительных макрофагов будет снижать эффект.

2.1. Фенотип макрофагов

Активированные макрофаги разделяют на два фенотипа: M1 (классические, провоспалительного типа) и M2 (альтернативные, противовоспалительного типа) (См. Рисунок 1).

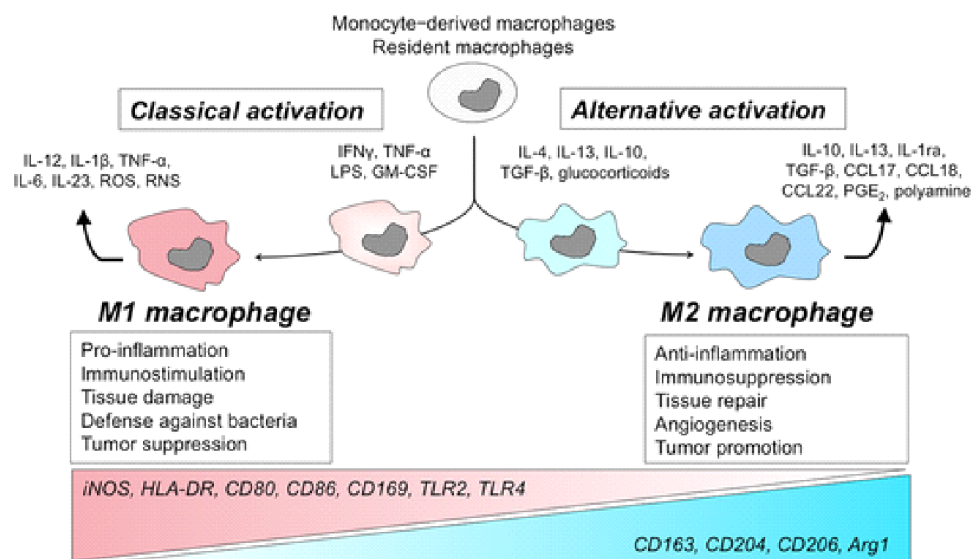


Рис.1. Поляризация макрофагов в про- и противовоспалительный фенотип (Takeya M., & Komohara Y., 2016)

Лиганды толл-подобных рецепторов (toll-like receptors, TLR), бактериальный липополисахарид (ЛПС) и липотейхоевая кислота, а также провоспалительные факторы, фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) и интерферон гамма (interferon gamma, IFN- γ) индуцируют M1 поляризацию. M1 макрофаги стимулируют воспалительный ответ через продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов; интерлейкин 1 бета (interleukin 1 beta, IL-1 β), TNF- α , интерлейкины 6, 12 и 23 (interleukin-6, -12, -23, IL-6, IL-12, IL-23), хемокин (C-X-C мотив) лиганд 9 и 10 (chemokine C-X-C motif ligand -9, -10, CXCL9, CXCL10), хемокин (мотив CC) лиганд 15 (Chemokine C-C motif ligand 15, CCL15). Также M1 являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками (АПК), поэтому они экспрессируют значительное количество рецептора главного комплекса гистосовместимости II класса, изотипа DR (Human Leukocyte Antigen – DR isotype, HLA-DR) на клеточной мембране. Провоспалительные макрофаги производят активные формы кислорода (АФК) и оксид азота (NO), направленных на прямое уничтожение опухолевых клеток (Takeya M., & Komohara Y., 2016; Li Yang & Yi Zhang, 2017).

Противовоспалительные макрофаги подавляют иммунный ответ и способствуют опухолевому ангиогенезу. Они активируются противовоспалительными цитокинами; интерлейкинами 4, 13 и 10 (interleukin-4, -13, -10, IL-4, IL-13, IL-10). M2 макрофаги секретируют цитокины IL-4, IL-10, IL-13, трансформирующий фактор роста бета (Transforming growth factor beta, TGF- β), фактор роста эндотелия сосудов (Vascular

endothelial growth factor, VEGF), эпидермальный фактор роста (Epidermal growth factor, EGF), тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor, PDGF), матриксные металлопротеиназы (Matrix metalloproteinases, MMP), аргиназу 1 (arginase 1, Arg-1), простагландины, метаболиты индолеамина 2,3-диоксигеназы и хемокины (мотив CC) лиганд -17, -22, -24 (Chemokine C-C motif ligand CCL17, CCL22, CCL24). Противовоспалительные макрофаги экспрессируют на клеточной мембране повышенное количество рецепторов: кластер дифференцировки 163 и 204 (Cluster of Differentiation 163, 204, CD163, CD204), рецептор-мусорщик (Scavenger receptor class A, SR-A), маннозный рецептор (Cluster of Differentiation 206, CD206), галактозный рецептор (galactose receptor, GR), антагонист рецептора интерлейкина 1 (Interleukin 1 receptor antagonist, IL-1RA) (Li Yang & Yi Zhang, 2017). Опухоль-ассоциированные макрофаги имеют больше маркеров M2 макрофагов, перечисленные выше, хотя могут экспрессировать и секретировать факторы, характерные и для провоспалительного фенотипа; хемокин (мотив CC) лиганд 5 (Chemokine (C-C motif) ligand 5, CCL5), CXCL9, CXCL10 и цитокин IL-6.

Наличие или преобладание одного фенотипа макрофага над другим может говорить о злокачественности и степени развития опухоли (Ma J. e.a., 2010; Fridman W. e.a., 2017). Например, пациенты, больные колоректальным раком, имеют больший шанс на выздоровление, если у них преобладает популяция провоспалительных макрофагов, и риск на дальнейшее развитие заболевания, если в опухоли больше противовоспалительных макрофагов, в связи с чем направленная поляризация макрофагов по про- или противовоспалительному фенотипу является важной стратегией противоопухолевой терапии (Pinto M. e.a., 2019).

2.2. Влияние радиотерапии на фенотип и жизнеспособность макрофагов

Радиотерапия – один из основных способов лечения онкологических заболеваний. Обычно в терапии применяются гамма (γ), рентгеновское (X-ray) и протонное излучение. Радиотерапия применяется в виде однократного курса или фракционированного лечения в зависимости от типа опухоли и индивидуальных характеристик пациента (Genard G., Lucas S., Michiels C., 2017). Дозы облучения можно классифицировать на низкие (менее 1 Гр), умеренные (2-10 Гр) и высокие (более 10 Гр). В первую очередь радиотерапия нацелена на прямое уничтожение опухолевых клеток. Излучение влияет на регуляторы клеточного цикла, индуцирует проапоптотические сигнальные пути и клеточную смерть опухолевых

клеток (Liu S. e.a., 2004; Komuro Y. e.a., 2005). В то же время радиотерапия способна активировать выживание опухоли. Активация мутантных форм онкосупрессоров, а также увеличение количества мутаций в ходе ошибок системы репарации ДНК ограничивают положительное действие излучения. (Zhu X. e.a., 2018; Narima Y. e.a., 2001; Schlaff C. D. e.a., 2014).

Однако радиотерапия, направленная на подавление роста опухоли, оказывает действие и на компоненты опухолевого микроокружения, что может усиливать положительный эффект лечения, так и наоборот, ограничивать его. Опухоль-ассоциированные фибробласты поддерживают радиоустойчивость, изменение роста и проницаемости сосудов под действием облучения, а также мигрирующие в микроокружение Т-регуляторные клетки благоприятствуют развитию опухоли (Ahmed M. A. e.a., 2016; Sonveaux P. e.a., 2003; Mondini M. e.a., 2019). Рекрутирование цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов в микроокружение опухоли и активация дендритных клеток улучшает эффект терапии (Balermpras P. e.a., 2014; Gupta A. e.a., 2012).

Лучевая терапия влияет на фенотип и выживаемость макрофагов напрямую, либо через воздействие на другие клетки. В первом случае после облучения в макрофагах происходит разрушение молекулярных связей в молекуле ДНК из-за ионизации атомов в ДНК, либо в результате радиолиза воды. Взаимодействие энергии излучения с молекулами воды формирует реакционноспособные радикалы, вызывающие одно- и двунитевые разрывы ДНК. При этом к местам разрыва рекрутируются белки и запускаются сигнальные пути, которые впоследствии могут привести к клеточной гибели, выживанию или изменению фенотипа макрофагов (Parker J. e.a., 2013). Кроме того, опухолевые клетки и клетки микроокружения под влиянием радиотерапии подвергаются структурным и функциональным изменениям, а также стрессовым воздействиям, изменяют свой фенотип и производят факторы, влияющие на поляризацию макрофагов (Wang Shu-Chi. e.a., 2013). Повреждение опухолевых клеток может приводить к высвобождению внутриклеточного содержимого, включающего ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны или DAMPs (Damage-associated molecular patterns). К ним относят группу кальций-связывающих белков с низким молекулярным весом S100, амфотерин (high-mobility group protein B1, HMGB1), белки теплового шока (70 kilodalton heat shock proteins, HSP70) и мочевую кислоту. Также при облучении в поврежденных клетках может происходить генерации активных форм кислорода (АФК), которые вызывают оксидативный стресс и

провоспалительный ответ. DAMPs и другие неизвестные факторы секретируются экзосомами, обладающими благодаря своему содержимому иммуносупрессивной активностью (Apetoh L. e.a., 2007; Schildkopf P. e.a., 2011; Xia C. e.a., 2018; Martinon F. e.a., 2006; Hwa Ko J. e.a., 2017; Wu Q. e.a., 2017; Stary V. e.a., 2020).

Таким образом, с одной стороны, применение радиотерапии ведет к перепрограммированию опухоль-ассоциированных макрофагов в провоспалительный фенотип напрямую или с помощью других клеточных популяций, что приводит к подавлению развития опухоли. С другой стороны, происходит поляризация макрофагов в противовоспалительный фенотип, способствующих выживанию и пролиферации злокачественных клеток.

Про- и противовоспалительные макрофаги обладают различной чувствительностью к облучению, что также может приводить к изменению иммунного статуса опухоли. Известно, что M2 макрофаги микроопухолевого окружения более устойчивы к рентгеновскому излучению (2-8 Гр) нежели M1 макрофаги, которые гибнут с помощью митотической катастрофы (Leblond M. e.a., 2017). В случае протонной радиотерапии, наоборот, M1 более радиоустойчивы (Genard G. e.a., 2018). Другой эксперимент показал, что после облучения в макрофагах активируются антиапоптотические факторы, которые способствуют их выживаемости (Pinto T. A. e.a., 2016). Макрофаги, в отличие от моноцитов, менее подвержены каспаз-зависимому апоптозу, так как экспрессия каспазы 8 в них понижена (Yoshino H. e.a., 2018). Выживание опухоль-ассоциированных макрофагов может ограничивать положительные эффекты химио- и радиотерапии.

2.3. Роль МТОRС1 в регуляции фенотипа макрофагов

Мишень рапамицина млекопитающих (mammalian target of rapamycin, mTOR) относится к серин/треониновым киназам, семейству ферментов фосфоинозитид-3-киназ. Рецептор mTOR представлен двумя мультипротеиновыми комплексами: мишенями рапамицина млекопитающих комплексом 1 и 2 (mammalian target of rapamycin complex 1, 2, mTORC1, mTORC2). В обоих комплексах киназа mTOR является центральным каталитическим компонентом. Цель субъединица комплекса рапамицина (mammalian lethal with SEC13 protein 8, mLST8), ДЭП содержащий домен mTOR взаимодействующий белок (DEP Domain Containing mTOR Interacting Protein, DEPTOR), Tel2-взаимодействующий белок и поддерживающий теломеры белок 2 (Tel2-interacting protein 1, Tti1 и telomere

maintenance 2, Tel2) участвуют в сборке и поддержание стабильности мультиферментного комплекса. В комплекс mTORC1 также входят компоненты: регуляторный ассоциированный белок комплекса mTORC1 (regulatory associated protein of mTOR complex 1, Raptor), богатый пролином субстрат АКТ 40 кДа (proline-rich AKT substrate 40, PRAS40), Ras-связанный субстрат 1 ботулотоксина С3 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1) и регулируемый глюкозой белок 58 (glucose-regulated protein 58, GRp58) (Kim L. C. e.a., 2017).

Главными сигнальными мишенями mTORC1 являются участвующие в трансляции рибосомный белок S6 киназа бета-1 (ribosomal protein S6 kinase beta-1, p-P70S6K) и эукариотический фактор инициации трансляции 4E-связывающий белок 1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, 4EBP-1) (Conciatori, F. e.a., 2018). В дальнейшем мы будем рассматривать только комплекс mTORC1.

mTOR участвует в регуляции метаболизма, пролиферации и дифференцировки широкого ряда клеточных популяций, в том числе моноцитов и макрофагов, а также связан с рекрутированием иммунных клеток в опухоль (Covarrubias A. e.a., 2015; Conciatori F. e.a., 2018). Опухолевые клетки способны действовать на фенотип макрофагов, действуя через сигнальные пути mTOR. EGF индуцирует путь mTOR, связываясь с рецептором эпидермального фактора роста (Epidermal growth factor receptor, EGFR) и воздействует на фосфатидилинозитол-3-киназу (Phosphoinositide 3-kinases, PI3K) и протеинкиназу В (Protein kinase B, Akt). Стрессовые агенты, которые присутствуют в опухолевом микроокружении, также активируют путь mTOR, воздействуя на сигнальный белок и активатор транскрипции (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) и гипоксией индуцированный фактор-1 альфа (Hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 α) (Shan M. e.a., 2017).

Немаловажную роль в регуляции активности макрофагов играет процесс аутофагии, ингибитором которого является mTOR. Аутофагия – это процесс деградации внутренних компонентов клетки (Mizushima N. & Levine B., 2010). Аутофагию вызывает клеточный стресс (голодание, гипоксия), поэтому потенциально облучение и опухолевые клетки могут стимулировать аутофагию макрофагов. Запуск аутофагии может осуществляться через регуляцию сигнального пути PI3K/Akt/mTOR (Vergadi E. e.a., 2017). Процесс аутофагии начинается с того, что чужеродные антигены попадают в изоляционную мембрану, содержащую ассоциированные с микротрубочками белки 1A / 1B легкой цепи 3A (microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A, MAP1LC3A), которые нужны для образования аутофагосомы. Аутофагосома сливается с лизосомами с образованием

аутофаголизосомы, где должна произойти деградация чужеродного белка. mTOR не даёт произойти процессу аутофагии. mTOR подавляет комплекс ULK1, состоящий из киназы Unc-51 (like autophagy activating kinase), белок с массой 200 кДа, взаимодействующий с семейством киназ фокальной адгезии (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD, FIP200), связанный с аутофагией белок 13 (autophagy-related protein 13, ATG13) и регулятор аутофагии 1 беклин 1 (autophagy and beclin 1 regulator 1, AMBRA1), участвующих в образовании аутофаголизосом (Cerni S. e.a., 2019; Saric A., 2016).

Иногда результатом аутофагии является клеточная смерть. Аутофагия, опосредованная подавлением mTOR, приводит к апоптотической смерти противовоспалительных макрофагов и макрофагов атеросклеротических бляшек (Mergalli A. e.a., 2013; Martinet W. e.a., 2007). Однако не всегда mTOR и аутофагия влияют на клеточную жизнеспособность (Lin H. e.a., 2014). Активация аутофагии может приводить к изменению фенотипа макрофагов, например, к поляризации макрофагов в провоспалительный фенотип (Shan M. e.a., 2017). Также аутофагия играет важную роль в процессе презентации антигена (Dengjel J. e.a., 2005).

Важнейшая функция mTORC1 – это регуляция поляризации макрофагов по про- или противовоспалительному направлению. На данный момент существуют противоречивые данные о роли mTORC1 в этих процессах. С одной стороны, активность mTOR связана с M2 фенотипом макрофагов. С другой стороны, постоянная активация mTORC1 может приводить к снижению противовоспалительных маркеров в M2 макрофагах и повышать провоспалительный ответ (См. Таблицу 1).

Таблица 1. Регуляция цитокинового профиля моноцитов и макрофагов с помощью mTORC1

Воздействие	Профиль	Модель	Ссылки
↑mTOR	Провоспалительный фенотип: ↑NOS	Моноциты, активированные GM-CSF и IFN-γ	(Ribechini E. e.a., 2017)

↑mTOR	Провоспалительный фенотип: ↑IL-6, TNF ↓Arg-1, Fizz1, MGL1, MGL2, Ym1, PGC-1β, IL-10	Макрофаги, выделенные из костного мозга и активированные IL-4, либо ЛПС	(Byles V. e.a., 2013)
↓mTOR	Провоспалительный фенотип: ↑IL-12, IL-6, TNF-α, IL-1β, CXCL9, CXCL10, INF-γ, GM-CSF и IL-1RA ↓IL-10, VEGF, CD206, IL-6	Моноциты, активированные ЛПС In vivo модель (пациенты)	(Chen W. e.a., 2012; Mercalli A. e.a., 2013; Shan M. e.a., 2017)
↓mTOR	Противовоспалительный фенотип: ↑Arg-1, CD206, TGF-β, IL-4, IL-10, Ym1, Ym2 ↓TNF, CCL2, NOS, CD68, CD80, IFN-γ, IL-17, IL-1α, IL-1β, CCL22	In vivo модель (мыши)	(Jiang H. e.a., 2014; Han R. e.a., 2016; Li D. e.a., 2016)
↓mTOR	Противовоспалительный фенотип: ↓CCL2, IL-8, CCL5, MIP-1α, MIP-1β, IL-10, IL-6	Моноциты, неактивированные, либо активированные ЛПС	(Lin H. e.a., 2014; Schaeffer V. e.a., 2011; Hwa Ko J. e.a., 2017)

Известно несколько механизмов регуляции фенотипа макрофагов через mTORC1 (См. Рисунок 2).

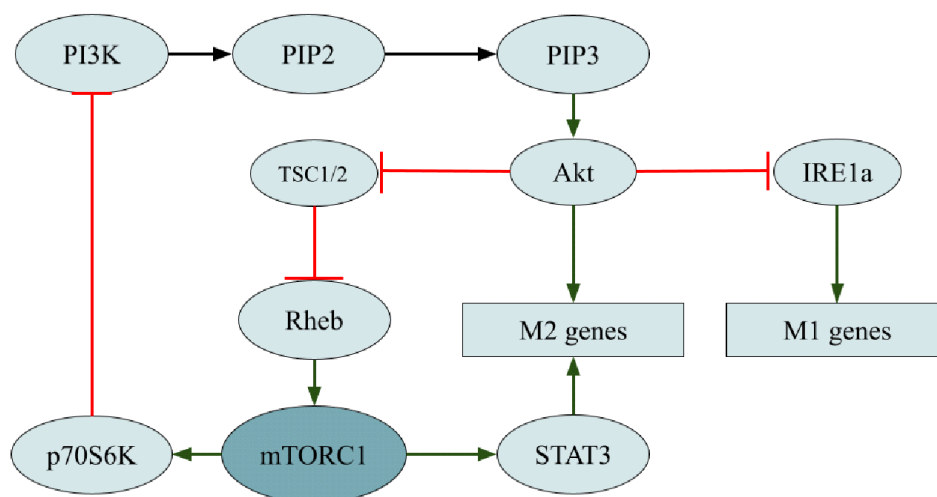


Рис.2. Сигнальные пути mTORC1, регулирующие фенотип макрофагов

1) mTORC1 поляризует макрофаги в M2 фенотип через активацию STAT3. STAT3 повышает экспрессию проопухолевого, противовоспалительного цитокина IL-10 и снижает экспрессию гена провоспалительного цитокина IL-12 (Chen W. e.a., 2012);

2) Поляризация в M1 и M2 фенотип зависит от регуляции сигнального пути PI3K-Akt-mTOR. Важно отметить, что поляризация макрофагов по классическому или альтернативному пути зависит от изоформ PI3K/Akt, участвующих в сигнальных путях mTORC1 (Vergadi E. e.a., 2017). mTORC1 является негативным регулятором Akt, которая в ответ на стимул (IL-4) активизирует противовоспалительные и ингибирует провоспалительные маркеры макрофагов.

С одной стороны, Akt ингибирует путь mTOR через подавление эндорибонуклеазы инозит-требующего фермента 1 альфа (endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1 alpha, IRE1 α), стимулирующего воспаление (Jiang H. e.a., 2014). При хронической активации mTOR активность Akt полностью подавляется и происходит повышение экспрессии воспалительных цитокинов (Byles V. e.a., 2013). mTORC1 подавляет Akt через p-P70S6K, которая ингибирует PI3K, не давая ей превратиться в фосфатидил (4,5)-дифосфат (PIP2) и затем в фосфатидилинозитол (3,5)-трифосфат (PIP3), и не позволяет PIP3 активировать Akt (Han R. e.a., 2016).

С другой стороны, Akt активирует mTORC1 через подавление гамартина и туберина (Tuberous Sclerosis Complex 1, 2; TSC1, TSC2), которые ингибируют обогащенный в головном мозге гомолог Ras (Ras homolog enriched in brain, GTPase Rheb), необходимый для активации mTOR. (Inoki K. e.a., 2002). Костный морфогенетический белок-7 (Bone

morphogenetic protein-7, BMP-7) также активирует путь PI3K-Akt-mTOR через белок матери против декапентаплегического гомолога 1 (Mothers against decapentaplegic homolog 1, SMAD), что приводит к поляризации макрофагов в M2 фенотип (Rocher C. e.a., 2013).

Активные формы кислорода подавляют путь PI3K/AKT/mTOR, что приводит к запуску аутофагии, о которой шла речь выше. Следствием аутофагии в данном случае являлось снижение воспалительного ответа (IL-1 β , IL-12 и TNF- α) (Jiang Y. e.a., 2017).

3) mTORC1 регулирует сигнальные пути ядерного фактора каппа-би (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B-p65) и p38 митоген-активируемую протеинкиназу (p38 mitogen-activated protein kinase, MAPK-p38), которые повышают продукцию провоспалительных цитокинов, поэтому при ингибировании mTORC1 может наблюдаться снижение воспалительных маркеров (Lin, Hugo You-Hsien 2014). В норме при стимуляции ЛПС и аденозинтрифосфатом (АТФ) в макрофагах повышается уровень митохондриальных активных форм кислорода (mtROS) и цитокина про-IL-1 β . MtROS активируют каспазу-1, которая приводит к созреванию про-IL-1 β и аутокринной секреции IL-1 β , который стимулирует сигнальные пути NF- κ B-p65 и MAPK-p38. mTORC1 является ингибитором аутофагии. Следовательно, при подавлении mTOR происходит запуск аутофагии и удаление из макрофагов про-IL-1 β и mtROS, что приводит к снижению воспалительного ответа (Hwa Ko J. e.a., 2017).

Таким образом, патологические изменения фенотипа макрофагов могут происходить при нарушении сигнальных путей mTORC1/STAT3, mTORC1/PI3K/Akt и процесса аутофагии, которые могут служить потенциальными диагностическими маркерами и терапевтическими мишенями (Byles V. e.a., 2013; Weichhart T. & Säemann M. D., 2008). Одним из наиболее широко используемых ингибиторов mTORC1 является рапамицин. Его применение может влиять на регуляцию сигнальных путей mTORC1 и приводить к перепрограммированию макрофагов, в том числе опухоль-ассоциированных макрофагов.

2.4. Антигенпрезентирующая функция макрофагов

Макрофаги являются одними из основных антигенпрезентирующих клеток (АПК) у млекопитающих. Они экспрессируют набор молекул главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II), которые связывают чужеродные антигены. Важнейшей функцией макрофагов является транспорт комплексов МНС II с антигеном на плазматическую мембрану для последующего распознавания Т-лимфоцитами. Макрофаги с

помощью HLA-DR (человеческий лейкоцитарный антиген, сублокус DR) выставляют на своей мембране пептид-антиген, захваченный извне. Наивные CD4+ Т-лимфоциты распознают комплекс HLA-DR с антигеном и активируются в Т-хелперы. Активированные Т-хелперы выделяют цитокины, которые стимулируют функции Th1 и Th2 клеток (Т-хелперов 1 и 2 типа). Th1 продуцируют IL-2 и IFN- γ , индуцирующие цитотоксические Т-клетки CD8 + и NK-клетки (Натуральные киллеры). Цитотоксические Т-клетки выделяют перфорин и гранзимы, нарушающие мембрану клеток мишеней. Таким образом, активация CD4+ Т-лимфоцитов через HLA-DR приводит к запуску воспалительного ответа и подавлению опухоли (Nakamura T. e.a., 2019) (См. Рисунок 3).

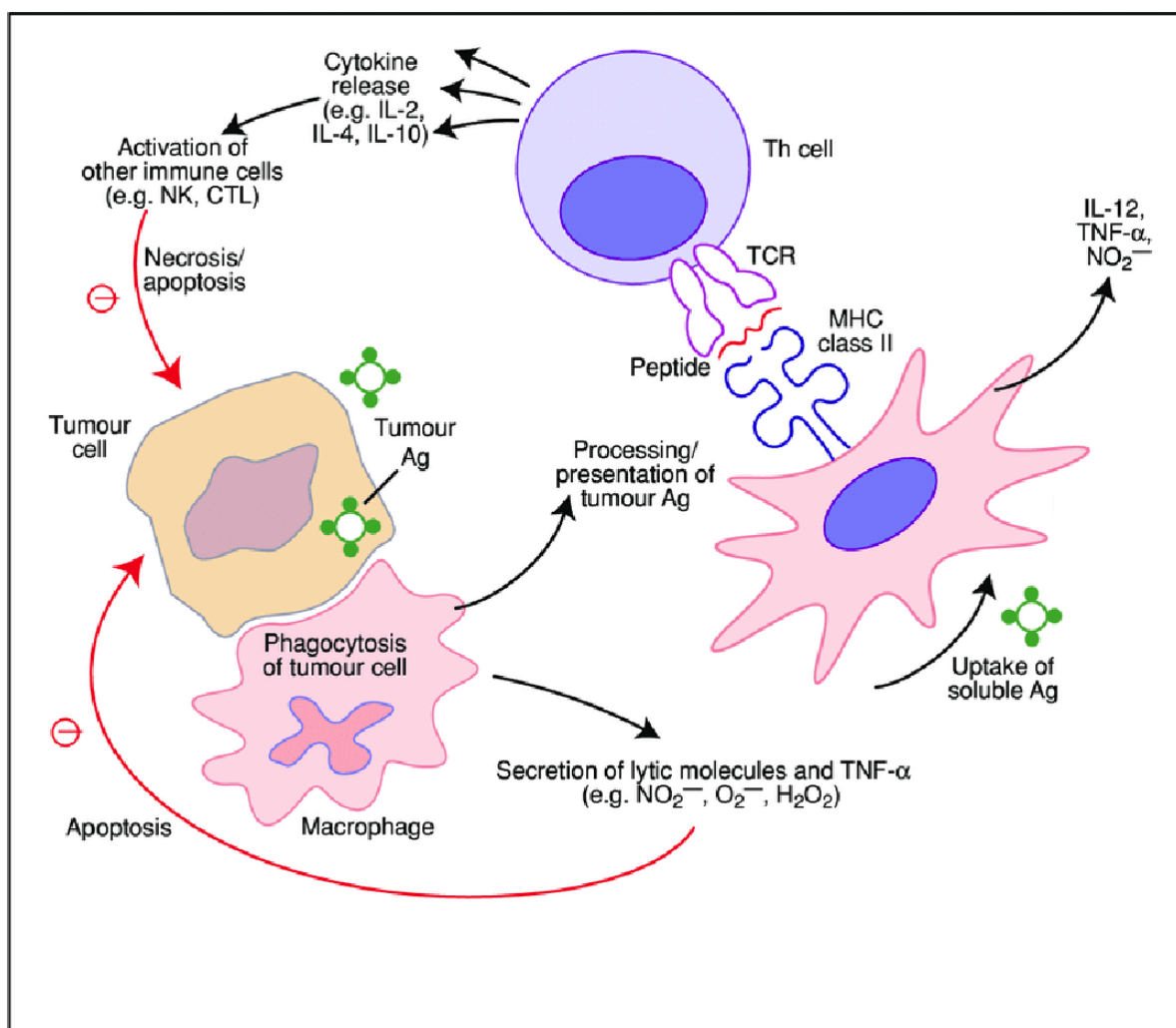


Рис.3. Активация CD4+ лимфоцитов с помощью презентации антигена МНС II (Mitra R. e.a., 2003). Макрофаги поглощают антигены опухолевых клеток, процессируют и презентуют их Т-хелперам (Th) через молекулы класса II главного комплекса гистосовместимости (МНС class II), которые взаимодействуют с Т-клеточным рецептором

(TCR) Th. Th-клетки активируются, секретируют цитокины, которые, в свою очередь, активируют другие иммунные клетки, такие как натуральные киллеры (NK) и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL). Макрофаги также секретируют литические молекулы, цитокины против опухоли и для активации иммунных клеток.

2.4.1. Организация HLA-DR у моноцитов и макрофагов

HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – DR isotype), как и -DQ, -DP, относится к II классу из трех классов главного комплекса гистосовместимости человека. HLA-DR кодируется 6 хромосомой (локус бр21.31) и образован двумя гликопротеиновыми цепями: тяжелой α цепью и легкой β цепью. Цепи образуют четырех-доменную структуру, так как каждая цепь состоит из двух доменов (α цепь из $\alpha 1$ и $\alpha 2$, β цепь из $\beta 1$ и $\beta 2$). Легкая цепь имеет молекулярную массу 31—34, тяжелая 26—29 кДа. HLA-DR имеют в своем составе пептид-связывающий участок или антиген-связывающую бороздку, через которую рецептор связывает и затем презентует на своей мембране чужеродный пептид, размером от 13 аминокислот (Hennecke J. & Wiley D. C., 2002). CD4 связывается с $\beta 2$ доменом HLA-DR, а Т-клеточный рецептор (T-cell receptor, TCR) распознает антиген-связывающий участок, в котором находится чужеродный пептид (Rudolph M. e.a., 2006).

Комплексы HLA-DR обнаруживаются на поверхности клеточной мембраны антигенпрезентирующих клеток, к которым относятся дендритные клетки, В-лимфоциты, клетки Лангерганса, эпителиальные клетки тимуса, макрофаги и моноциты. Представленность HLA-DR на мембране различается между АПК. Незрелые дендритные клетки экспрессируют в 4,6 и 1,5 раза больше HLA-DR, чем моноциты и макрофаги (Bertho N. e.a., 2000).

2.4.2. Цикл HLA-DR

Для презентации чужеродного антигена на мембране дендритные клетки и макрофаги захватывают чужеродные белки путем эндоцитоза. Процесс переноса антигена на поверхностную мембрану состоит из нескольких этапов: 1) Синтезированный рецептор МНС II вместе с инвариантной цепью Ii (HLA-DR antigens-associated invariant chain, CD74) локализуется в эндоплазматическом ретикулуме. Ii нужен для предотвращения связывания бороздки МНС II с пептидами ретикулума и непротессированных чужеродных белков эндосомы. Также Ii направляет комплекс в раннюю эндосому (Ii несет последовательности,

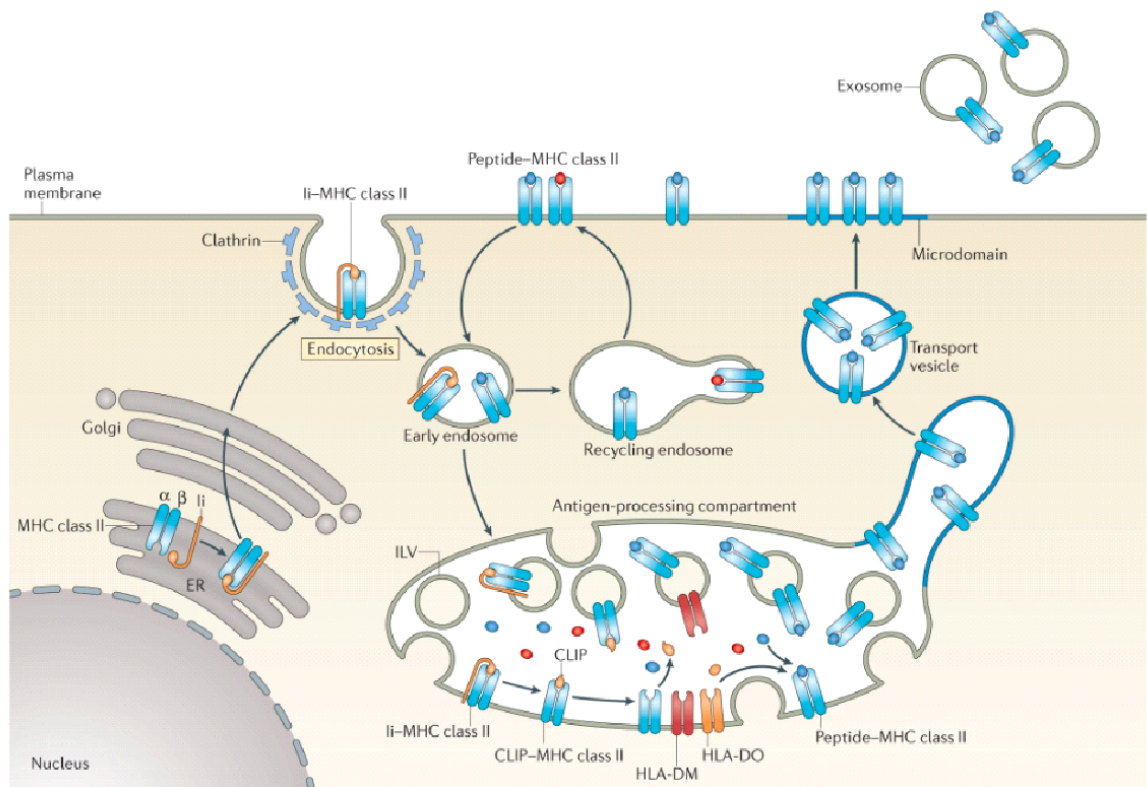
удерживающие комплекс в эндосоме). Ii представляет собой мембранный гликопротеин II типа; его amino-конец находится в цитозоле, трансмембранный участок проходит через мембрану эндоплазматического ретикулума, а карбокси-конец направлен в полость эндоплазматического ретикулума. Ii имеет уникальный цилиндрический домен, который опосредует образование стабильных тримеров Ii. Каждая субъединица тримера Ii нековалентно связывается с МНС II гетеродимером через пептидную последовательность Ii – ассоциированный с классом II инвариантный цепной пептид (Class II-associated invariant chain peptide, CLIP). CLIP находится внутри пептид-связывающей бороздки МНС II и блокирует преждевременное связывание с белками

2) 2.1 Образованный 9-цепями (3b, 3a цепи МНС II и 3 цепи Ii) комплекс отсоединяется от кальнексина, с которым он был связан в эндоплазматическом ретикулуме, и поступает в раннюю эндосому с низким рН, где происходит связывание чужеродного антигена с пептид-связывающей бороздкой. Здесь происходит удаление Ii домена тримеризации кислотными протеазами, образование 22-кДа фрагмента Ii (LIP22) и последующее расщепление этого фрагмента до LIP10 (10-кДа фрагмент Ii). Затем катепсин S (Cathepsin S, catS) расщепляет LIP10 таким образом, что остается участок CLIP, блокирующий пептид-связывающую бороздку.

2.2 Параллельно с этим происходит процессинг чужеродного белка в лизосомах. Белковые антигены процессируются лизосомальными катепсинами, протеазами, которые оптимально функционируют при низком рН и расщепляют белки по определенным аминокислотным остаткам с образованием пептидов длиной от 13 до 24 аминокислот.

3) Образование поздней эндосомы. Эндосома с МНС II, или МНСII-содержащий компартмент, и CLIP сливается с везикулярным компартментом (например, лизосомой), содержащей процессированный антиген. Человеческий лейкоцитарный антиген DM (human leukocyte antigen DM, HLA-DM) высвобождает CLIP из бороздки, что позволяет МНС класса II связаться с антигеном.

4) После связывания антигена с МНС II в МНСII компартменте АПК доставляют комплекс антиген-МНС II на свою плазматическую мембрану для распознавания Т-лимфоцитами (Unanue E. R., 1984; Hiltbold E. M. & Roche P. A., 2002) (См. Рисунок 4).



Nature Reviews | Immunology

Рис.4. Транспорт HLA-DR (Roche P. & Furuta K., 2015)

HLA-DR может повторно интернализироваться, связываться с антигеном и возвращаться на мембрану. Для интернализации HLA-DR необходимо физическое связывание с инвариантной цепью (Karakikes I. e.a., 2012; MOLDENHAUER e.a., 1999).

Нужно упомянуть, что интернализация HLA-DR у разных клеток происходит достаточно быстро (от 3 до 45 минут) (Roche P. A. e.a., 1993; Girolomoni G. e.a., 1990). На дендритных клетках показано, что клатриновый адаптерный комплекс (AP2 adaptor complex, AP-2) участвует в транспорте MHC класса II с поверхности мембраны путем связывания двух повторов лейцина в положении 8 и 9 инвариантной цепи Ii. Молекулы MHC II затем транспортируются в эндосомальные компартменты, когда клатриновая оболочка организована (Karakikes I. e.a., 2012).

Участие AP-2 в интернализации HLA-DR доказывает тот факт, что при истощение AP-2 происходит значительное увеличение на поверхности HLA-DR с Ii (Dugast, M 2005). Помимо того, что без Ii рецептора не может происходить интернализации, Ii нужен для выполнения антигенпрезентирующей функции (Beller D. I. & Ho. K., 1982; Walker E. B.,

Lanier L. L., Warner N. L., 1982; Zlotnik A. e.a., 1983). Поэтому нужно учитывать время экспрессии на мембране не только HLA-DR, но и Ii. (Beller D. I. & Ho. K., 1982; Beller D. I., Kiely J. M., Unanue E. R., 1980).

Таким образом, комплекс с антигеном может экспрессироваться на клеточной мембране, удаляться с поверхности клетки с помощью экзоцитоза или интернализироваться с последующим разрушением, либо возвращением на мембрану. При этом показано *in vitro*, что в течение времени количество комплексов на мембране уменьшается (Unanue E. R., 1984; Clayton A. e.a., 2001).

2.5. Регуляция экспрессии и активности HLA-DR

Транскрипционную регуляцию экспрессии генов класса II осуществляют три цис-действующих элемента, расположенных выше сайта инициации транскрипции. Эти три цис-действующих элемента известны как W, X и Y box (W, X, Y regulatory elements), и ядерные транскрипционные факторы связываются с каждым из этих элементов (Herrero C. e.a., 2002).

Транс-активатор главного комплекса гистосовместимости второго класса (class II major histocompatibility complex transactivator, СИТА) необходим для инициации транскрипции. СИТА образует комплекс с транскрипционными факторами элементов W, X и Y box и запускает транскрипцию МНС II. Повышенная или индуцированная экспрессия HLA класса II регулируется через сигнальный путь янус-киназы (Janus kinase, JAK) и транскрипционный фактор STAT, которые активируются IFN- γ . Стимуляция клетки IFN- γ приводит к активации работы СИТА и запуску транскрипции HLA класса II (Gershon H. e.a., 1985). Некоторые вещества, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), а также комбинация TNF- α с INF- γ повышают поверхностную экспрессию HLA-DR на моноцитах и макрофагах (Chantry D. e.a., 1990; Portillo G. e.a., 1989). Другие факторы (одна из форм витамина D, белок pp65 цитомегаловируса), в том числе секретируемые опухолью вещества (о них пойдет речь ниже), способны понижать поверхностную экспрессию HLA-DR. (Rigby W. F., Waugh M., Graziano R. F., 1990; Odeberg J. e.a., 2003).

2.5.1. Влияние опухоли на антигенпрезентирующую функцию макрофагов

Моноциты и макрофаги разделяют на популяции с высокой и низкой экспрессией HLA-DR. Первые имеют провоспалительный фенотип, а вторые проявляют противовоспалительную и проопухолевую активность (Connaughton E. e.a., 2018; Loercher A. e.a., 1999). Известно, что опухоль-ассоциированные макрофаги имеют пониженную экспрессию HLA-DR, что связывают с прямым воздействием опухолевых клеток (Gustafson M. e.a., 2010). Показано, что неизвестные факторы, которая опухоль секретирует в экзосомах или окружающую среду, понижают экспрессию HLA-DR (Popřena I. e.a., 2018; Javeed N. e.a., 2016; Gustafson M. e.a., 2010; Baj-Krzyworzecka M. e.a., 2007).

Также в регуляции синтеза и доставки комплекса при онкологических и других заболеваниях участвует противовоспалительный цитокин IL-10 (Xiu B. e.a., 2015; Fumeaux T. & Pugin J., 2002; Redpath S. e.a., 1999). Хотя точно неизвестно, как происходит регуляция антигенпрезентирующей функции макрофагов в опухолевом микроокружении, предполагают несколько механизмов:

1) Подавление протеазной активности катепсинов S и B с помощью изменения pH эндолизосомных компартментов, в результате чего не формируется стабильный гетеродимер МНС II, не осуществляется эффективного процессинга чужеродного антигена и Ii цепи. Регуляция катепсинов может происходить не напрямую, а через другие модулирующие их факторы. Например через эндогенный ингибитор цистеиновых протеаз цистатин C (endogenous cysteine protease inhibitor cystatin C, Cystatin-C) (Fiebiger E. e.a., 2001; Pierre P. & Mellman I., 1998).

2) Подавление активности транскрипционного фактора СІТА. Опухолевый фактор рецептор-ловушка 3 (Decoy receptor 3, DcR3) подавляет СІТА в опухоль-ассоциированных макрофагах через сигнальные пути N-концевой киназы c-Jun (c-Jun N-terminal kinases, JNK) и регулируемые внеклеточными сигналами киназы (extracellular signal-regulated kinases, ERK) (Chang Y. e.a., 2008). Гипоксия в опухолевом микроокружении подавляет транскрипционный фактор forkhead-бокс O₁-класса (Forkhead box protein O₁, FoxO₁), который в нормоксии индуцирует активацию СІТА (Yang J. e.a., 2018).

2.5.2. Радиотерапия в регуляции антигенпрезентирующей функции макрофагов

Вместе с регуляцией цитокинового профиля и других провоспалительных, противовоспалительных факторов облучение влияет на поверхностную экспрессию HLA-DR. В случае поляризации макрофагов в провоспалительный фенотип под

воздействием облучения наблюдается повышение антигенпрезентирующей функции, т.е. повышение поверхностной экспрессии HLA-DR (Wang D. e.a., 2016). При поляризации макрофагов в противовоспалительный фенотип после облучения регистрируют снижение поверхностной экспрессии HLA-DR (См. Таблицу 2).

Таблица 2. Влияние радиотерапии на HLA-DR и цитокиновый профиль моноцитов и макрофагов

Радиотерапия, доза и время после облучения	HLA-DR и цитокиновый профиль	Модель	Ссылка
γ-излучение/2Гр/24ч	Провоспалительный фенотип: ↑ HLA-DR ↑ IL-12, IL-23	ОАМ (пациенты)	(Stary V. e.a., 2020)
γ-излучение/10Гр/20ч	Провоспалительный фенотип: ↑HLA-DR, CD80, CD86 ↓IL-10, IL-6, CCL2, CD163, MRC1	Макрофаги, дифференцированные из моноцитов и активированные ЛПС/IFN-γ	(Pinto T. A. e.a., 2016)
γ-излучение/12Гр/6 месяцев	Противовоспалительный фенотип: ↓ HLA-DR ↑Arg-1,CD206, PD-L1, CSFR1	ОАМ (мыши)	(Seifert L. e.a., 2016)
Рентгеновское излучение/2-20Гр/48ч	Провоспалительный фенотип: ↑ HLA-DR ↑ TNF-α, IFN-γ	U937	(Parker J. e.a., 2013)

Ниже суммированы возможные механизмы, с помощью которых ионизирующее излучение влияет на уровень HLA-DR:

- 1) Поврежденные облучением опухолевые клетки секретируют HMGB1, который распознаются через TLR4 антигенпрезентирующими клетками, и активирует деградацию опухолевого антигена через слияние лизосомы с фагосомой (антиген не попадает в МНС II компартмент и не презентуется клеткой на поверхностной мембране) (Apetoh L. e.a., 2007; Stary V. e.a., 2020).
- 2) Облучение может повышать секрецию активатора синтеза HLA-DR INF- α опухолевыми и другими клетками (Gallegos C. e.a., 2016).
- 3) Излучение повреждает ДНК. К месту повреждения рекрутируется ATM, которая активирует путь NF-kB. NF-kB индуцирует транскрипцию рецептора МНС II (Parker J. e.a., 2012).

2.5.3. MTORC1 в регуляции антигенпрезентирующей функции макрофагов

Кроме регуляции продукции и активности провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, MTORC1 влияет на антигенпрезентирующую функцию клеток (См. Рисунок 5).

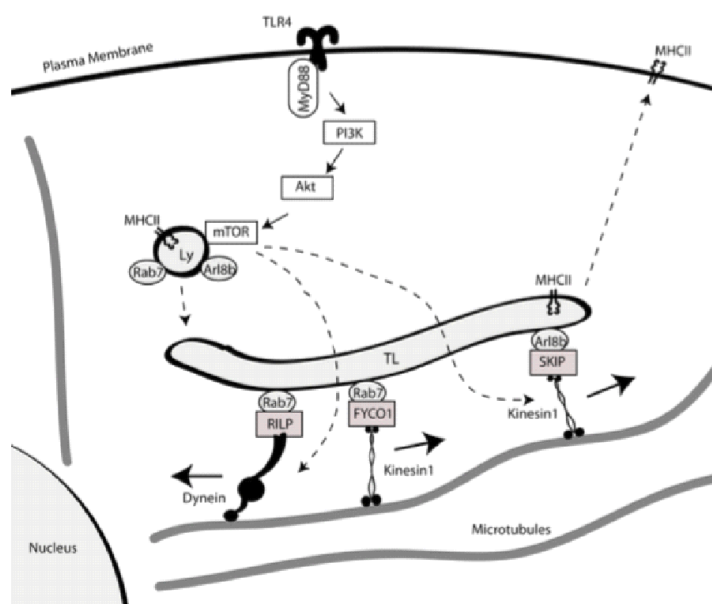


Рис.5. Регуляция транспорта МНСII компартмента с помощью MTORC1 (Saric A., 2016)

ЛПС связывается с толл-подобным рецептором 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) через ген первичного ответа миелоидной дифференцировки 88 (Myeloid differentiation primary

response gene 88, MyD88) и запускает сигнальный путь PI3K/Akt/mTORC1. mTORC1 активирует работу малых ГТФаз – Ras-родственный белок Rab-7a (Ras-related protein Rab-7a, Rab7) и ADP-рибозилирующий фактор-подобный белок 8B (ADP-ribosylation factor-like protein 8B, Arl8b), которые регулируют моторную работу микротрубочек. Rab7 привлекают в МНСII-содержащий компартмент Rab-взаимодействующий лизосомный белок (Rab-interacting lysosomal protein, RILP), адаптер FYVE и домена аутофагии coiled-coil 1 (FYVE And Coiled-Coil Domain Autophagy Adaptor 1, FYCO1), которые связываются с динеином и кинезином. Arl8b рекрутирует белок, взаимодействующий со сфингозинкиназой (sphingosine kinase 1-interacting protein, SKIP), который взаимодействует с кинезином. В совокупности, RILP, FYCO1 и SKIP регулируют динеин и кинезин-зависимый транспорт лизосом/МНСII компартмента. При стимуляции mTORC1 происходит доставка комплекса МНСII с антигеном на мембрану клетки (Saric A., 2016).

3. Материалы и методы исследования

3.1. Материалы

3.1.1. Реактивы и материалы для ведения клеточных культур

Для культивирования первичных и иммортализованных клеточных линий использовали одноразовые, стерильные пластиковые культуральные чашки и планшеты (Eppendorf, Германия). Для культивирования клеток ТНР-1 использовали среду RPMI-1640 (Биолот, Россия) с добавлением 5% инактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS) (GE Healthcare Life Sciences, США), 100 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия). Клетки линии НСТ116 культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 5% инактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS) (GE Healthcare Life Sciences, США), 100 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия). Клетки культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂.

3.1.2. Клеточные линии, использованные в работе

Исследования проводили с использованием клеток линии острого моноцитарного лейкоза ТНР-1 (American Type Culture Collection (ATCC)). Клетки линии ТНР-1 представляют собой суспензионную культуру, требующую пересева 1 раз в 2-3 дня. Клетки воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики

моноцитов, а именно способность к про- и противовоспалительной активации, продукции цитокинов, антигенпрезентирующей активности.

В ходе исследования также использовали линию клеток колоректальной карциномы человека HCT116 (American Type Culture Collection (ATCC)). Клетки линии HCT116 – адгезионная культура, требующая пересева 1 раз в 3 дня. Дезинтеграцию монослоя клеток для пересева осуществляли раствором версена (Биолот, Россия) с раствором трипсина (Биолот, Россия), смешанных в соотношении 1:1.

В экспериментах использованы клетки в логарифмической фазе роста не выше 20 пассажа. Количество клеток определяли с помощью камеры Горяева и автоматического счетчика клеток. Для камеры использовали формулу: $N * 2,5 * 10^3$, где N – число клеток в пяти квадратах камеры, расположенных по диагонали/объем в мл.

3.1.3. Приготовление кондиционированной среды

Кондиционированная среда (КС) была необходима для проведения МТТ-теста, полимеразной цепной реакции и микроскопии. Кондиционированную среду от клеток линии HCT116 использовали для моделирования опухолевого микроокружения. Для этого клетки линии HCT116 культивировали в среде DMEM с добавлением 5% FBS и 100 мкг/мл гентамицина в течение трех дней. Затем собирали кондиционированную бесклеточную среду, смешивали со средой RPMI-1640 в соотношении 1:1 и добавляли к ТНР-1. Для проведения МТТ-теста ТНР-1, культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 5% FBS и 100 мкг/мл гентамицина в течение трех дней. Затем собирали кондиционированную бесклеточную среду, смешивали со средой DMEM в соотношении 1:1 и добавляли к HCT116.

3.2. Методы

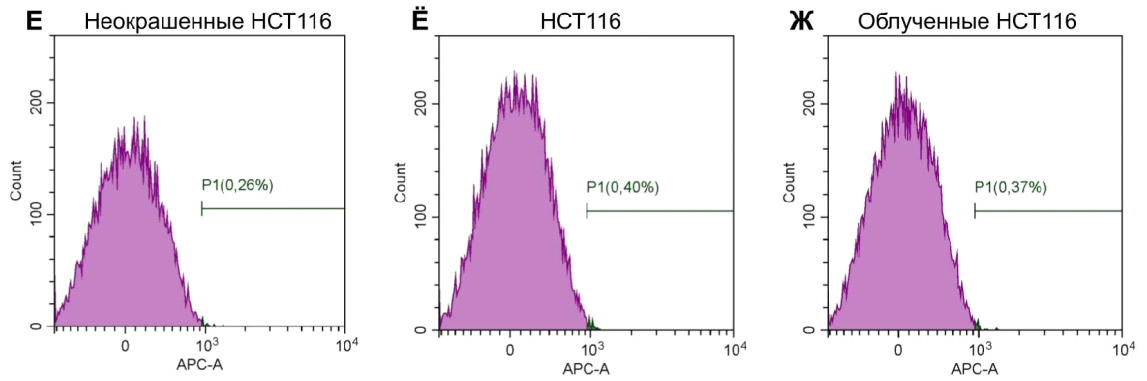
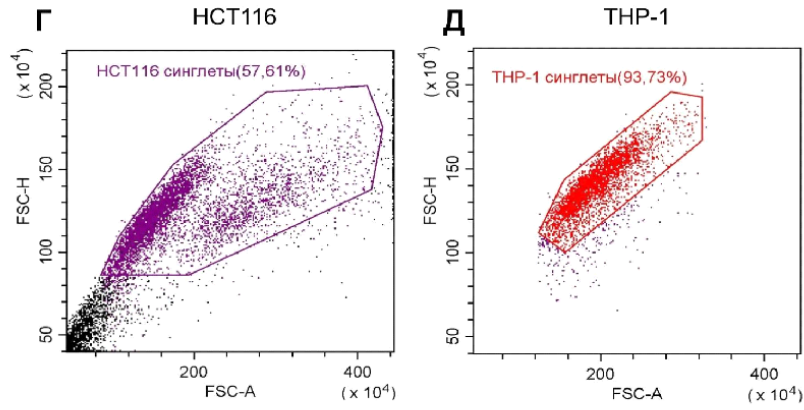
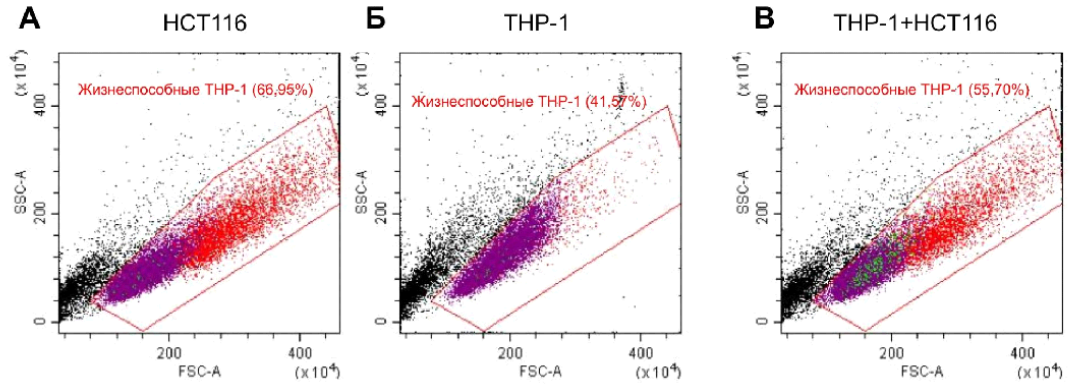
3.2.1. Облучение клеток

Для облучения клеток гамма-фотонами использовали радиотерапевтический аппарат РУМ-17, предоставленный для работы Военно-Медицинской Академией имени С.М. Кирова. В экспериментах использовали дозу 4 Гр при облучении ТНР-1 и HCT-116 клеточных линий. Использовались следующие параметры облучения: напряжение на трубке 180 kV, ток 10 mA, фокусное расстояние – 50 см, фильтр – 1 мм Al; 0.5 мм Cu, мощность

дозы – 0,32 Гр/мин. Для валидации значений использовался дозиметрический контроль – дозиметр ИД-11, показания доз с прибора ГО-32.

3.2.2. Проточная цитофлуориметрия

Пробоподготовку и анализ проводили через 24 часа после воздействия облучения и через 72 часа после добавления рапамицина. В экспериментах по изучению опухоль-ассоциированных макрофагов ТНР-1 инкубировали с НСТ116 в течение 30 минут перед окрашиванием. Для анализа экспрессии рецептора HLA-DR на клеточной поверхности контрольных (необлученных, либо без воздействия рапамицина) и опытных (облученных, либо под воздействием рапамицина) ТНР-1 промывали в 1xPBS (фосфатно-солевой буфер). Окрашивание антителами против HLA-DR-APC человека (BioLegend, США) проводили в темноте при 4 ° С в течение 20 мин. После дополнительных стадий промывки ТНР-1 анализировали на проточном цитометре CytoFLEX B2-R2-V0 (США) с использованием программного обеспечения CytExpert. Жизнеспособную популяцию ТНР-1 и НСТ116 находили и гейтировали на гистограмме по площади сигнала прямого светорассеяния FSC-A (forward scatter area) и площади сигнала бокового светорассеяния SSC-A (side scatter area). Отделяли синглеты на гистограмме высота сигнала прямого светорассеяния FSC-H (forward scatter height) против FSC-A. Проводили анализ поверхностной экспрессии HLA-DR на гистограммах количества клеток (Count) против площади сигнала флуоресценции APC-A. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) рассчитывали из 3 независимых экспериментов. Ниже на Рис.6 приведены гистограммы.



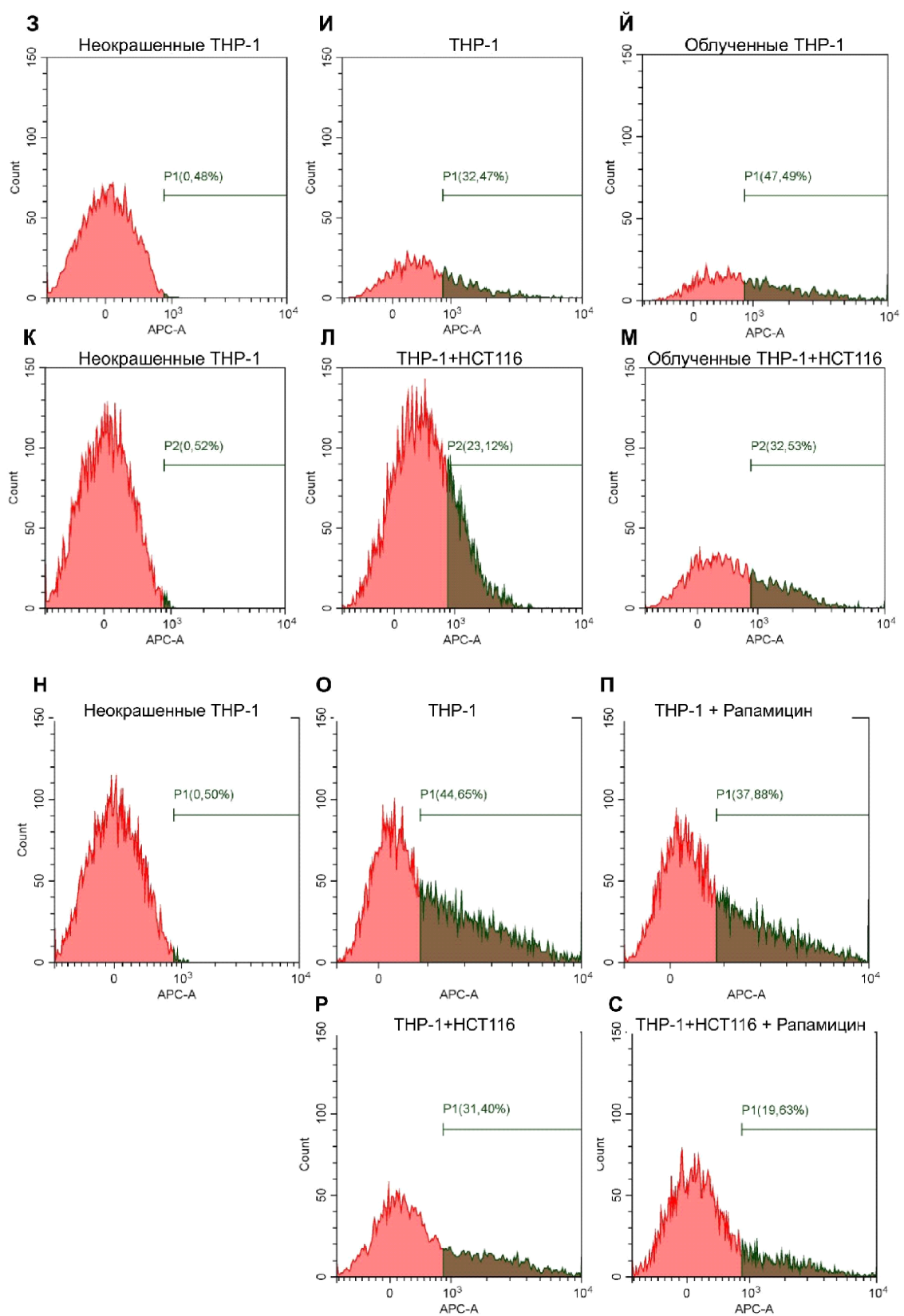


Рис.6. Гистограммы. Представлены гистограммы по FSC-A/SSC-A и FSC-H/FSC-A для НСТ116 (А, Г), ТНР-1 (Б, Д), а также FSC-A/SSC-A для сокультивированных ТНР-1 и

НСТ116 (ТНР-1+НСТ116) (В). Показаны гистограммы Count/APC-A для неокрашенных, окрашенных и облученных НСТ116 (Е-Ж). Приведены гистограммы Count/APC-A неокрашенных ТНР-1, облученных ТНР-1, облученных сокультивированных ТНР-1 и НСТ116 (З-М). Показаны гистограммы Count/APC-A неокрашенных ТНР-1, ТНР-1 под воздействием рапамицина, коинкубированных ТНР-1 и НСТ116 под воздействием рапамицина (Н-С).

3.2.3. Микроскопия

Визуализацию клеток ТНР-1 проводили с помощью системы визуализации оптического микроскопа LOMO BIOLAM M-1. Репрезентативные изображения клеток ТНР-1 были сделаны в контрольных условиях, через 24 часа после облучения или через 72 часа после инкубации ТНР-1 в кондиционированной среде, собранной от НСТ116.

3.2.4. Выделение РНК

Выделение РНК проводили через 24 часа после воздействия облучения и через 72 часа после добавления рапамицина. Из лунок отбирали клетки со средой в эппендорфы. Центрифугировали, отбирали надосадочную жидкость и добавляли к клеточному осадку реагент ExtractRNA (Евроген, Россия) для экстракции тотальной РНК (0,8 мл) (Евроген, Россия). Ресуспензировали в течение 3-4 минут и добавляли 160 мкл хлороформа (Экос-1, Россия) для разделения фаз. Центрифугировали и для осаждения РНК к водной фазе добавляли 0,5 мл изопропилового спирта (Экос-1, Россия). Инкубировали на -20 в течение 12-24 часов, затем промывали осадок РНК в 75% 0,5 мл растворе охлажденного этанола. Спирт удаляли и осадок сушили в течение нескольких минут. Затем осадок растворяли в 20 мкл стерильной безнуклеазной воды. Количество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра Nanodrop (Thermo scientific, США) в концентрации нг/мкл, также оценивали чистоту образцов – соотношение пиков поглощения 260 нм/280 нм – соответствуют примесям белков и аминокислот; 260 нм/230 нм – примеси солей и фенола.

3.2.5. Обратная транскрипция

Реакция обратной транскрипции необходима для получения из РНК кДНК. К необходимому объему РНК (2 мкг) добавляли к праймерам oligo dT (100 мкМ) (Евроген, Россия) и 9 мкл безнуклеазной воды. Смесь инкубировали 5 минут при 70°. Затем добавляли

к пробам 11 мкл смеси, приготовленного заранее из набора для обратной транскрипции (Табл. 3) (Евроген, Россия). Для проведения обратной транскрипции пробы ставили в термостат программируемый для проведения ПЦР анализа четырехканальный «Терцик» (Россия) с температурным профилем и циклом: 25°-10 мин, 42°- 50 мин, 70°- 10 мин, 10°-10 сек. После амплификации кДНК хранили на -20°.

Таблица 3. Состав смеси для реакции обратной транскрипции

Реагент:	на 1 пробу
olidodT	1 мкл
Буфер 5x	4 мкл
dNTP 5 mM	1,5 мкл
DTT 20 mM	2 мкл
Обратная транскриптаза MMLV	2 мкл
Вода	2,5 мкл

3.2.6. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для количественного анализа изменения уровня экспрессии исследуемых генов использовали коммерческие системы ПЦР в реальном времени SYBR Green (Табл. 4 и 5) (Евроген, Россия). Реакцию проводили в 96-луночных оптических платах (SSIBio, Pirouet). Режим работы амплификатора CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories): 95°-5 мин, затем 35 циклов, включающих денатурацию 95°-10 сек и отжиг праймеров при 62°-10 сек и амплификацию 72°-20 сек. Температура отжига всех праймеров составляла около 60°. Праймеры для ПЦР в реальном времени подбирали с использованием Primer-BLAST.

Таблица 4. Состав смеси для проведения ПЦР в реальном времени

Реагент:	на 1 пробу
5x qPCR mix	5 мкл
F – прямой праймер	1 мкл
R – обратный праймер	1 мкл

Вода	16 мкл
кДНК	2 мкл

Таблица 5. Характеристики праймеров, используемых для постановки ПЦР

Праймеры	Последовательность	t отжига
GAPDH_R	CCATCACCATCTTCCAGGAGCG	60
GAPDH_F	CCATCACCATCTTCCAGGAGCG	60
PPIA_R	TGCAAAACCTCAAAGCCTCCATAA	60
PPIA_F	GCAGAGGCTTAAGGCGCAGACTAC	60
HSP90_F	CCAGGCACTTCGGGACAACCTC	60
HSP90_R	CAAGGGAAAAGCCAGAAGATAGCA	60
RPS18_R	AGTTCTCCCGCCCTCTTGGTGA	60
RPS18_F	ACGCCGCCGCTTGTGCT	60
HPRT_R	ACAGGACTGAACGTCTTGCTC	57.0
HPRT_F	TATATCCAACACTTCGTGGGGTC	56.3
B2M_F	GATGAGTATGCCTGCCGTGT	60
B2M_R	TGCGGCATCTTCAAACCTCC	60
TNF_F	TCAGCCTCTTCTCCTTCCTG	58.43
TNF_R	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	58.58
IL1B_R	TGGAAGGAGCACTTCATCTGTT	59.83
IL1B_F	TCGCCAGTGAAATGATGGCT	60.04
IL6_F	ATGAGGAGACTTGCCTGGTG	59.38
IL6_R	GCATTTGTGGTTGGGTCAGG	59.68
CXCL10_R	GGACAAAATTGGCTTGCAGGA	59.66
CXCL10_F	AAGTGGCATTCAAGGAGTACCT	59.36
CCL2_F	TCTCAAACCTGAAGCTCGCAC	58.5
CCL2_R	CATTGATTGCATCTGGCTGAG	58.5
CD80_F	CGCCTCTCTGAAGATTACCCA	59.24
CD80_R	TGTTCCCTGGGTCTCCAAAGG	59.23
ARG1_F	CACACCAGCTACTGGCACACC	60

ARG1_R	GCAACTGCTGTGTTCACTGTTTCG	60
--------	--------------------------	----

Для анализа данных, полученных в ходе количественной ПЦР в режиме реального времени, в качестве метода представления относительной экспрессии гена использован сравнительный Ct метод (2- $\Delta\Delta$ Ct метод), при котором оценка экспрессии гена интереса производилась относительно экспрессии внутреннего контрольного гена. В ходе анализа для каждой реакции рассчитывали следующие показатели: значение Ct (Δ Ct), значение Δ Ct ($\Delta\Delta$ Ct) для повторностей, показатель $2^{-\Delta\Delta$ Ct, кратность отношения уровней экспрессии в образцах (в сравнении индивидуальных экспериментальных групп со средним значением для внутреннего контрольного образца). Уровень экспрессии исследуемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH. Серии экспериментов повторяли трижды (биологические повторности), для каждого эксперимента проверку уровня экспрессии соответствующего гена повторяли дважды (технические повторности).

3.2.7. МТТ-тест для исследования цитотоксичности

Цитотоксическое действие кондиционированных сред исследовали в МТТ-тесте (по восстановлению желтой соли 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтераразола в темно-синий кристаллический формазан). Клетки высевали в лунки 96-луночного планшета (Eppendorf, США) (2000 клеток в 200 мкл культуральной среды), инкубировали 72 часа при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере. ТНР-1 инкубировали в кондиционированной среде, собранной от НСТ116, с добавлением свежей среды RPMI в соотношении 1:1. НСТ116 инкубировали в кондиционированной среде, собранной от ТНР-1, с добавлением свежей среды DMEM в соотношении 1:1. Контролем выступали клетки, которые культивировались в полностью свежей среде. Через соответствующее время после инкубации (72 часа) отбирали по 20 мкл среды и вносили 20 мкл 10-кратного раствора МТТ (ПанЭко, Россия), и оставляли на 1,5 часа в клеточном инкубаторе. После окончания инкубации культуральную среду отбирали, клетки ресуспендировали в 200 мкл ДМСО (Экос-1, Россия) и измеряли оптическую плотность раствора на планшетном спектрофотометре Infinite F50 (Tecan, США) при длине волны 570 нм. Процент выживших после инкубации в кондиционированной среде клеток подсчитывали как частное от деления средней оптической плотности в лунках после инкубации с кондиционированной средой к средней

оптической плотности контрольных лунок (100% выживаемости). Или $N_{ж} = E_{опыта} / E_{контроля} * 100\%$, где $N_{ж}$ – количество жизнеспособных клеток, E – оптическая плотность. Всего было проведено 3 независимых эксперимента, в каждом из которых было по 6 технических повторностей контрольных проб и экспериментальных.

3.2.8 Статистический анализ

Достоверность различий между группами оценивали при помощи двухвыборочного непарного t-теста. Статистически значимыми считали различия между группами при $P < 0,05$. На графиках достоверные различия отмечены звездочками: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Данные в результатах представлены в виде среднего по всем проведенным экспериментам, с указанием стандартных отклонений. Программа GraphPad Prism 8.0 использовалась для построения графиков и проведения статистического анализа.

4. Результаты и обсуждение

4.1. Изучение влияния линии клеток моноцитов ТНР-1 и колоректальной карциномы НСТ116 на жизнеспособность друг друга с помощью МТТ-теста

В данной работе модель опухоль-ассоциированных макрофагов была получена на основе клеточной линии ТНР-1, инкубированной в присутствии кондиционированной среды, полученной от опухолевых клеток НСТ116. Для валидации нашей модели был проведен МТТ-тест с целью проанализировать влияние клеточных линий НСТ116 и ТНР-1 на жизнеспособность друг друга.

Результаты представлены на Рис.7. Было показано снижение жизнеспособности НСТ116 после инкубации в кондиционированной среде, собранной от ТНР-1 (Рис. А). Получены статистически значимые различия между группами ($p < 0.01$). Разница в выживаемости составила $-34,97 \pm 6,448$. Жизнеспособность ТНР-1 не изменилась после инкубации в кондиционированной среде, собранной от НСТ116 ($p > 0.05$) (Рис. Б).

Полученные данные соответствуют поведению моноцитов в модели опухолевого микроокружения. В работе Sawa-Wejksza K. с соавторами показали, что инкубация ТНР-1 в кондиционированной среде, полученной от нескольких клеточных линий колоректального рака, подавляет пролиферацию моноцитов, блокируя прохождение клеточного цикла на стадии G1 (Sawa-Wejksza K. e.a., 2018). В других исследованиях не наблюдали влияние

кондиционированной среды опухолевых клеток HT-29, HCT-15 и Colo205 на жизнеспособность моноцитов (Wu T. e.a., 2014). Однако согласно полученным данным в дальнейшем при проведении экспериментов по изучению влияния ТНР-1 на жизнеспособность опухолевых линий колоректального рака необходимо учитывать, что данная клеточная линия моноцитов подавляет жизнеспособность HCT116.

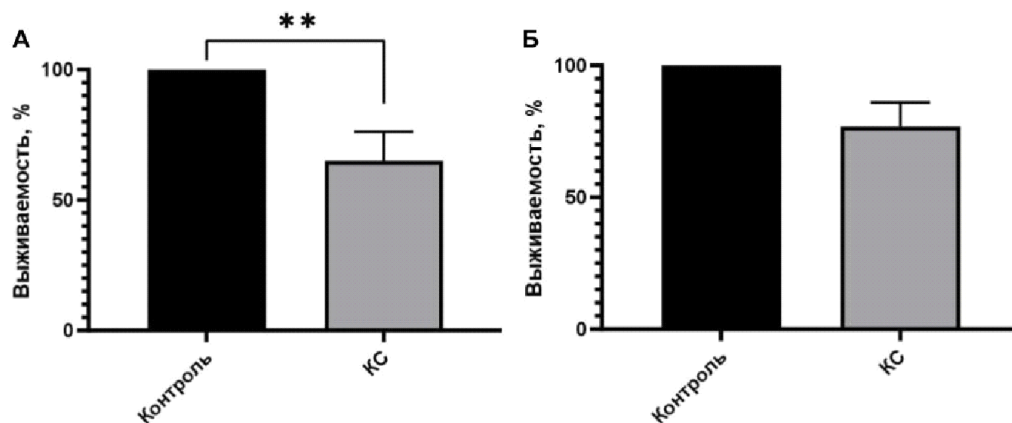


Рис.7. Диаграмма выживаемости клеток HCT116 (А) и ТНР-1 (Б) после 72ч инкубации в свежей (контроль) и кондиционированной среде (КС). Выживаемость и пролиферацию клеток определяли с помощью МТТ-теста. По оси Y на каждом графике представлена выживаемость в %. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Контроль – клетки инкубировали в свежей среде; КС – клетки инкубировали в кондиционированной среде, собранной от ТНР-1 для А. и от HCT116 для Б. Статистическая значимость показана **, $p < 0.01$.

4.2. Описание морфологических характеристик ТНР-1 и опухоль-ассоциированных макрофагов

4.2.1 Сравнение морфологии ТНР-1 и опухоль-ассоциированных макрофагов

Контролем для опухоль-ассоциированных макрофагов выступали ТНР-1, которые культивировались в полностью свежей среде. Опухоль-ассоциированные макрофаги представляли собой ТНР-1, культивируемые в кондиционированной среде, собранной от HCT116. Контрольные клетки и модель опухоль-ассоциированных макрофагов культивировались в течение 72 часов перед проведением микроскопии и оценкой морфологических характеристик. Проводилось три независимых эксперимента.

Представлены репрезентативные изображения ТНР-1 на Рис.8 (А-Б) и опухоль-ассоциированных макрофагов на Рис.9 (А-Б). Наблюдала морфологические изменения моноцитов, культивируемых в кондиционированной среде, по сравнению с контролем. Моноциты имели типичные признаки дифференцировки в макрофаги: увеличение размера, увеличенное количество псевдоподий, увеличению адгезивных свойств и повышение гранулярности (увеличение количества лизосом).

Одним из общепринятых химических агентов, используемых для получения макрофагов из клеточных линий моноцитов, является РМА (12-О-тетрадеканойлфторбол-13-ацетат) (Genard G. e.a., 2018). Применение РМА и использование кондиционированной среды от опухолевых клеток ведет к схожим морфологическим изменениям и приобретению макрофагального фенотипа в данном исследовании и в других моделях (Wu T. e.a., 2014).

Таким образом, кондиционированная среда опухолевых клеток НСТ116 способствовала дифференцировке моноцитов ТНР-1 в макрофаги. Данные результаты подтверждают валидность созданной нами модели опухоль-ассоциированных макрофагов.

4.2.2. Морфология ТНР-1 и опухоль-ассоциированных макрофагов после облучения

ТНР-1 и опухоль-ассоциированные макрофаги культивировались в течение 72 часов перед воздействием однократной дозы 4 Гр гамма-облучения. Контролем для облученных ТНР-1 и опухоль-ассоциированных макрофагов выступали клетки, которые не были облучены. Микроскопия и оценка морфологических характеристик клеток была проведена на следующий день после облучения (через 24 часа). Проводилось три независимых эксперимента.

Представлены репрезентативные изображения ТНР-1 на Рис.8 и опухоль-ассоциированных макрофагов на Рис.9. Изменение морфологических характеристик облученных ТНР-1 и опухоль-ассоциированных макрофагов не была выявлена через 24 часа после облучения. Умеренная доза гамма-излучения не увеличивает морфологические признаки дифференцировки моноцитов в макрофаги и не изменяет морфологию модели ОАМ.

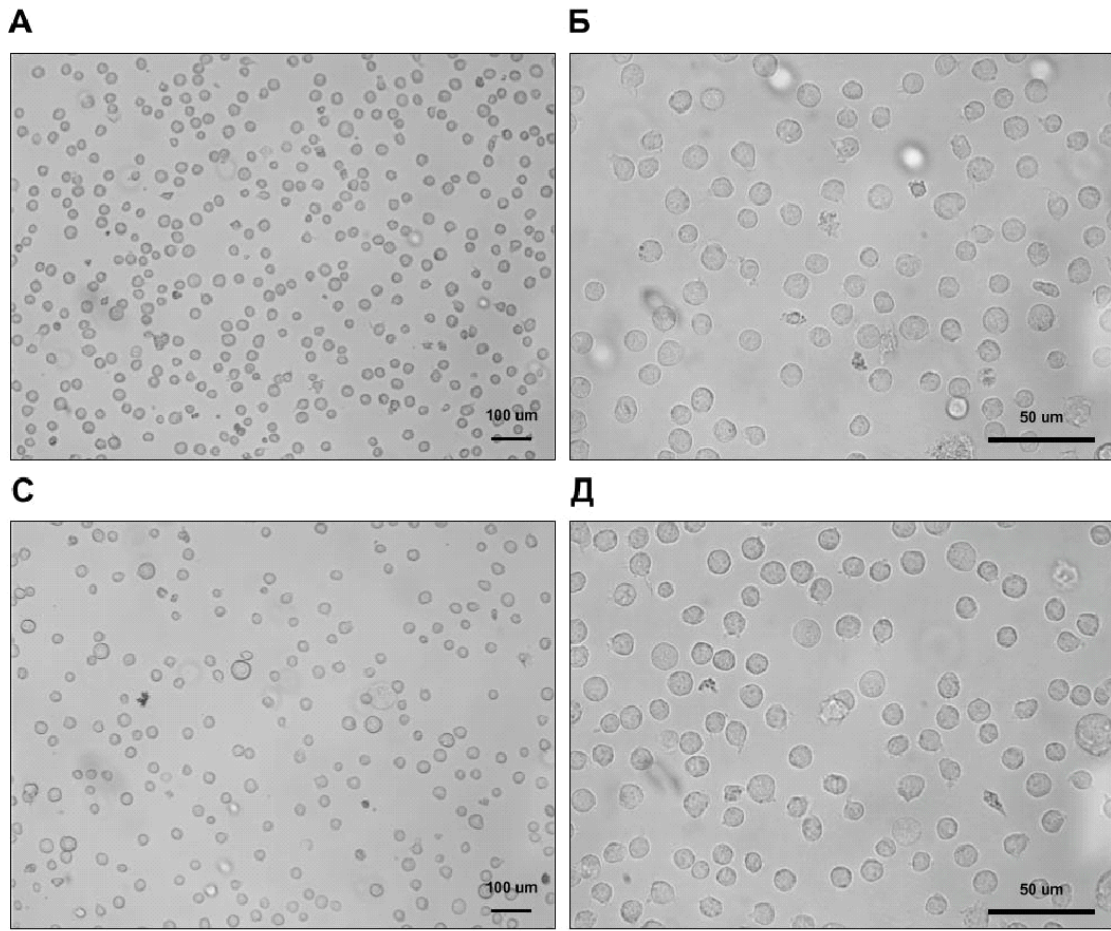


Рис.8. Морфология ТНР-1 необлученных (А-Б) и после облучения (С-Д) через 24 часа.

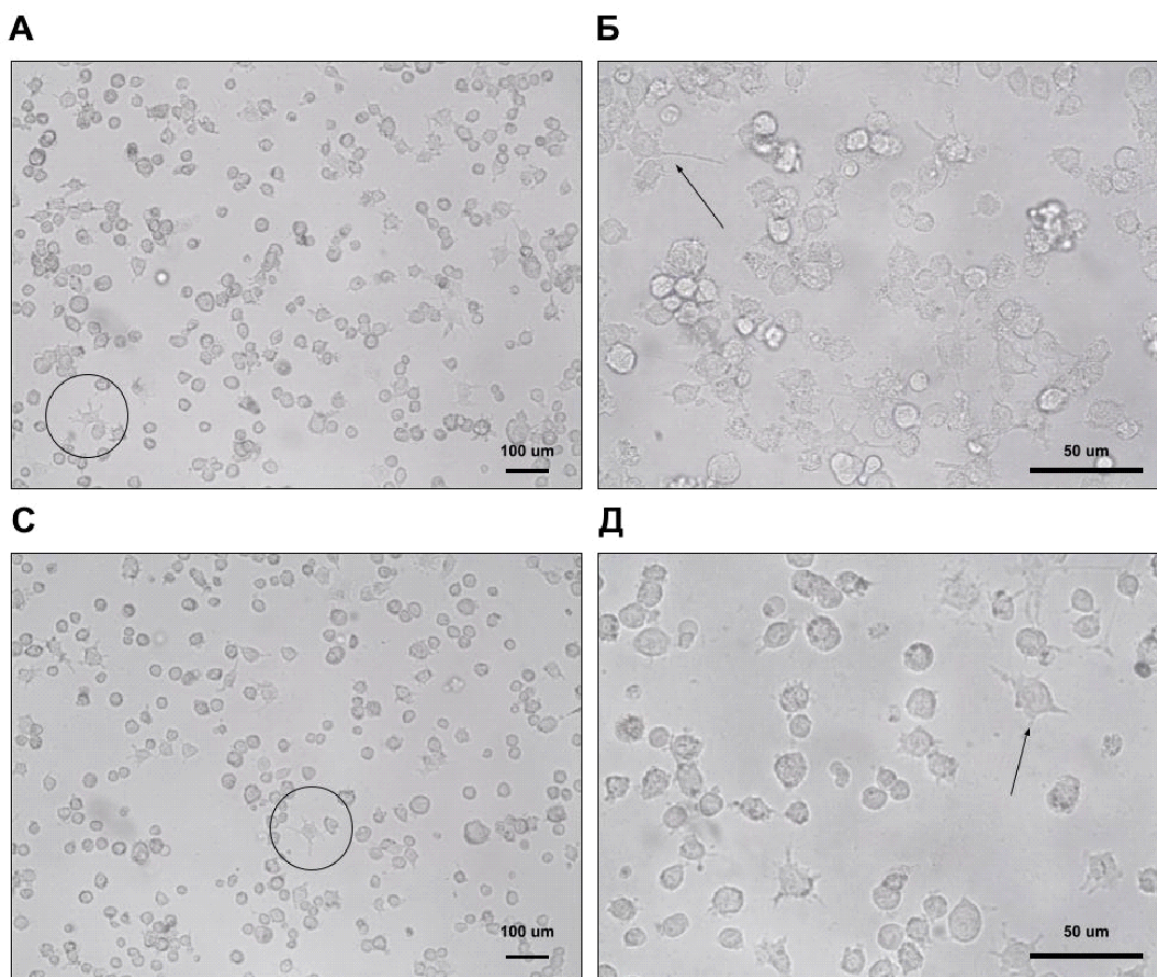


Рис.9. Морфология опухоль-ассоциированных макрофагов необлученных (А-Б) и после облучения (С-Д) через 24 часа. Клетки с макрофаго-подобной морфологией выделены кружками и показаны стрелками.

4.3. Оценка изменений генной экспрессии в ТНР-1 и опухоль-ассоциированных макрофагах методом полимеразной-цепной реакции в реальном времени

4.3.1. Выбор референсного гена для облученных ТНР-1 методом полимеразной-цепной реакции в реальном времени

ТНР-1 культивировались в течение 72 часов перед воздействием одноразовой дозы 4 Гр гамма-излучения. Контролем служили необлученные ТНР-1 моноциты. Процедура по выделению РНК была проведена через 24 часа после облучения.

Была проанализирована генная экспрессия (уровень мРНК) и пороговый цикл широко используемых генов домашнего хозяйства (референсных генов): GAPDH

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), HSP90 (heat shock protein 90), PPIA (peptidylprolyl isomerase A), RPS-18 (ribosomal protein 18S), HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) и B2M (beta-2-microglobulin, beta-chain of MHC class I). В отношении порогового цикла все гены кроме GAPDH и HSP90 показали статистический уровень значимости между контрольными и облученными ТНР-1 ($p < 0,05$). Кроме того, анализ показал, что меньше всего изменилась генная экспрессия гена GAPDH среди остальных референсных генов ($0,7286 \pm 0,1609$). Уровень генной экспрессии и пороговый цикл референсных генов после облучения показан на Рис.10 и Рис.11.

Наиболее стабильным геном домашнего хозяйства для облученных ТНР-1 оказался ген GAPDH. В дальнейших экспериментах по анализу генной экспрессии провоспалительных цитокинов использовался в качестве референсного гена GAPDH.

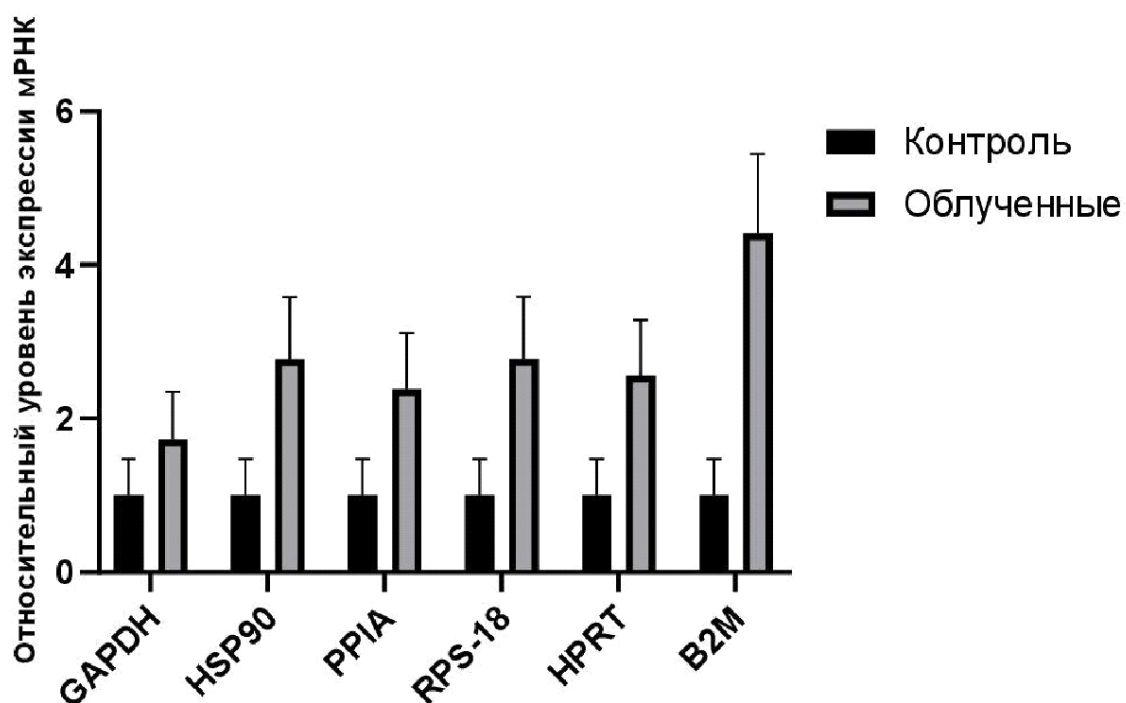


Рис.10. Диаграмма генной экспрессии (уровня мРНК) генов домашнего хозяйства в ТНР-1 через 24 часа после облучения. По оси Y на графике представлен относительный уровень экспрессии гена (уровень мРНК). Относительный уровень экспрессии определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

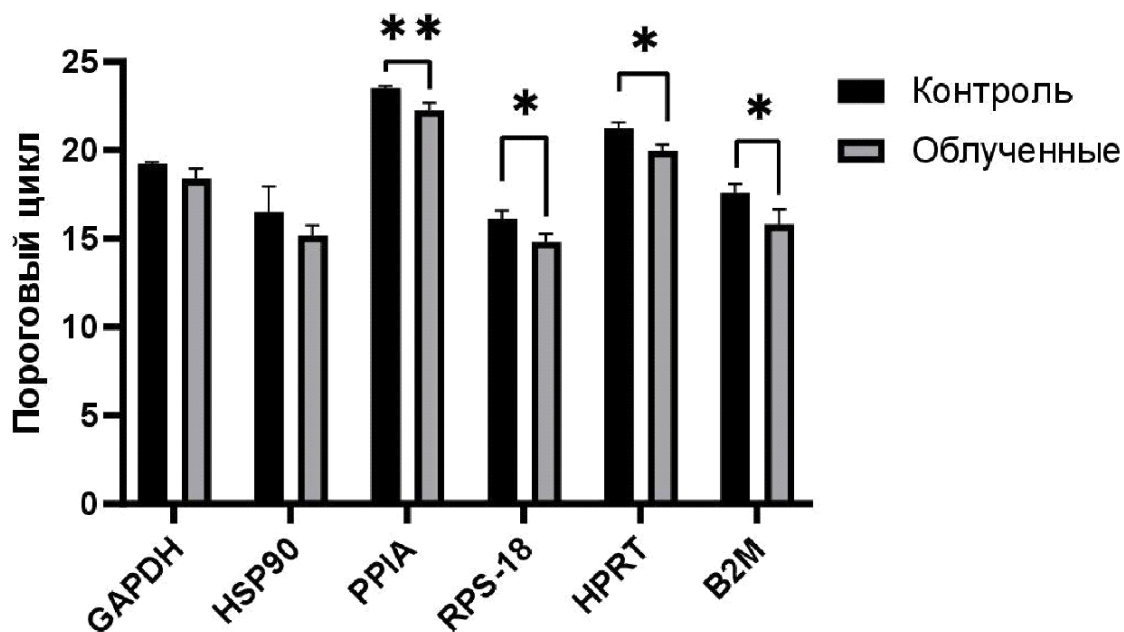


Рис.11. Диаграмма порогового цикла генов домашнего хозяйства в ТНР-1 через 24 часа после облучения. По оси Y на графике представлен пороговый цикл. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Статистическая значимость показана *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

4.3.2. Оценка генной экспрессии провоспалительных факторов в облученных ТНР-1 методом полимеразной-цепной реакции в реальном времени

ТНР-1 культивировались в течение 72 часов перед воздействием одноразовой дозы 4 Гр гамма-излучения. Контролем для облученных ТНР-1 были моноциты, которые не были облучены. Процедура по выделению РНК была проведена через 24 часа после облучения.

Была проанализирована генная экспрессия (уровень мРНК) основных провоспалительных факторов под влиянием гамма-облучения (Рис.12). Не обнаружено статистически значимых различий в изменении IL6 между группами ($p > 0.05$). Однако анализ показал, что облучение повысило генную экспрессию IL1B ($4,030 \pm 1,092$), CD80 ($2,257 \pm 0,5290$), CCL2 ($10,40 \pm 2,797$) и CXCL10 ($29,41 \pm 8,853$). Получены статистически значимые различия между группами ($p < 0.05$). Таким образом, гамма-облучение повышает провоспалительные маркеры в моноцитах.

На данный момент существуют противоречивые данные о влиянии радиотерапии на фенотип моноцитов и макрофагов. Pinto T. A. e.a., 2016 не показали изменений в экспрессии

типичных маркеров M1 макрофагов (TNF- α , IL-6, IL-1 β и CCR7) после облучения, хотя наблюдалось повышение HLA-DR на поверхности клетки. Другие исследования показывают, что облучение повышает IL-6, TNF- α и IFN- γ в макрофагах через активацию ATM/IRF5, TNF- α через активацию NF- κ B (Wu. Q. e.a., 2017; Parker J. e.a., 2013). По-видимому, поляризация моноцитов в провоспалительный фенотип происходит через повреждение ДНК, распознавание DAMPs и дальнейшую активацию транскрипционных факторов, отвечающих за воспаление.

На данном этапе нами было показано, что умеренная доза гамма-облучения индуцирует провоспалительный фенотип моноцитов, повышая типичные маркеры воспалительных M1 макрофагов. В ряде случаев показано, что облученные моноциты и макрофаги представляют собой нечеткий фенотип. После облучения могут повышаться одновременно некоторые провоспалительные и противовоспалительные цитокины, факторы, свойственные тому или иному фенотипу (Pinto T. A. e.a., 2016). В связи с этим в дальнейшем планируется оценка генной экспрессии противовоспалительных цитокинов, свойственных именно супрессорным M2 макрофагам: IL10, ARG1 и TGFB.

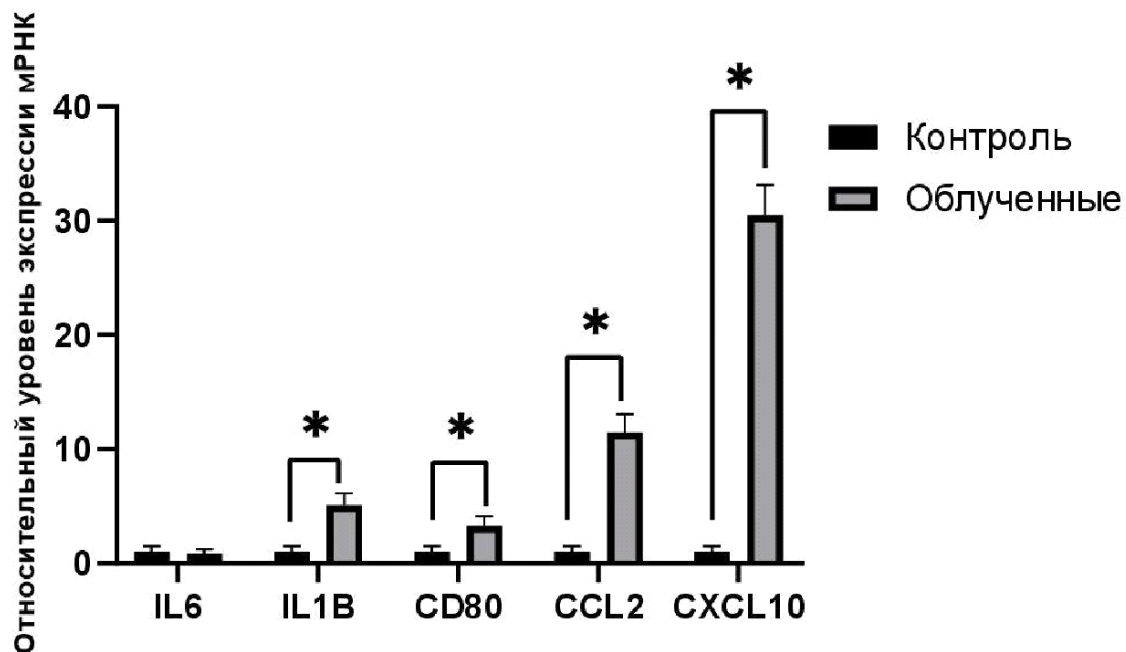


Рис.12. Диаграмма генной экспрессии (уровня мРНК) провоспалительных факторов в THP-1 через 24 часа после облучения. По оси Y на графике представлен относительный уровень экспрессии гена (уровень мРНК). Относительный уровень экспрессии определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Результаты представлены как среднее значение \pm

стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Статистическая значимость показана *, $p < 0.05$.

4.3.3. Оценка генной экспрессии ARG1, IL1B и TNFA в ТНР-1 и опухоль-ассоциированных макрофагах после воздействия рапамицина методом полимеразной-цепной реакции в реальном времени

После посева через 24 часа к ТНР-1 и опухоль-ассоциированным макрофагам (ОАМ) добавляли рапамицин в концентрации 100 нМ. Контролем были ТНР-1 и ОАМ без добавления рапамицина. После добавления лекарства клетки культивировались в течение 72 часов до проведения процедуры по выделению РНК.

Была проанализирована генная экспрессия (уровень мРНК) провоспалительных факторов TNFA и IL1B, и противовоспалительного фактора ARG1 под воздействием рапамицина (Рис.13). Анализ показал, что рапамицин понизил генную экспрессию IL1B в ТНР-1 ($-0,8967 \pm 0,008819$, при $p < 0.001$), но не оказал эффекта на IL1B в опухоль-ассоциированных макрофагах ($p > 0,05$). Рапамицин также не повлиял на генную экспрессию TNFA и ARG1 в ТНР-1 и опухоль-ассоциированных макрофагах ($p > 0,05$). Таким образом, mTORC1 регулирует генную экспрессию IL1B, и подавление рецептора приводит к снижению провоспалительного цитокина на уровне мРНК в ТНР-1. Однако в опухолевых макрофагах значительного эффекта от рапамицина не наблюдалось.

Показано, что при подавлении пути mTOR может происходить как повышение экспрессии IL1B, так и понижение. В первом случае вместе с этим происходит активация маркеров, свойственных провоспалительным макрофагам, и подавление противовоспалительных факторов (Mecalli A. e.a., 2013). В случае понижения IL1B происходит наоборот (Li D. e.a., 2016). Экспрессия IL1B скорее всего регулируется через PI3K-Akt-mTOR путь. При подавлении mTORC1 может происходить снижение p70S6K, который в норме ингибирует Akt через PI3K. Тогда активированная Akt снижает экспрессию провоспалительных факторов. Также mTORC1 активирует NF-κB-p65 и p38, необходимые для стимуляции провоспалительных цитокинов. При подавлении mTORC1 может наблюдаться снижение воспалительного ответа. При этом подавление mTORC1 может приводить к запуску аутофагии и удалению непротрансформированной формы IL1B. (См. Литературный обзор 2.3.)

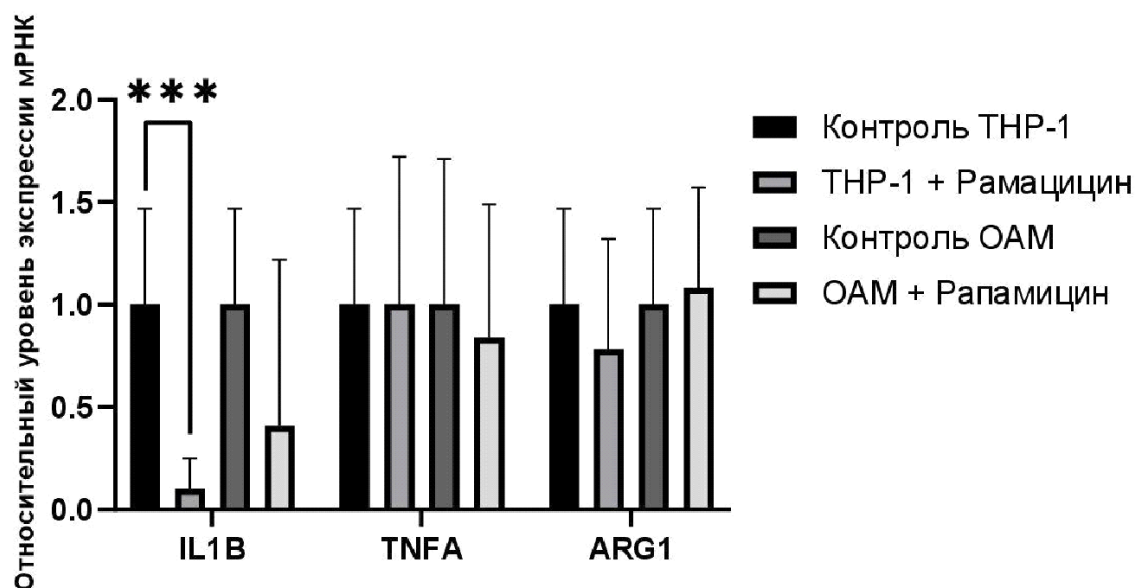


Рис.13. Диаграмма генной экспрессии (уровня мРНК) ARG1, IL1B и TNFA в THP-1 через 72 часа после воздействия рапамицина. По оси Y на графике представлен относительный уровень экспрессии гена (уровень мРНК). OAM – опухоль-ассоциированные макрофаги. Относительный уровень экспрессии определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Статистическая значимость показана ***, $p < 0.001$.

4.4. Оценка экспрессии HLA-DR на клеточной мембране THP-1 и опухоль-ассоциированных макрофагах с помощью проточной цитофлуориметрии

4.4.1. Оценка поверхностной экспрессии HLA-DR на THP-1 и опухоль-ассоциированных макрофагах с помощью проточной цитофлуориметрии

THP-1 и НСТ116 культивировали отдельно за 72 часа до проведения эксперимента. Во время эксперимента клеточные линии THP-1 и НСТ116 объединяли, и культивировали вместе в течение 30 минут. Культивируемые с НСТ116 моноциты являлись моделью опухоль-ассоциированных макрофагов. Контролем выступали отдельно культивируемые клетки THP-1.

Результаты представлены на Рис.14. Было обнаружено, статистическая разница между THP-1 и THP-1, коинкубированных с НСТ116 в течении 30 минут ($p < 0.01$). THP-1 экспрессировали пониженный уровень HLA-DR через 30 минут после сокультивации с НСТ116 ($-384,5 \pm 50,78$). Клеточная линия НСТ116 снижает уровень рецептора клеточной

мембраны HLA-DR на THP-1, что предполагает подавление антигенпрезентирующей активности моноцитов.

Опухоль-ассоциированные макрофаги обладают иммуносупрессивными функциями, в том числе пониженным уровнем экспрессии HLA-DR, что подтверждает валидность созданной нами модели ОАМ (Gustafson M. e.a., 2010). Эффект на уровень HLA-DR могут оказывать протьюморогенные факторы, которые подавляют активацию СИТА, либо нарушают процессинг комплекса HLA-DR, транспорт и его доставку на клеточную мембрану (Xiu B. e.a., 2015; Порѣна I. e.a., 2018; Yang J. e.a., 2018). Предстоит еще обнаружить секретлируемый колоректальной карциномой фактор, подавляющий количество рецептора на мембране, и выяснить, что происходит с рецептором под влиянием опухоли: интернализация или секреция, опосредованная экзосомами.

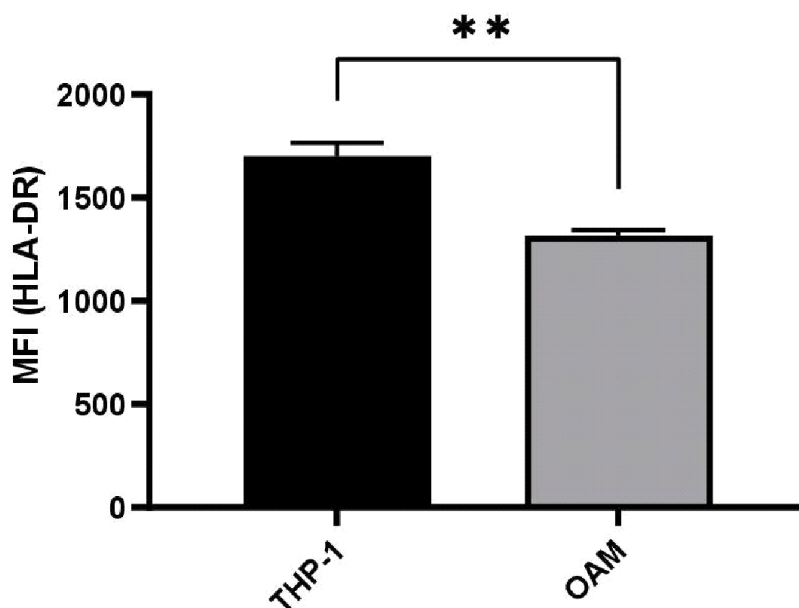


Рис.14. Диаграмма средней интенсивности флуоресценции (MFI) HLA-DR в THP-1 и опухоль-ассоциированных макрофагах. MFI HLA-DR (APC-A) определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. По оси Y на графике представлена MFI HLA-DR. OAM - опухоль-ассоциированные макрофаги. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Статистическая значимость показана **, $p < 0.01$.

4.4.2. Оценка поверхностной экспрессии HLA-DR на ТНР-1 и опухоль-ассоциированных макрофагах после облучения с помощью проточной цитофлуориметрии

ТНР-1 и НСТ116 культивировали отдельно за 72 часа до облучения. ТНР-1 и НСТ116 облучали дозой 4 Гр гамма-облучения. На следующий день клеточные линии необлученных ТНР-1 и НСТ116, облученных ТНР-1 и НСТ116 объединяли, и культивировали вместе в течение 30 минут. Сокультивируемые с НСТ116 моноциты являлись моделью опухоль-ассоциированных макрофагов. Контролем выступали необлученные ТНР-1 и необлученные опухоль-ассоциированные макрофаги.

Результаты представлены на Рис.15. Обнаружена статистическая разница между ТНР-1 и облученными ТНР-1 ($p < 0.01$), а также между моделью ОАМ и облученными ОАМ ($p < 0.05$). Результаты показали, что облученные ТНР-1 ($545,7 \pm 105,8$) и опухоль-ассоциированные макрофаги ($359,5 \pm 41,42$) экспрессируют повышенный уровень HLA-DR на клеточной мембране по сравнению с необлученными клетками. Облучение повышает уровень HLA-DR и отменяет подавляющий эффект опухолевых клеток на экспрессию рецептора.

Описаны различные эффекты влияния радиотерапии на поверхностную экспрессию HLA-DR. В основном показано, что облучение индуцирует уровень мембранной экспрессии HLA-DR, что согласуется с полученными данными (См. Литературный обзор Табл.2). По-видимому, облученные ТНР-1 и опухолевые клетки повреждаются и производят DAMPs, которые повышают воспалительный ответ и стимулируют экспрессию IFN- γ , активирующего СИТА (Apetoh L. e.a., 2007; Gallegos C. e.a., 2016).

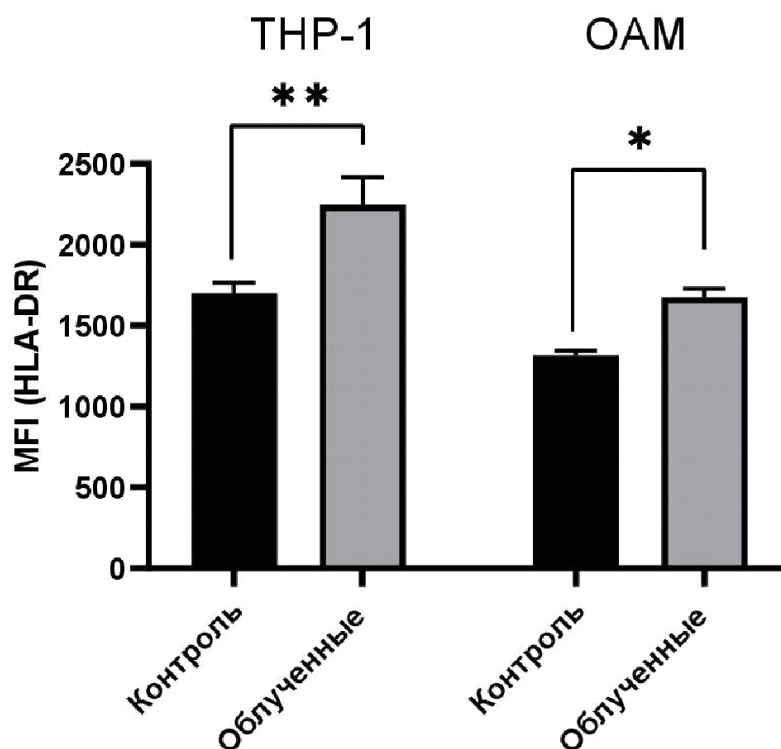


Рис.15. Диаграмма средней интенсивности флуоресценции (MFI) HLA-DR в THP-1 и опухоль-ассоциированных макрофагах через 24 часа после облучения. MFI HLA-DR (APC-A) определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. По оси Y на графике представлена MFI HLA-DR. OAM – опухоль-ассоциированные макрофаги. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Статистическая значимость показана *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

4.4.3. Оценка поверхностной экспрессии HLA-DR на THP-1 и опухоль-ассоциированных макрофагах после воздействия рапамицина с помощью проточной цитофлуориметрии

После посева через 24 часа к THP-1 добавляли рапамицин в концентрации 100 нМ. После добавления лекарства клеточные линии THP-1 и НСТ116 культивировались отдельно в течение 72 часов. Затем клеточные линии THP-1, культивируемых с рапамицином и без, и НСТ116 объединяли, культивировали вместе в течение 30 минут. Культивируемые с НСТ116 моноциты являлись моделью опухоль-ассоциированных макрофагов. Контролем выступали THP-1 и опухоль-ассоциированные макрофаги, которые культивировались без добавления рапамицина.

Результаты представлены на Рис.16. Анализ не показал изменений в поверхностной экспрессии HLA-DR на THP-1 и опухоль-ассоциированных макрофагах после подавления mTORC1 ($p>0,05$).

HLA-DR способен связываться с антигенным белком с помощью аутофагии и эндоцитоза. При подавлении mTORC1 происходит активация аутофагии, которая в дальнейшем должна приводить к образованию комплекса HLA-DR с антигеном (Dengjel J. e.a., 2005). Однако подавление mTORC1 в присутствии рапамицина не привело к изменению поверхностной экспрессии HLA-DR. mTORC1 не участвует в регуляции транспорта и презентации комплекса HLA-DR на мембрану с помощью аутофагии. Показано, что mTORC1 участвует в доставке комплекса на мембрану с помощью регуляции кинезин-зависимого транспорта, и аутофагии не играет роли в этом процессе (Saric A., 2016). Однако для активации транспорта HLA-DR на мембрану через mTORC1 необходима стимуляция TLR4. Планируется проведение исследований по изучению влияния mTORC1 на HLA-DR в опухоль-ассоциированных макрофагах после регуляции компонентов пути TLR4/PI3K/Akt/mTORC1.

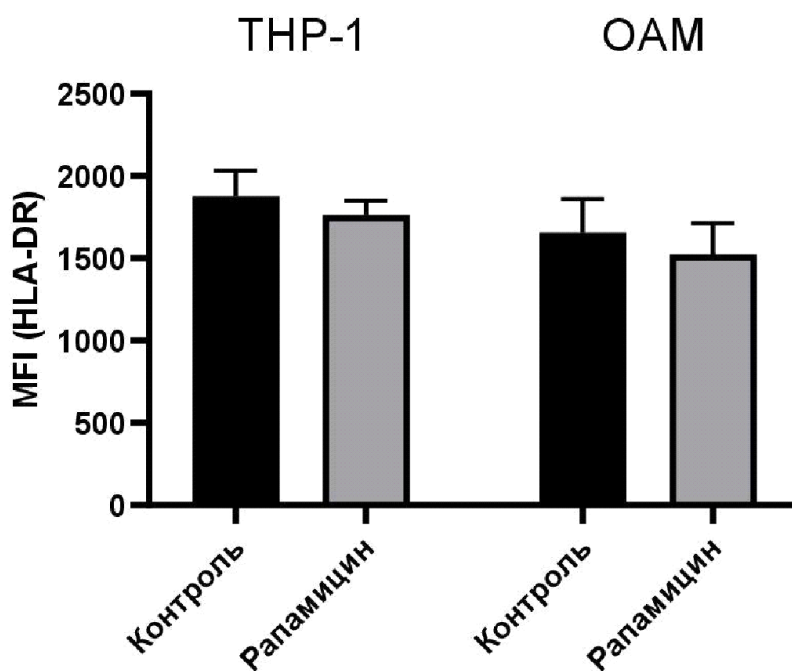


Рис.16. Диаграмма средней интенсивности флуоресценции (MFI) HLA-DR в THP-1 и опухоль-ассоциированных макрофагах через 24 часа после добавления рапамицина. MFI HLA-DR (APC-A) определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. По оси Y на

графике представлена MFI HLA-DR. OAM – опухоль-ассоциированные макрофаги. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

5. Выводы

1. Клеточная линия моноцитов THP-1 может использоваться в качестве модели опухоль-ассоциированных макрофагов. С помощью МТТ-теста на цитотоксичность, микроскопии и проточной цитофлуориметрии было показано, что THP-1 обладают выраженной противоопухолевой активностью. При этом НСТ116 не влияют на жизнеспособность THP-1, дифференцируют THP-1 в макрофаги, изменяя их морфологические характеристики, а также снижают экспрессию маркера антиген-презентации HLA-DR в THP-1;
2. С помощью проточной цитофлуориметрии было выяснено, что умеренная доза гамма-излучения повышает экспрессию HLA-DR в моноцитах THP-1, восстанавливает экспрессию в модели опухоль-ассоциированных макрофагов и может восстанавливать антигенпрезентирующую активность;
3. Результаты ПЦР анализа показали, что для облученных моноцитов THP-1 наиболее стабильным референсным геном является GAPDH, и гамма-излучение индуцирует транскрипцию генов провоспалительных факторов (IL1B, CD80, CCL2 и CXCL10) в THP-1 и может стимулировать противоопухолевую активность;
4. Методом микроскопии показали, что умеренная доза гамма-излучения не влияет на морфологические характеристики моноцитов THP-1 и модели опухоль-ассоциированных макрофагов, связанные с моноцито-макрофагальной дифференцировкой;
5. С помощью проточной цитофлуориметрии было показано, что ингибитор mTORC1 рапамицин не приводит к изменению экспрессии HLA-DR в моноцитах THP-1 и модели опухоль-ассоциированных макрофагов;
6. Результаты ПЦР анализа показали, что рапамицин снижает генную экспрессию IL1B в THP-1 и может индуцировать противовоспалительную активность моноцитов THP-1, способствующую прогрессии опухоли

Таким образом, суммируя полученные в ходе настоящей работы данные, можно предположить, что гамма-излучение более эффективно восстанавливает воспалительную и повышает противоопухолевую активность моноцитов и опухоль-ассоциированных макрофагов, чем рапамицин. Рапамицин способствует противовоспалительной активности моноцитов и, потенциально способен стимулировать развитие опухоли. Полученные данные будут использованы в дальнейших исследованиях по изучению совместного действия облучения и рапамицина на цитокиновый профиль опухоль-ассоциированных макрофагов.

6. Список литературы

1. Ahmed M.A. et al. Fibroblast growth factor receptor 4 induced resistance to radiation therapy in colorectal cancer // *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 2016. Vol. 7, № 43. P. 69976–69990.
2. Apetoh L. et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy // *Immunol. Rev.* John Wiley & Sons, Ltd, 2007. Vol. 220, № 1. P. 47–59.
3. Baj-Krzyworzeka M. et al. Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes // *Immunol. Lett.* 2007. Vol. 113, № 2. P. 76–82.
4. Balermipas P. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes favor the response to chemoradiotherapy of head and neck cancer // *Oncoimmunology*. Taylor & Francis, 2014. Vol. 3, № 1. P. e27403.
5. Beller D.I., Ho K. Regulation of macrophage populations. V. Evaluation of the control of macrophage Ia expression in vitro. // *J. Immunol.* 1982. Vol. 129, № 3. P. 971 LP – 976.
6. Beller D.I., Kiely J.M., Unanue E.R. Regulation of macrophage populations. I. Preferential induction of Ia-rich peritoneal exudates by immunologic stimuli. // *J. Immunol.* 1980. Vol. 124, № 3. P. 1426 LP – 1432.
7. Bertho N. et al. HLA-DR-Mediated Apoptosis Susceptibility Discriminates Differentiation Stages of Dendritic/Monocytic APC // *J. Immunol.* 2000. Vol. 164, № 5. P. 2379 LP – 2385.
8. Byles V. et al. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization // *Nat. Commun.* 2013. Vol. 4. P. 2834.
9. Cassetta L., Pollard J.W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018. Vol. 17, № 12. P. 887–904.
10. Cerni S. et al. Investigating the Role of Everolimus in mTOR Inhibition and Autophagy Promotion as a Potential Host-Directed Therapeutic Target in Mycobacterium tuberculosis Infection // *Journal of Clinical Medicine* . 2019. Vol. 8, № 2.
11. Chang Y.-C. et al. Epigenetic control of MHC class II expression in tumor-associated

- macrophages by decoy receptor 3 // *Blood*. 2008. Vol. 111, № 10. P. 5054–5063.
12. Chantry D. et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces both HLA-DR expression and cytokine production by human monocytes // *Cytokine*. 1990. Vol. 2, № 1. P. 60–67.
 13. Chen H. et al. JAK1/2 pathway inhibition suppresses M2 polarization and overcomes resistance of myeloma to lenalidomide by reducing TRIB1, MUC1, CD44, CXCL12, and CXCR4 expression // *Br. J. Haematol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 188, № 2. P. 283–294.
 14. Chen W. et al. Macrophage-Induced Tumor Angiogenesis Is Regulated by the TSC2–mTOR Pathway // *Cancer Res*. 2012. Vol. 72, № 6. P. 1363 LP – 1372.
 15. Clayton A. et al. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry // *J. Immunol. Methods*. 2001. Vol. 247, № 1. P. 163–174.
 16. Conciatori F. et al. Role of mTOR Signaling in Tumor Microenvironment: An Overview // *International Journal of Molecular Sciences* . 2018. Vol. 19, № 8.
 17. Connaughton E.P. et al. Phenotypic and functional heterogeneity of human intermediate monocytes based on HLA-DR expression // *Immunol. Cell Biol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 96, № 7. P. 742–758.
 18. Connell P.P., Hellman S. Advances in Radiotherapy and Implications for the Next Century: A Historical Perspective // *Cancer Res*. 2009. Vol. 69, № 2. P. 383 LP – 392.
 19. Covarrubias A.J., Aksoylar H.I., Horng T. Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling // *Semin. Immunol.* 2015. Vol. 27, № 4. P. 286–296.
 20. Crittenden M.R. et al. Expression of NF- κ B p50 in Tumor Stroma Limits the Control of Tumors by Radiation Therapy // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 6. P. e39295.
 21. Dengjel J. et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. Vol. 102, № 22. P. 7922 LP – 7927.
 22. Dugast M. et al. AP2 Clathrin Adaptor Complex, but Not AP1, Controls the Access of

- the Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II to Endosomes // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 20. P. 19656–19664.
23. Fiebiger E. et al. Cytokines Regulate Proteolysis in Major Histocompatibility Complex Class II–Dependent Antigen Presentation by Dendritic Cells // *J. Exp. Med.* 2001. Vol. 193, № 8. P. 881–892.
 24. Fridman W.H. et al. The immune contexture in cancer prognosis and treatment // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2017. Vol. 14, № 12. P. 717–734.
 25. Fumeaux T., Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* Department of Internal Medicine, Division of Medical Intensive Care, and Faculty of Medicine, University Hospital of Geneva, Switzerland., 2002. Vol. 166, № 11. P. 1475–1482.
 26. Gallegos C.E. et al. Immunomodulation of classical and non-classical HLA molecules by ionizing radiation // *Cell. Immunol.* 2016. Vol. 303. P. 16–23.
 27. Genard G., Lucas S., Michiels C. Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages with Anticancer Therapies: Radiotherapy versus Chemo- and Immunotherapies. // *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. P. 828.
 28. Genard G. et al. Proton irradiation orchestrates macrophage reprogramming through NFκB signaling // *Cell Death Dis.* 2018. Vol. 9, № 7. P. 728.
 29. Gentles A.J. et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers // *Nat. Med.* 2015. Vol. 21, № 8. P. 938–945.
 30. Gershon H.E. et al. Effects of Recombinant Interferon-γ on HLA-DR Antigen Shedding by Human Peripheral Blood Adherent Mononuclear Cells // *J. Leukoc. Biol.* John Wiley & Sons, Ltd, 1985. Vol. 38, № 2. P. 279–291.
 31. Girolomoni G., Cruz P.D., Bergstresser P.R. Internalization and Acidification of Surface HLA-DR Molecules by Epidermal Langerhans Cells: A Paradigm for Antigen Processing // *J. Invest. Dermatol.* 1990. Vol. 94, № 6. P. 753–760.
 32. Gupta A. et al. Radiotherapy Promotes Tumor-Specific Effector CD8⁺ T Cells via Dendritic Cell Activation // *J. Immunol.* 2012. Vol. 189, № 2. P. 558 LP – 566.

33. Gustafson M.P. et al. Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DR^{lo}/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone // *Neuro. Oncol.* 2010. Vol. 12, № 7. P. 631–644.
34. Han R. et al. RAD001 (everolimus) attenuates experimental autoimmune neuritis by inhibiting the mTOR pathway, elevating Akt activity and polarizing M2 macrophages // *Exp. Neurol.* 2016. Vol. 280. P. 106–114.
35. Harima Y. et al. Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy // *Int J Oncol.* Department of Radiology, Kansai Medical University, Moriguchi City, Osaka 570-8507, Japan null, 2001. Vol. 18, № 3. P. 493–497.
36. Hennecke J., Wiley D.C. Structure of a Complex of the Human α/β T Cell Receptor (TCR) HA1.7, Influenza Hemagglutinin Peptide, and Major Histocompatibility Complex Class II Molecule, HLA-DR4 (DRA*0101 and DRB1*0401): Insight into TCR Cross-Restriction and Alloreactivity // *J. Exp. Med.* 2002. Vol. 195, № 5. P. 571–581.
37. Herrero C. et al. Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression // *Exp. Gerontol.* 2002. Vol. 37, № 2. P. 389–394.
38. Hiltbold E.M., Roche P.A. Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway // *Curr. Opin. Immunol.* 2002. Vol. 14, № 1. P. 30–35.
39. Hwa Ko J. et al. Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NF κ B pathways in autophagy- and p62-dependent manners // *Oncotarget*; Vol 8, No 25. 2017.
40. Inoki K. et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling // *Nat. Cell Biol.* 2002. Vol. 4, № 9. P. 648–657.
41. Javeed N. et al. Immunosuppressive CD14(+)HLA-DR^{lo}/neg monocytes are elevated in pancreatic cancer and “primed” by tumor-derived exosomes // *Oncoimmunology.* Taylor & Francis, 2016. Vol. 6, № 1. P. e1252013–e1252013.
42. Jiang H. et al. Macrophage mTORC1 disruption reduces inflammation and insulin resistance in obese mice // *Diabetologia.* 2014. Vol. 57, № 11. P. 2393–2404.
43. Jiang Y. et al. ROS-Dependent Activation of Autophagy through the PI3K/Akt/mTOR Pathway Is Induced by Hydroxysafflor Yellow A-Sonodynamic Therapy in THP-1

- Macrophages // *Oxid. Med. Cell. Longev.* / ed. Ren J. Hindawi, 2017. Vol. 2017. P. 8519169.
44. Karakikes I. et al. Interaction of HLA-DR and CD74 at the cell surface of antigen-presenting cells by single particle image analysis // *FASEB J.* John Wiley & Sons, Ltd, 2012. Vol. 26, № 12. P. 4886–4896.
 45. Kim L.C., Cook R.S., Chen J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment // *Oncogene.* 2017. Vol. 36, № 16. P. 2191–2201.
 46. Komuro Y. et al. Evaluating the combination of molecular prognostic factors in tumor radiosensitivity in rectal cancer // *Hepatogastroenterology.* Department of Surgical Oncology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan. komuro@kt.rim.or.jp, 2005. Vol. 52, № 63. P. 666–671.
 47. Leblond M.M. et al. M2 macrophages are more resistant than M1 macrophages following radiation therapy in the context of glioblastoma // *Oncotarget.* Impact Journals LLC, 2017. Vol. 8, № 42. P. 72597–72612.
 48. Li D. et al. mTORC1 pathway disruption ameliorates brain inflammation following stroke via a shift in microglia phenotype from M1 type to M2 type // *FASEB J.* John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Vol. 30, № 10. P. 3388–3399.
 49. Lin H.Y.-H. et al. Effects of the mTOR inhibitor Rapamycin on Monocyte-Secreted Chemokines // *BMC Immunol.* 2014. Vol. 15, № 1. P. 37.
 50. Liu S.S. et al. p73 Expression Is Associated with the Cellular Radiosensitivity in Cervical Cancer after Radiotherapy // *Clin. Cancer Res.* 2004. Vol. 10, № 10. P. 3309 LP – 3316.
 51. Loercher A.E. et al. Identification of an IL-10-Producing HLA-DR-Negative Monocyte Subset in the Malignant Ascites of Patients with Ovarian Carcinoma That Inhibits Cytokine Protein Expression and Proliferation of Autologous T Cells // *J. Immunol.* 1999. Vol. 163, № 11. P. 6251 LP – 6260.
 52. Ma J. et al. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time // *BMC Cancer.* 2010. Vol. 10, № 1. P. 112.
 53. Mach B. et al. REGULATION OF MHC CLASS II GENES: Lessons from a Disease // *Annu. Rev. Immunol.* Annual Reviews, 1996. Vol. 14, № 1. P. 301–331.

54. Martinet W., Verheye S., De Meyer G.R.Y. Everolimus-Induced mTOR Inhibition Selectively Depletes Macrophages in Atherosclerotic Plaques by Autophagy // *Autophagy*. Taylor & Francis, 2007. Vol. 3, № 3. P. 241–244.
55. Martinon F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome // *Nature*. 2006. Vol. 440, № 7081. P. 237–241.
56. Mercurio A. et al. Rapamycin unbalances the polarization of human macrophages to M1 // *Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 2013. Vol. 140, № 2. P. 179–190.
57. Mitra R., Singh S., Khar A. Antitumour immune responses // *Expert Rev. Mol. Med.* 2004/02/13. Cambridge University Press, 2003. Vol. 5, № 3. P. 1–22.
58. Mizushima N., Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation // *Nat. Cell Biol.* 2010. Vol. 12, № 9. P. 823–830.
59. MOLDENHAUER et al. Surface-expressed invariant chain (CD74) is required for internalization of human leukocyte antigen-DR molecules to early endosomal compartments // *Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 1999. Vol. 96, № 3. P. 473–484.
60. Mondini M. et al. CCR2-Dependent Recruitment of Tregs and Monocytes Following Radiotherapy Is Associated with TNF α -Mediated Resistance // *Cancer Immunol. Res.* 2019. Vol. 7, № 3. P. 376 LP – 387.
61. Nakamura T. et al. The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation- Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies Analysis Goes to the Next Stage // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, № 18.
62. Odeberg J. et al. Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR α -chain // *Blood*. 2003. Vol. 101, № 12. P. 4870–4877.
63. Parker J.J. et al. Characterization of direct radiation-induced immune function and molecular signaling changes in an antigen presenting cell line // *Clin. Immunol.* 2013. Vol. 148, № 1. P. 44–55.
64. Petrillo M. et al. Polarisation of tumor-associated macrophages toward M2 phenotype correlates with poor response to chemoradiation and reduced survival in patients with locally advanced cervical cancer // *PLoS One*. Public Library of Science, 2015. Vol. 10,

№ 9. P. e0136654.

65. Pierre P., Mellman I. Developmental Regulation of Invariant Chain Proteolysis Controls MHC Class II Trafficking in Mouse Dendritic Cells // *Cell*. 1998. Vol. 93, № 7. P. 1135–1145.
66. Pinto M.L. et al. The Two Faces of Tumor-Associated Macrophages and Their Clinical Significance in Colorectal Cancer // *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 1875.
67. Popėna I. et al. Effect of colorectal cancer-derived extracellular vesicles on the immunophenotype and cytokine secretion profile of monocytes and macrophages // *Cell Commun. Signal. BioMed Central*, 2018. Vol. 16, № 1. P. 17.
68. Portillo G. et al. Effect of cytokines on HLA-DR and IL-1 production by a monocytic tumour, THP-1 // *Immunology*. 1989. Vol. 66, № 2. P. 170–175.
69. Redpath S. et al. Murine Cytomegalovirus Infection Down-Regulates MHC Class II Expression on Macrophages by Induction of IL-10 // *J. Immunol.* 1999. Vol. 162, № 11. P. 6701 LP – 6707.
70. Ribechini E. et al. Novel GM-CSF signals via IFN- γ R/IRF-1 and AKT/mTOR license monocytes for suppressor function // *Blood Adv.* 2017. Vol. 1, № 14. P. 947–960.
71. Rigby W.F., Waugh M., Graziano R.F. Regulation of human monocyte HLA-DR and CD4 antigen expression, and antigen presentation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 // *Blood*. 1990. Vol. 76, № 1. P. 189–197.
72. Roche P.A. et al. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993. Vol. 90, № 18. P. 8581 LP – 8585.
73. Roche P., Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation // *Nat. Rev. Immunol.* 2015. Vol. 15. P. 203–216.
74. Rocher C., Singla D.K. SMAD-PI3K-Akt-mTOR Pathway Mediates BMP-7 Polarization of Monocytes into M2 Macrophages // *PLoS One. Public Library of Science*, 2013. Vol. 8, № 12. P. e84009.
75. Rudolph M.G., Stanfield R.L., Wilson I.A. HOW TCRS BIND MHCS, PEPTIDES, AND CORECEPTORS // *Annu. Rev. Immunol. Annual Reviews*, 2006. Vol. 24, № 1. P.

419–466.

76. Ruffell B., Coussens L.M. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. // *Cancer Cell*. 2015. Vol. 27, № 4. P. 462–472.
77. Saric A. et al. mTOR controls lysosome tubulation and antigen presentation in macrophages and dendritic cells // *Mol. Biol. Cell*. American Society for Cell Biology (mboc), 2015. Vol. 27, № 2. P. 321–333.
78. Sawa-Wejksza K. et al. Colon cancer-derived conditioned medium induces differentiation of THP-1 monocytes into a mixed population of M1/M2 cells // *Tumor Biol*. SAGE Publications Ltd STM, 2018. Vol. 40, № 9. P. 1010428318797880.
79. Schaeffer V. et al. Role of the mTOR Pathway in LPS-Activated Monocytes: Influence of Hypertonic Saline // *J. Surg. Res*. Elsevier, 2011. Vol. 171, № 2. P. 769–776.
80. Schildkopf P. et al. Radiation combined with hyperthermia induces HSP70-dependent maturation of dendritic cells and release of pro-inflammatory cytokines by dendritic cells and macrophages // *Radiother. Oncol*. Elsevier, 2011. Vol. 101, № 1. P. 109–115.
81. Schlaff C.D. et al. Bringing the heavy: carbon ion therapy in the radiobiological and clinical context // *Radiat. Oncol*. 2014. Vol. 9, № 1. P. 88.
82. Seifert L. et al. Radiation Therapy Induces Macrophages to Suppress T-Cell Responses Against Pancreatic Tumors in Mice. // *Gastroenterology*. 2016. Vol. 150, № 7. P. 1659-1672.e5.
83. Shan M. et al. Autophagy suppresses isoprenaline-induced M2 macrophage polarization via the ROS/ERK and mTOR signaling pathway // *Free Radic. Biol. Med*. 2017. Vol. 110. P. 432–443.
84. Sonveaux P. et al. Irradiation-induced Angiogenesis through the Up-Regulation of the Nitric Oxide Pathway // *Cancer Res*. 2003. Vol. 63, № 5. P. 1012 LP – 1019.
85. Stary V. et al. Short-course radiotherapy promotes pro-inflammatory macrophages via extracellular vesicles in human rectal cancer. // *J. Immunother. cancer*. 2020. Vol. 8, № 2.
86. Takeya M., Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? // *Pathol. Int*. John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Vol. 66, № 9. P. 491–505.
87. Teresa Pinto A. et al. Ionizing radiation modulates human macrophages towards a

- pro-inflammatory phenotype preserving their pro-invasive and pro-angiogenic capacities // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 18765.
88. Unanue E.R. Antigen-Presenting Function of the Macrophage // *Annu. Rev. Immunol. Annual Reviews*, 1984. Vol. 2, № 1. P. 395–428.
 89. Vergadi E. et al. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization // *J. Immunol.* 2017. Vol. 198, № 3. P. 1006 LP – 1014.
 90. Walker E.B., Lanier L.L., Warner N.L. Concomitant induction of the cell surface expression of Ia determinants and accessory cell function by a murine macrophage tumor cell line. // *J. Exp. Med.* 1982. Vol. 155, № 2. P. 629–634.
 91. Wang D. et al. The clinical and prognostic significance of CD14+HLA-DR⁻/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients receiving radiotherapy // *Tumor Biol.* 2016. Vol. 37, № 8. P. 10427–10433.
 92. Wang S.-C. et al. Radiation therapy-induced tumor invasiveness is associated with SDF-1-regulated macrophage mobilization and vasculogenesis. // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 8. P. e69182.
 93. Weichhart T., Säemann M.D. The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications // *Ann. Rheum. Dis.* 2008. Vol. 67, № Suppl 3. P. iii70 LP-iii74.
 94. Wu Q. et al. NOX2-dependent ATM kinase activation dictates pro-inflammatory macrophage phenotype and improves effectiveness to radiation therapy // *Cell Death Differ.* 2017. Vol. 24, № 9. P. 1632–1644.
 95. Wu T.-H. et al. Culture supernatants of different colon cancer cell lines induce specific phenotype switching and functional alteration of THP-1 cells // *Cell. Immunol.* 2014. Vol. 290, № 1. P. 107–115.
 96. Xia C. et al. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation // *Frontiers in Immunology* . 2018. Vol. 8. P. 1908.
 97. Xiu B. et al. IL-10 induces the development of immunosuppressive CD14(+)^{HLA-DR}(low/-) monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma // *Blood Cancer J. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 5, № 7. P. e328–e328.

98. Yang J.-B. et al. FoxO1 is a regulator of MHC-II expression and anti-tumor effect of tumor-associated macrophages // *Oncogene*. 2018. Vol. 37, № 9. P. 1192–1204.
99. Yang L., Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application // *J. Hematol. Oncol.* 2017. Vol. 10, № 1. P. 58.
100. Yoshino H. et al. Relationship between the regulation of caspase-8-mediated apoptosis and radioresistance in human THP-1-derived macrophages // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 10.
101. Zhu X. et al. The pivotal role of DNA methylation in the radio-sensitivity of tumor radiotherapy // *Cancer Med.* John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 7, № 8. P. 3812–3819.
102. Zlotnik A. et al. Characterization of the gamma-interferon-mediated induction of antigen-presenting ability in P388D1 cells. // *J. Immunol.* 1983. Vol. 131, № 6. P. 2814 LP – 2820.