

# ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ PD-L1 И PD-L2 В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ АРАНОЗЫ И «ПУСТЫХ» ЛИПОСОМ

А.В. Пономарев, В.А. Мисюрин, А.А. Рудакова, А.В. Мисюрин, М.А. Барышникова

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Александр Васильевич Пономарев kl8546@yandex.ru

**Введение.** В последние годы достигнут значительный прогресс в иммунотерапии опухолей, однако пока мало информации о влиянии химиопрепаратов на взаимодействие опухоли и иммунной системы. Вызывает интерес вопрос о возможности лечения блокаторами PD-1 и его лигандов после химиотерапии.

**Цель исследования** — изучить изменение экспрессии матричной РНК (мРНК) и поверхностных молекул PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях меланомы человека после воздействия лекарственных форм аранозы — лиофилизата для приготовления раствора для инъекций (араноза-лио) и липосомальной, а также «пустых» липосом, не содержащих аранозы.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на 11 клеточных линиях метастатической меланомы человека, 5 из которых несли мутацию BRAF. В количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени исследовали уровень экспрессии генов PD-L1 и PD-L2. В реакции иммунофлуоресценции оценивали экспрессию белков PD-L1 и PD-L2.

**Результаты.** мРНК PD-L1 и PD-L2 экспрессируется на меньшем уровне в клеточных линиях, имеющих мутации BRAF, но различия достоверны только для PD-L2 ( $p = 0,1373$  и  $p = 0,0207$  соответственно). Экспрессия поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в необработанных препаратами клеточных линиях детектируется только на клеточных линиях с диким типом BRAF. В целом, после воздействия липосомальной аранозы уровень экспрессии мРНК PD-L1 и PD-L2 становится значительно ниже ( $p = 0,0004$  и  $p = 0,0442$  соответственно), чем в необработанных линиях. Араноза-лио и «пустые» липосомы в основном привели к увеличению уровня экспрессии PD-L1 ( $p < 0,0001$  и  $p = 0,0005$  соответственно) и PD-L2 ( $p = 0,0005$  и  $p = 0,0025$ ). Но на отдельных линиях наблюдался противоположный эффект. Изменения экспрессии белков PD-L1 и PD-L2 не коррелируют с изменениями уровня экспрессии мРНК. Экспрессия белка PD-L1 после инкубации с липосомальной аранозой повышается по сравнению с необработанными линиями ( $p = 0,0269$ ), а после воздействия аранозы-лио и «пустых» липосом — уменьшается ( $p = 0,0663$  и  $p = 0,7213$  соответственно). Экспрессия белка PD-L2 после воздействия липосомальной аранозы значимо не меняется ( $p = 0,1141$ ), а после инкубации с аранозой-лио и «пустыми» липосомами уменьшается ( $p = 0,0021$  и  $p = 0,008$ ).

**Выводы.** Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей и еще раз подтверждают, что уровень мРНК и белков PD-L1 и PD-L2 изменяется при различных воздействиях. Лекарственные формы аранозы, а также «пустые» липосомы оказывают разное влияние на экспрессию как мРНК, так и белков PD-L1 и PD-L2.

**Ключевые слова:** PD-L1, PD-L2, араноза, меланома

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-74-81

## THE INFLUENCE OF ARANOZA DRUG FORMULATIONS AND «EMPTY» LIPOSOMES ON THE EXPRESSION OF PD-L1 AND PD-L2 IN HUMAN MELANOMA CELL LINES

A.V. Ponomarev, V.A. Misyurin, A.A. Rudakova, A.V. Misyurin, M.A. Baryshnikova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow 115478, Russia

**Introduction.** In recent years, significant progress has been achieved in immunotherapy of tumors, however, little is known about the crosstalk between the tumor and the immune system. It seems reasonable to rise the question of patients treatment with PD-1 and its ligands blockers after chemotherapy.

**Objective.** To investigate the expression of cell surface molecules PD-L1 and PD-L2 both at the mRNA and protein levels in human melanoma cell lines after exposure to «Aranoza, lyophilisate for preparation of solution for injections» (aranoza-lío), liposomal formulation of aranoza and «empty» liposomes without aranoza.

**Materials and methods.** In this study we used 11 melanoma cell lines, 5 of which carried the BRAF mutation. In quantitative polymerase chain reaction in real time we investigated the level of PD-L1 and PD-L2 gene expression. Using flow cytometry we evaluated the expression of cell surface antigens PD-L1 and PD-L2.

**Results.** PD-L1 and PD-L2 mRNA are expressed at a lower level in cells with BRAF mutations, differences were significant only for PD-L2 ( $p = 0.1373$  and  $p = 0.0207$  respectively). A high basal level of protein PD-L1 and PD-L2 expression was observed in wild type BRAF melanoma cells. After exposure to liposomal aranoza the level of PD-L1 and PD-L2 mRNA expression was significantly reduced ( $p = 0.0004$  and  $p = 0.0442$  respectively) in compare to control non-treated cells. It is of interest, aranoza-lip and «empty» liposomes increased the expression of PD-L1 ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0005$  respectively) and PD-L2 ( $p = 0.0005$  and  $p = 0.0025$ ). Of note, we observed an opposite effect in some melanoma cell lines. Moreover, changes in the expression of proteins PD-L1 and PD-L2 did not correlate with the mRNA level. The expression of PD-L1 protein after incubation with the liposomal aranoza increased dramatically compared to non-treated cells ( $p = 0.0269$ ). Aranoza-lip and «empty» liposomes decreased the expression of PD-L1 protein ( $p = 0.0663$  and  $p = 0.7213$  respectively). The protein level of PD-L2 after exposure to liposomal aranoza did not change significantly ( $p = 0.1141$ ), however, aranoza-lip and «empty» liposomes reduced the expression of PD-L2 ( $p = 0.0021$  and  $p = 0.008$ ).

**Conclusion.** These findings are consistent with those of other researchers and confirm that the level of PD-L1 and PD-L2 mRNA and protein are modulated after treatment. Also, various drug formulations of Aranoza, as well as the «empty» liposomes, have different effects on the expression of PD-L1 and PD-L2 mRNA and proteins.

**Key words:** PD-L1, PD-L2, aranoza, melanoma

## Введение

В последние годы значительное развитие получила иммунотерапия опухолей. Разрешены к применению или находятся на последних фазах клинических испытаний новые иммунотерапевтические препараты для лечения меланомы, в том числе блокаторы взаимодействия PD-1 с PD-L1/PD-L2 [1, 2]. Данные препараты показывают хорошие результаты по сравнению с традиционной химиотерапией опухолей [3]. Было замечено, что их эффективность зависит от наличия или отсутствия молекулы PD-L1 в опухоли [4]. В нормальной физиологии система PD-L1/PD-1 играет важную роль в предотвращении аутоиммунных реакций. PD-1 обычно экспрессируется на Т- и В-клетках [5]. PD-1 взаимодействует с 2 лигандами: PD-L1 (B7-H1, CD274) и PDL2 (B7-DC, CD273), которые демонстрируют совершенно разные паттерны экспрессии. В норме PD-L1 (CD274) экспрессируется на многих популяциях иммунных клеток [6], тогда как PD-L2 (CD273) экспрессируется на небольшом уровне в дендритных клетках и активированных макрофагах [7, 8]. Экспрессия PD-L1 на уровне матричной РНК (мРНК) высока в нормальных человеческих органах, включая сердце, скелетные мышцы, плаценту и легкие [9], однако экспрессия белка PD-L1 у здоровых субъектов иммуногистохимически [10] не обнаруживается.

Интересно, что белок PD-L1 индуцируется в различных нелимфоидных клетках, включая эпителиальные [11, 12] и эндотелиальные [13], в ответ на воспалительные цитокины, присутствующие в очаге заболевания. Например, в воспаленной коже PD-L1 экспрессируется в некоторых клетках микрососудов и кератиноцитах, но в здоровой коже не обнаруживается [14]. Экспрессия PD-L1 в эпителиальных клетках почечных канальцев детектируется у пациентов с почечными заболеваниями, такими как интерстициальный нефрит, волчаночный нефрит

и IgA-нефропатия. Экспрессия PD-L1 на этих клетках *in vitro* повышалась после их стимуляции интерлейкином-1 альфа, липополисахаридом, фактором некроза опухоли альфа, интерфероном гамма или анти-CD40-антителами [15]. Таким образом, эпителиальная экспрессия PD-L1 индуцируется воспалительными стимулами как *in vitro*, так и *in vivo* [16].

Возможно, иммунологические механизмы, индуцирующие экспрессию PD-L1, также могут быть связаны с лекарственной устойчивостью к химиотерапии. Есть данные, что в некоторых клеточных линиях меланомы человека повышалась экспрессия поверхностного PD-L1 после выработки резистентности к вемурафенибу в процессе культивирования с препаратом [17, 18].

Несмотря на значительные успехи иммунотерапии, на сегодняшний день стандартным методом лечения пациентов с метастатической меланомой кожи без BRAF/сKIT-мутации остается химиотерапия [19].

Ряд исследований посвящен комбинации традиционной химиотерапии или таргетной терапии с иммунотерапией, в частности, изучается влияние химиопрепаратов на индукцию противоопухолевого иммунитета, что может помочь в выборе оптимального сочетания препаратов и в итоге улучшить клинический эффект [20–22].

В настоящее время многие комбинации иммунопрепаратов с химиопрепаратами находятся еще на доклинической стадии исследования. Часто непонятно, будет ли химиотерапия способствовать иммуногенности опухоли или же, наоборот, окажет иммуносупрессивный эффект, который может нивелировать положительное воздействие иммунотерапии. Для большинства таких комбинаций требуются тщательные клинические исследования [23].

К числу химиопрепаратов, применяемых для лечения метастатической меланомы, относятся и производные нитрозомочевины, в том числе араноza. Для

лечения меланомы кожи зарегистрирована лекарственная форма аранозы «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» (араноза-лио). В лаборатории разработки лекарственных форм НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (НИИ ЭДиТО) ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России создана новая лекарственная форма аранозы — липосомальная [24, 25]. В исследованиях [26, 27] было показано, что липосомальная араноза *in vitro* оказывает воздействие на клеточные линии, устойчивые к аранозе-лио. Было обнаружено, что лекарственные формы аранозы по-разному воздействуют на клетки меланомы [28, 29].

В связи с этим мы решили изучить влияние 2 лекарственных форм аранозы — лиофилизата для приготовления раствора для инъекций и липосомальной, а также «пустых» липосом, не содержащих аранозу, на экспрессию мРНК и поверхностных молекул PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях меланомы человека.

## Материалы и методы

### Клеточные линии

Исследования проводили на 11 клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека: mel Cher, mel H, mel Gus, mel BGF, mel Hn, mel Ibr, mel II, mel Is, mel Me, mel Mtp и mel Si, выделенных из опухолевого материала больных, проходивших лечение в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [30]. Клеточные линии различались по степени дифференцировки и наличию или отсутствию мутаций гена *BRAF* [31, 32]. Линии mel Hn, mel Ibr, mel II, mel Is, mel Si несут мутацию *BRAF*. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 ммоль HEPES, 2 ммоль L-глутамин, пенициллин (25 000 Ед) — стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов при +37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> (полная среда). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

### Противоопухолевые препараты

- «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 500 мг» (араноза-лио) производства филиала «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
- липосомальная лекарственная форма аранозы (липосомальная араноза), предоставленная лабораторией разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Кроме лекарственных форм аранозы исследовали воздействие на клетки «пустых» липосом того же состава, который использовался для липосомальной аранозы.

Клетки инкубировали с лекарственными формами аранозы в концентрации 0,5 ИК<sub>50</sub> в течение 24 ч.

### Подготовка клеточного материала и выделение общей РНК

Клетки снимали с культуральных флаконов 0,02 % раствором Версена объемом 2 мл, содержащим 0,25 % трипсина. Клетки находились в трипсине 2 мин при постоянном наблюдении за их состоянием с помощью микроскопа. Добавляли 10 мл буфера STE (0,1 моль натрия хлорида, 1 моль Трис-HCl pH 8,0, 1 ммоль этилендиаминтетрауксусной кислоты) и центрифугировали в течение 5 мин при 800 об/мин. Удаляли супернатант, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК.

Выделение РНК из предварительно обработанных образцов производилось по протоколу, предложенному P. Chomczynski и N. Sacchi [33]. Подготовленный клеточный материал лизировали в 0,5 мл гуанидин-тиоцианатного буфера (4 моль тиоцианата гуанидина, 25 ммоль цитрата натрия, 0,5 % N-лаурил-саркозината натрия и 0,1 моль β-меркаптоэтанол). Во время лизиса материал пропускали через иглу 19G не менее 20 раз. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (pH 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (pH 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл хлороформа. Полученную смесь встряхивали до молочно-белого цвета и центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин и охлаждении до +4 °С. После центрифугирования отбирали 0,65 мл верхней водной фазы, содержащей клеточную РНК, и смешивали ее с 0,65 мл изопропанола. Инкубирование РНК в изопропанолу проводилось в течение 20 ч при температуре –20 °С. После инкубирования РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 12 000 об/мин, удаляли супернатант и 2 раза промывали в 80 % этаноле. После промывок осадок РНК высушивали в термостате в течение 20 мин при +37 °С, растворяли в 20 мкл деионизированной воды и измеряли концентрацию раствора.

Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) с использованием ревертазы брали 2 мкг мРНК, выделенной на предыдущем этапе. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента RevertAid Reverse Transcriptase и коммерческого набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, предложенных фирмой-производителем. Для отжи-

га использовали смесь случайных гексамеров («Синтол», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали рабочую смесь без добавления РНК. Пробу доводили до конечного объема 165 мкл деионизированной водой.

#### Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени проводили с использованием 2-кратной реакционной смеси (40 ммоль Трис-НСl, 100 ммоль хлорида калия, 4 ммоль хлорида магния, 1 ммоль каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 ммоль  $\beta$ -меркаптоэтанола) и Taq-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 мкл кДНК, 250 нмоль прямого и 250 нмоль обратного праймеров, и 140 нмоль флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с использованием программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *PD-L1* и *PD-L2*, доступных на интернет-ресурсе PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

В каждом образце был исследован уровень экспрессии генов *PD-L1* и *PD-L2*. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

Данный эксперимент проводили на приборе DT-Lite («ДНК-Технология», Россия).

Программа проведения реакций была следующей: предварительная обработка в течение 5 мин при +94 °C и 45 циклов денатурации в течение 10 с при +94 °C с последующим отжигом праймеров и синтезом в течение 12 с при +60 °C.

Для детекции флуоресценции был выбран канал Nex. Измерения велись по общепризнанной методике относительно гена *ABL*, уровень экспрессии которого был принят за 100 % [34]. Измерения уровня экспрессии проводились в 3 независимых повторях, после чего для анализа было рассчитано среднее значение. В качестве положительного контроля использовали векторы pET-15b, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность синтезированных олигонуклеотидных последовательностей подтверждена секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

#### Реакция иммунофлуоресценции

После 24 ч инкубации с исследуемыми препаратами клетки снимали с культуральных флаконов раствором Версена и 2 раза отмывали натрий-фосфатным буфером. Разносили в пробирки по 50 мкл и добавляли по 20 мкл антител к *PD-L1* (CD274FITC, 558065, BD Pharmingen™) и к *PD-L2* (CD273APC, 557926, BD Pharmingen™). Инкубировали в течение

30 мин, после чего 2 раза отмывали в натрий-фосфатном буфере. Подсчет проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (Becton Dickinson, США). Измерения проводили в 3 независимых повторях, после чего для анализа было рассчитано среднее значение.

#### Статистический анализ данных

Для сравнения базового уровня экспрессии *PD-L1* и *PD-L2* между разными группами клеток линий меланомы, различающихся по таким признакам, как наличие или отсутствие мутаций гена *BRAF* и степень дифференцировки, использовался однофакторный дисперсионный анализ (analysis of variation, ANOVA). Для сравнения эффектов, оказываемых на уровень экспрессии *PD-L1* и *PD-L2* различными формами аранозы, был использован Т-критерий Уилкоксона для связанных выборок. Анализ был проведен в программе STATISTICA версии 7. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

#### Результаты

Клеточные линии метастатической меланомы кожи человека инкубировали в течение 24 ч с лекарственными формами аранозы — аранозой-лио и липосомальной, а также с «пустыми» липосомами, после чего оценивали изменение экспрессии мРНК и белков *PD-L1* и *PD-L2*.

Некоторые клеточные линии — mel Cher, mel Bgf, mel Me — имеют высокий базовый уровень мРНК *PD-L1* или *PD-L2* (табл. 1). мРНК *PD-L1* и *PD-L2* экспрессируется на меньшем уровне в клетках, имеющих мутации гена *BRAF*, но эти различия были достоверны только для *PD-L2* ( $p = 0,1373$  и  $p = 0,0207$  соответственно).

Уровень экспрессии мРНК *PD-L1* и *PD-L2* не зависит от степени дифференцировки клеточных линий меланомы ( $p = 0,8922$  и  $p = 0,9582$  соответственно) [31].

Определен уровень экспрессии поверхностных белков *PD-L1* и *PD-L2* в клеточных линиях метастатической меланомы человека (табл. 2). Экспрессия поверхностных белков *PD-L1* и *PD-L2* в не обработанных препаратами клеточных линиях чаще всего невысока или отсутствует. Положительная экспрессия хотя бы 1 из исследуемых белков детектируется только на 5 линиях из 11 (mel Cher, mel Gus, mel Bgf, mel Me, mel Mtp). Интересно, что все клетки, экспрессирующие белки *PD-L1* или *PD-L2*, не имеют мутации гена *BRAF*.

Анализ изменения уровня экспрессии мРНК *PD-L1* и *PD-L2* показал, что араноза в разных лекарственных формах оказывает неодинаковые эффекты. В целом, после воздействия липосомальной аранозы



Таблица 1. Изменение экспрессии мРНК PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы человека

Клеточная линия	Мутации BRAF	Экспрессия мРНК, %							
		Необработанные клетки		Араноза-лио		Липосомальная араноза		«Пустые» липосомы	
		PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2
mel Hn	+	8,84	0,39	50,00	0,00	10,88	0,00	131,95	0,00
mel Ibr	+	0,68	0,63	2,92	3,12	8,84	1,46	1,56	2,06
mel II	+	5,44	0,73	21,76	13,40	7,69	2,92	18,95	15,39
mel Is	+	0,63	0,00	0,78	0,01	0,36	0,26	0,90	0,04
mel Si	+	1,79	6,25	0,78	0,01	0,36	0,26	0,90	0,04
mel Cher	—	70,71	20,31	123,11	40,61	5,44	1,18	214,35	151,57
mel H	—	11,66	1,10	246,23	174,11	26,79	4,12	6,70	20,31
mel Gus	—	4,12	16,49	0,78	17,68	8,84	7,18	10,88	263,90
mel Bgf	—	12,50	75,79	1,27	107,18	0,96	3,35	12,50	123,11
mel Me	—	23,33	81,23	5,44	17,68	5,08	7,69	7,18	21,76
mel Mtp	—	8,80	13,40	1,46	4,42	0,01	1,67	1,10	1,10

Таблица 2. Изменение экспрессии поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы человека

Клеточная линия	Мутации BRAF	Антиген-положительные клетки, %							
		Необработанные клетки		Араноза-лио		Липосомальная араноза		«Пустые» липосомы	
		PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2
mel Cher	—	4,1	2,4	1	0,5	16,2	0,3	2,6	7,4
mel Gus	—	0,7	30,8	1,3	24,8	20,1	2,8	1,3	0,6
mel Bgf	—	4,5	95,5	0,1	98	6,3	1,9	0,7	15,8
mel Me	—	0,8	9,9	0,9	0,7	0,7	1,7	1,9	25,9
mel Mtp	—	2,1	14	1,9	0,2	2,3	1,1	1,1	17,4

уровень экспрессии PD-L1 и PD-L2 становится значительно ниже ( $p = 0,0004$  и  $p = 0,0442$  соответственно), чем в исходных линиях. Но есть исключения: в линиях mel Ibr, mel H и mel Gus уровень экспрессии гена PD-L1 увеличился. Араноза-лио и «пустые» липосомы в основном привели к увеличению уровня экспрессии PD-L1 ( $p < 0,0001$  и  $p = 0,0005$  соответственно) и PD-L2 ( $p = 0,0005$  и  $p = 0,0025$ ) (рис. 1). На отдельных линиях наблюдался противоположный эффект (табл. 1).

Араноза-лио и «пустые» липосомы уменьшают уровень экспрессии белка PD-L1 в линиях меланомы ( $p = 0,0663$  и  $p = 0,7213$  соответственно). Инкубация с липосомальной аранозой, напротив, приводит к значительному повышению уровня экспрессии белка PD-L1 по сравнению с исходными линиями ( $p = 0,0269$ ) (рис. 2а).

Инкубация с аранозой-лио и «пустыми» липосомами уменьшает уровень экспрессии белка PD-L2 ( $p = 0,0021$  и  $p = 0,008$ ). Уровень экспрессии PD-L2 после воздействия липосомальной аранозы значительно не изменился ( $p = 0,1141$ ) (рис. 2б).

### Заключение

Мы обнаружили, что белки PD-L1 и PD-L2 экспрессируются только на клеточных линиях с диким типом BRAF. Экспрессия мРНК и белка PD-L1 и PD-L2 на BRAF-отрицательных линиях достаточно заметно меняется после инкубации клеток как с разными лекарственными формами аранозы, так и с «пустыми» липосомами, однако изменения уровня белка не коррелируют с изменениями уровня мРНК. Учитывая тот факт, что в некоторых клеточных линиях «пустые» липосомы значимо

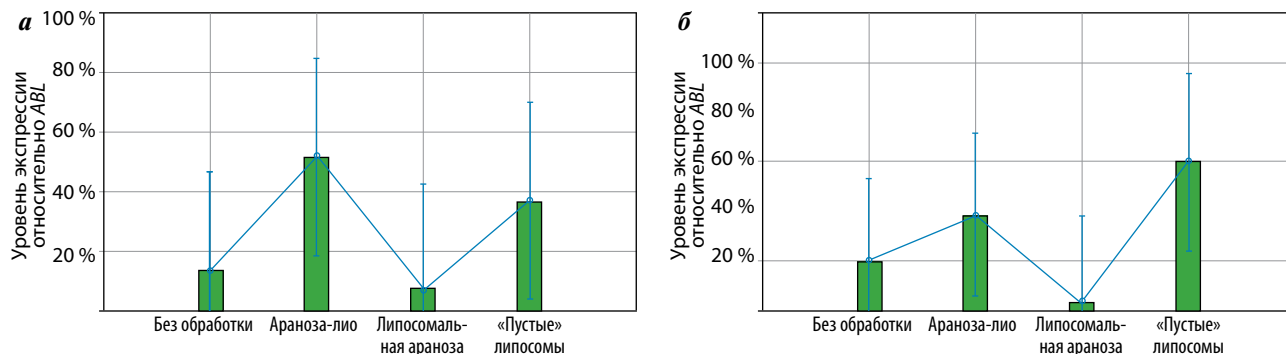


Рис. 1. Изменение уровня экспрессии мРНК PD-L1 (А) и PD-L2 (Б) после воздействия исследуемыми препаратами

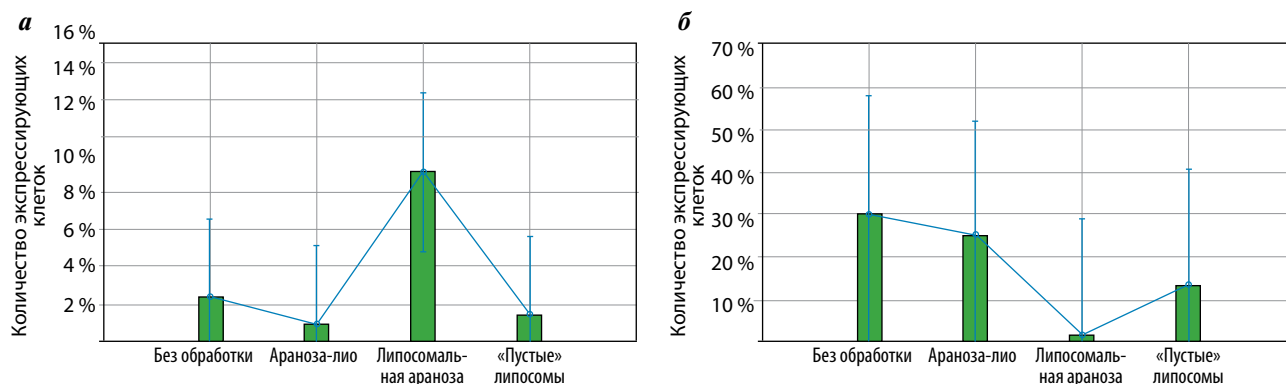


Рис. 2. Изменение уровня экспрессии белков PD-L1 (а) и PD-L2 (б) после воздействия исследуемыми препаратами

повышают уровень экспрессии мРНК PD-L1 или PD-L2, становится ясно, что подобные изменения могут быть вызваны не только противоопухолевыми химиопрепаратами. Однако мы не можем объяснить, какие механизмы задействованы при повышении уровня экспрессии мРНК PD-L1 или PD-L2 под влиянием аранозы-лио или «пустых» липосом.

В схожих исследованиях на клеточных линиях меланомы человека отмечена важность сигнальных белков MAPK и STAT3 в увеличении уровня экспрессии мРНК и белка PD-L1 при воздействии вемурафениба [17, 18] и STAT3 – в поддержании конститутивной экспрессии PD-L1 [35]. Также можно отметить, что в экспериментах *in vitro* на линиях плоскоклеточного рака пищевода человека облучение увеличивало поверхностную экспрессию PD-L1. Для плоскоклеточного рака пищевода лучевая терапия является хорошо налаженным лечебным воздействием и обеспечивает преимущества в выживаемости [36]. Для молекулы PD-L2 подобных данных в литературе не найдено.

В исследовании К.А. Schats и соавт. на 46 образцах метастазов меланомы изучали присутствие поверхностного PD-L1 методом иммуногистохимии

и его мРНК на 21 образце из 46. Данные иммуногистохимии показали высокую корреляцию с данными экспрессии мРНК PD-L1. Во всех образцах, где была измерена мРНК PD-L1, была обнаружена ее экспрессия на уровне от 1 до 250 % [37]. Эти результаты схожи с нашими данными, полученными на клеточных линиях, не обработанных препаратами. Схожие данные по экспрессии PD-L1 были получены на клеточных линиях меланомы человека и в работах других ученых [17, 18].

Наши результаты подтверждают данные других исследователей о том, что уровень мРНК и белка PD-L1 в клеточных линиях нестабилен.

Увеличение экспрессии PD-L1 и PD-L2 в опухолевых клетках может способствовать защите опухоли от иммунного ответа. В нашем исследовании липосомальная форма аранозы не вызвала значительного повышения уровня экспрессии мРНК PD-L1 и PD-L2 в исследованных линиях меланомы человека. Мы обнаружили, что, несмотря на повышение уровня экспрессии мРНК PD-L1 или PD-L2 под действием аранозы-лио или «пустых» липосом, экспрессия белков PD-L1 или PD-L2 значимо не повышается, а в большинстве случаев, наоборот, снижается.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Franklin C., Livingstone E., Roesch A. et al. Immunotherapy in melanoma: recent advances and future directions. *Eur J Surg Oncol* 2017;43(3):604–11. DOI: 10.1016/j.ejso.2016.07.145. PMID: 27769635.
- Ключагина Ю.И., Соколова З.А., Барышникова М.А. Роль рецептора PD1 и его лигандов PDL1 и PDL2 в иммунотерапии опухолей. *Онкопедиатрия* 2017;4(1):49–55. DOI: 10.15690/onco.v4i1.1684.
- Guan X., Wang H., Ma F. et al. The efficacy and safety of programmed cell death 1 and programmed cell death 1 ligand inhibitors for advanced melanoma: a meta-analysis of clinical trials following the PRISMA guidelines. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(11):e3134. DOI: 10.1097/MD.00000000000003134. PMID: 26986169.
- Patel S.P., Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 2015;14(4):847–56. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0983. PMID: 25695955.
- Pauken K.E., Wherry E.J. Overcoming T-cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol* 2015;36(4):265–76. DOI: 10.1016/j.it.2015.02.008.
- Topalian S.L., Drake C.G., Pardoll D.M. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012;24(2):207–12. DOI: 10.1016/j.coi.2011.12.009. PMID: 22236695.
- Loke P., Allison J.P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(9):5336–41. DOI: 10.1073/pnas.0931259100. PMID: 12697896.
- Tseng S.Y., Otsuji M., Gorski K. et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T-cells. *J Exp Med* 2001;193(7):839–46. DOI: 10.1084/jem.193.7.839. PMID: 11283156.
- Dong H., Zhu G., Tamada K., Chen L. B7-H1, a 3<sup>rd</sup> member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;5(12):1365–9. DOI: 10.1038/70932. PMID: 10581077.
- Dong H., Strome S.E., Salomao D.R. et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8(8):793–800. DOI: 10.1038/nm730. PMID: 12091876.
- Nakazawa A., Dotan I., Brimnes J. et al. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2004;126(5):1347–57. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.004>. PMID: 15131796.
- Youngnak-Piboonratanak P., Tsushima F., Otsuki N. et al. The expression of B7-H1 on keratinocytes in chronic inflammatory mucocutaneous disease and its regulatory role. *Immunol Lett* 2004;94(3):215–22. DOI: 10.1016/j.imlet.2004.05.007. PMID: 15275969.
- Rodrig N., Ryan T., Allen J.A. et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8<sup>+</sup> T-cell activation and cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2003;33(11):3117–26. DOI: 10.1002/eji.200324270. PMID: 14579280.
- Mazanet M.M., Hughes C.C. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T-cell cytokine synthesis. *J Immunol* 2002;169(7):3581–8. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3581>. PMID: 12244148.
- Chen Y., Zhang J., Li J. et al. Expression of B7-H1 in inflammatory renal tubular epithelial cells. *Nephron Exp Nephrol* 2006;102(3–4):e81–92. DOI: 10.1159/000089686. PMID: 16282703.
- Ritprajak P., Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2015;51(3):221–8. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.11.014. PMID: 25500094.
- Jiang X., Zhou J., Giobbie-Hurder A. et al. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res* 2013;19(3):598–609. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2731. PMID: 23095323.
- Atefi M., Avramis E., Lassen A. et al. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clin Cancer Res* 2014;20(13):3446–57. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2797. PMID: 24812408.
- Практические рекомендации по лекарственному лечению злокачественных опухолей (RUSSCO). Под ред. В.М. Моисеенко. М.: Российское общество клинической онкологии, 2016. 524 с.
- Gotwals P., Cameron S., Cipolletta D. et al. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2017;17(5):2866–301. DOI: 10.1038/nrc.2017.17. PMID: 28338065.
- Simeone E., Grimaldi A.M., Festino L. et al. Combination treatment of patients with BRAF-mutant melanoma: a new standard of care. *BioDrugs* 2017;31(1):51–61. DOI: 10.1007/s40259-016-0208-z. PMID: 28058658.
- Ascierto P.A., Agarwala S., Botti G. et al. Future perspectives in melanoma research: meeting report from the «melanoma bridge». Napoli, December 1<sup>st</sup>–4<sup>th</sup> 2015. *J Transl Med* 2016;14(1):313. DOI: 10.1186/s12967-016-1070-y. PMID: 27846884.
- Harris S.J., Brown J., Lopez J. et al. Immuno-oncology combinations: raising the tail of the survival curve. *Cancer Biol Med* 2016;13(2):171–93. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0015. PMID: 27458526.
- Козеев Г.С. Разработка липосомальной лекарственной формы противоопухолевого препарата араноза. Автореф. ... дисс. канд. фарм. наук. М., 2013. 25 с.
- Козеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова С.А., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной липосомальной формы аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(2):24.
- Козеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(2):24.
- Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевин апоптоза. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):41–53.
- Афанасьева Д.А., Мисюрин В.А., Пономарев А.В. и др. Изменение уровня экспрессии гена CD95/FAS в клетках линий меланомы под воздействием липосомальной аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(3):34–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-34-39.
- Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Хоченкова Ю.А. и др. Липосомальная араноза не индуцирует аутофагию. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):15–8.
- Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы — основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник РАМН* 2005;7:37–40.

31. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. Сибирский онкологический журнал 2010;37(1):29–39.
32. Рябая О.О., Цыганова И.В., Сидорова Т.И. и др. Влияние активирующих мутаций V600 гена BRAF на способность клеток меланомы к аутофагии. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2013;3:68–72.
33. Chomczynski P., Sacchi N. The singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty something years on. Nat Protoc 2006;1(2):581–5. PMID: 17406285.
34. Moore F.R., Rempfer C.B., Press R.D. Quantitative BCR-ABL1 RQ-PCR fusion transcript monitoring in chronic myelogenous leukemia. Press Methods Mol Biol 2013;999:1–23. DOI: 10.1007/978-1-62703-357-2\_1. PMID:23666687.
35. Lienlaf M., Perez-Villarreal P., Knox T. et al. Essential role of HDAC6 in the regulation of PD-L1 in melanoma. Mol Oncol 2016;10(5):735–50. DOI: 10.1016/j.molonc.2015.12.012. PMID: 26775640.
36. Chen M.F., Chen P.T., Chen W.C. et al. The role of PD-L1 in the radiation response and prognosis for esophageal squamous cell carcinoma related to IL-6 and T-cell immunosuppression. Oncotarget 2016;7(7):7913–24. DOI: 10.18632/oncotarget.6861. PMID: 26761210.
37. Schats K.A., Van Vré E.A., De Schepper S. et al. Validated programmed cell death ligand 1 immunohistochemistry assays (E1L3N and SP142) reveal similar immune cell staining patterns in melanoma when using the same sensitive detection system. Histopathology 2017;70(2):253–63. DOI: 10.1111/his.13056. PMID: 27496355.